



Universitat de Lleida

# Utilitat de la Immunohistoquímica i els Tissue Micro Arrays en el coneixement de les alteracions moleculars del càncer d'endometri

Maria Santacana Espasa

Dipòsit Legal: L.878-2015

<http://hdl.handle.net/10803/307214>

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

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

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



# Utilitat de la Immunohistoquímica i els Tissue Micro Arrays en el coneixement de les alteracions moleculars del Càncer d'Endometri

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES  
DOCTORAT EN SALUT

Maria Santacana Espasa

Codirectors:

Xavier Matias-Guiu Guia

Andree Yeramian Hakim

Lleida, 2015



***Als meus pares i al meu germà  
Al Xavi***



*"El que sabem és una gota d'aigua, el que ignorem és l'oceà"*

*Isaac Newton*



## **Agraïments**

---





## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc vull donar les gràcies als co directors d'aquesta tesi. Al Dr. Xavier Matias-Guiu per donar-me la oportunitat de conèixer d'aprop l'Anatomia Patològica, treballar en el marc de la patologia molecular del càncer i concretament contribuir, en la mesura del possible, als avenços relacionats amb el Càncer d'Endometri.

A la Dra. Andree Yeramian per la seva implicació, dedicació i contribució, així com per les correccions, suggeriments i ajuda en el disseny i redacció d'aquesta tesi doctoral.

A la resta de companys del grup de Patologia Oncològica per la seva col·laboració, per la seva feina, especialment a la Cristina Mirantes, la Núria Eritja, l'Ana Velasco, l'Andree Yeramian i el Xavier Dolcet.

A tots aquells que han contribuït en la gènesi dels articles, imprescindibles perquè aquesta tesi s'hagi pogut dur a terme.

Particularment agraeixo al Servei de bioestadística i suport metodològic de l'IRB Lleida, a la Montse Martínez i especialment al Joan Valls, no només el suport rebut sinó també la qualitat de la feina feta.

A la Cristina Pons, biòloga de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, pel mestratge i les primeres nocions en Immunohistoquímica.

A tots els companys del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Arnau de Vilanova, patòlegs, biòlegs/biotecnòlegs, tècnics/citotècnics, companys de cafès, de dinars, etc. Pel seu suport, l'acollida, la paciència, el companyerisme i les bones estones. Especialment a la Lídia Parra i a l'Óscar Maiques, per la predisposició i ajuda que m'han ofert.

De manera molt sincera agraeixo a la Judit Pallarés tot el que m'ha ensenyat sobre Immunohistoquímica, Tissue Micro Arrays i Càncer d'Endometri, a més a més d'acompanyar-me al llarg d'aquests anys amb innumbrables consells i confidències.

També vull agrair a la Sònia Gatiús el seu temps i dedicació a l'hora d'ensenyar-me histologia del Càncer d'Endometri juntament amb tantes estones de converses i aficions comunes.

Per últim, a la Dolors Cuevas, per la confiança i amabilitat. Gràcies per fer una lectura crítica i constructiva d'aquesta tesi doctoral.

I finalment, a totes les pacients que de bon grat formen part dels diversos estudis, sense elles aquesta feina no tindria sentit.

A tots, moltes gràcies.

**Resum**

---



## RESUM

El Càncer d'Endometri (EC) és el tumor més comú del tracte genital femení. Generalment s'associa a bon pronòstic, no obstant el 20% dels EC associats a bon pronòstic presenten malaltia recurrent. El propòsit d'aquesta tesi doctoral ha estat l'estudi de les principals diferències en l'expressió de gens rellevants implicats en el desenvolupament, la progressió i la recidiva del EC, així com dels gens relacionats amb la hipòxia, la resistència a l'apoptosi i l'adaptació a la radioteràpia mitjançant la Immunohistoquímica i els *Arrays* matricials de teixit. La classificació histològica del EC pot ser difícil en alguns carcinomes d'alt grau o mixtes, per tant la determinació de nous biomarcadors podria ser d'utilitat en el diagnòstic d'aquest grup de tumors. Per aquest motiu també hem volgut determinar una firma de biomarcadors que ajudi a predir el tipus histològic en el EC.

En primer lloc hem comparat 24 recidives post radioteràpia i 82 carcinomes primaris d'endometri no recidivants i hem vist que les recidives post radioteràpia presenten valors més elevats de les proteïnes p53, HIF-1 $\alpha$ , FLIP, Ki 67, p50, c-REL, Rel B i  $\beta$ -catenina. La hipòxia és un dels factors més importants implicats en la radioresistència tumoral. Nosaltres hem volgut veure si la línia de EC Ishikawa (IK) sotmesa a condicions d'hipòxia mostra un perfil d'expressió similar a l'obtingut mitjançant TMA's. Hem vist que la hipòxia induïx l'expressió nuclear de HIF-1 $\alpha$ , FLIP,  $\beta$ -catenina i un augment de l'activitat de NF- $\kappa$ B, en canvi això no s'observa quan la línia cel·lular IK es sotmet a radiació. A continuació hem estudiat els mecanismes moleculars implicats en la resistència a la mort induïda per la hipòxia i hem vist que aquesta activa tant la via NF- $\kappa$ B canònica com l'alternativa. Després de caracteritzar les cinases implicades en l'activació d'aquestes vies hem observat que tant la cinasa IKK $\alpha$  com IKK $\beta$  són necessàries per l'acumulació de RelA (p65) i p100, mentre que el processament de p52 depèn de IKK $\alpha$ .

En segon lloc hem volgut estudiar ANXA2 com a biomarcador predictiu de recidiva en el EC. Els nostres resultats ens mostren que ANXA2 juga un paper en promoure el procés de metàstasi en el EC i és un marcador predictiu de recidiva també en els EC de baix grau, estadi I.

Finalment, atès que la determinació del tipus histològic pot ser difícil en alguns EC d'alt grau o mixtes endometrioides-no endometrioides, hem determinat una firma predictiva de 9 biomarcadors interna i externament validada que permet predir el tipus histològic en el EC. A més a més, els nostres resultats mostren que els components endometrioides i serosos

dels carcinomes mixtes presenten característiques immunohistoquímiques mixtes, cosa que suggereix que existeix un solapament a nivell d'alteracions moleculars, independentment de la morfologia de cada component.

## RESUMEN

El Cáncer de Endometrio (EC) es el tumor más común del tracto genital femenino. Generalmente se asocia a buen pronóstico, sin embargo el 20% de los EC asociados a buen pronóstico presentan enfermedad recurrente. El propósito esta tesis doctoral ha sido el estudio de las principales diferencias en la expresión de genes relevantes implicados en el desarrollo, la progresión y la recidiva del EC así como de los genes relacionados con la hipoxia, la resistencia a la apoptosis i la adaptación a la radioterapia mediante la Inmunohistoquímica y los *Arrays* matriciales de tejido. La clasificación histológica del EC puede ser difícil en algunos carcinomas de alto grado o mixtos, por lo tanto la determinación de nuevos biomarcadores podría ser de utilidad en el diagnóstico de este grupo de tumores. Por ese motivo también hemos querido determinar una firma de biomarcadores que ayude a predecir el tipo histológico en el EC.

En primer lugar, hemos comparado 24 recidivas post radioterapia y 82 carcinomas primarios de endometrio no recurrentes y hemos visto que las recidivas post radioterapia presentan valores más elevados de p53, HIF-1 $\alpha$ , FLIP, ki 67, p50, c-REL, Rel B i  $\beta$ -catenina. La hipoxia es uno de los factores más importantes implicados en la radioresistencia tumoral. Hemos querido ver si la línea de EC Ishikawa (IK) sometida a condiciones de hipoxia muestra un perfil de expresión similar al obtenido mediante TMAs. Hemos visto que la hipoxia induce la expresión nuclear de HIF-1 $\alpha$ , FLIP,  $\beta$ -catenina y un aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B, en cambio dichos cambios no se observan cuando la línea celular IK se somete a radiación. A continuación hemos estudiado los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la muerte inducida por la hipoxia y hemos visto que la hipoxia activa tanto la vía NF- $\kappa$ B canónica como la alternativa. Después de caracterizar las cinasas implicadas en la activación de estas vías hemos visto que tanto la cinasa IKK $\alpha$  como IKK $\beta$  son necesarias para la acumulación de RelA (p65) y p100, mientras que el procesamiento de p52 depende de IKK $\alpha$ .

En segundo lugar hemos querido estudiar ANXA2 como biomarcador predictivo de enfermedad recurrente en el EC. Nuestros resultados muestran que ANXA2 juega un papel en la promoción del proceso de metástasis en el EC y es un marcador predictivo de recidiva incluso en los EC de bajo grado, estadio I.

Finalmente, dado que la determinación del tipo histológico puede resultar difícil en algunos EC de alto grado o mixtos endometrioides-no endometrioides, hemos determinado



una firma predictiva de 9 biomarcadores interna y externamente validada que permite predecir el tipo histológico en el EC. Además, nuestros resultados muestran que los componentes endometrioides y serosos de los carcinomas mixtos presentan características inmunohistoquímicas mixtas, hecho que sugiere que existe un solapamiento a nivel de alteraciones moleculares, independientemente de la morfología de cada componente.

## SUMMARY

Endometrial Cancer (EC) is the most common tumor of the female genital tract. It is usually associated with good prognosis. However, 20% of the EC associated with good prognosis have recurrent disease. The aim of this work was to study the expression of relevant genes involved in development, progression and recurrence of Endometrioid Endometrial Carcinoma (EEC) and other genes involved in resistance to apoptosis, hypoxia and adaptation to radiation, by using Immunohistochemistry and Tissue Micro Arrays. Although classification of EC according to histological type is usually easy, it may be difficult in some high grade or mixed EC. So, we additionally assessed a biomarker signature to predict histological type in EC.

First, we compared 24 post radiation recurrences with 82 non-recurrent primary endometrial carcinomas and observed that post radiation recurrences showed higher p53, HIF-1 $\alpha$ , FLIP, ki 67, p50, c-REL, Rel B and  $\beta$ -catenin expression values. Hypoxia is one of the most important factors involved in radiation resistance in tumors. We wanted to know if Ishikawa (IK) cell line subjected to hypoxic conditions showed an immunoexpression profile similar to that of TMAs. We observed that hypoxia induced nuclear expression of HIF-1 $\alpha$ , FLIP,  $\beta$ -catenin and increased NF- $\kappa$ B activity. However, these changes were not observed when IK cells were subjected to radiation. Then we have investigated the molecular mechanisms involved in conferring hypoxia induced cell death resistance. We noticed that hypoxia activates not only canonical NF- $\kappa$ B molecular pathway but also the alternative one. After characterizing the kinases involved in the activation of these pathways we found that both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are necessary to RelA (p65) and p100 accumulation whereas p52 processing is IKK $\alpha$  dependent.

Second, we identified ANXA2 as a predictive biomarker of recurrent disease in EC. Our results showed that ANXA2 plays a role in promoting metastasis in EC and is a predictive biomarker of recurrent disease also among low grade, stage I EC.

Finally, given that histological typing is difficult in some high grade or mixed endometrioid- non endometrioid EC, we have assessed an internally and externally 9-biomarker signature to predict histological type in EC. In addition, according to our results, endometrioid and serous components of mixed carcinomas have mixed immunohistochemical features suggesting they are molecularly ambiguous, regardless of the morfologic appearance of each of them.



## **Abreviaciones**

---



## **ABREVIACIONES**

**ARID1A** AT rich interactive domain 1A

**APC** Adenomatous Polyposis Coli

**ATM** Ataxia Telangiectasia Mutated

**ATR** AT-Related Kinase

**ATRIP** ATR Interacting Protein

**BAD** Bcl-2 Associated Death promoter

**BID** BH3 Interacting Domain death agonist

**BRCA** Breast Cancer

**CCC** Clear Cell Carcinoma

**CDK4** Cyclin-Dependent Kinase 4

**CEA** Carcinoembryonic Antigen

**Chk** Checkpoint proteins

**CK2** Casein Kinase 2

**CKAP2** Cytoskeleton-Associated protein 2

**CTC** Circulating Tumor Cells

**CSC** Cancer Stem Cells

**DD** Death Domain

**DDR** DNA Damage Response

**DNA** Deoxyribonucleic Acid

**DNA-PKcs** DNA-Dependent Protein Kinase catalytic subunit

**DISC** Death-Inducing Signalling Complex

**DNMT** DNA Methyltransferases

**DSBs** Double-Strand Breaks

**EC** Endometrial Carcinoma

**EEC** Endometrioid Endometrial Carcinoma

**EGFR** Epidermal Growth Factor Receptor

**ER** Estrogen Receptor

**FIGO** International Federation of Gynaecology and Obstetrics

**FLIP** FLICE Inhibitory Protein

**FOLR1** Folate Receptor-1

**GDP** Guanosin Diphosphate

**G** Grau histològic

**GTP** Guanosin Triphosphate

**GOG** Gynecologic Oncology Group

**GNRH** Gonadotropin-releasing hormone

**GSK-3 $\beta$**  Glycogen Synthase Kinase-3 beta

**HIF** Hypoxia Inducible Factor

**HNPCC** Hereditary Nonpoliposis Colorectal Cancer

**HMGA2** High Mobility Group AT-hook 2

**HNF1 $\beta$**  Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$

**HSP** Heat Shock Proteins

**IGF-II** Insulin-like Growth Factor II

**IAP** Inhibitor of Apoptosis Protein

**IHQ** Immunohistoquímica

**IK** Ishikawa

**IKKs** I $\kappa$ B Kinases

**IMP/IGF2BP** insulin-like growth factor II messenger RNA binding protein

**IRIF** Ionizing Radiation Induced "Foci"

**MAPK** Mitogen Activated Protein Kinase

**MI** Microsatellite instability

**MLH** MutL Homolog

**MSH** MutS homolog

**MMMT** Malignant Mixt Mullerian Tumour

**MMP7** Matrix Metalloproteinases 7

**NEEC** Non Endometrioid Endometrial Carcinoma

**NF- $\kappa$ B** Nuclear Factor- $\kappa$ B

**NIK** NF- $\kappa$ B Inducing Kinase

**NRF2** Erythroid-E2-related factor 2

**PARP** Poly (ADP-ribose) polymerase

**PCR** Polymerase Chain Reaction

**PDGFR** Platelet-derived Growth Factor Receptor

**PKD1** phosphatidylinositol-dependent kinase 1

**PH** pleckstrin-homology

**PI3K** phosphatidylinositol 3-kinase

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

**PIP2** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

**PIP3** Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

**PMS** Postmeiotic Segregation increased

**POLE** Polymerase  $\epsilon$

**PR** Progesterone Receptor

**PTEN** Phosphatase and TENsin homologue

**PIP3** Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

**PIP3** Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

**PUMA** P53 Upregulated Modulator of Apoptosis

**Rb** Retinoblastome

**RT** Radioterapia

**RTK** Receptor Tyrosine kinase

**SC** Serous Carcinoma

**SCE** Serous Carcinoma of the Endometrium

**SH groups** SulfHydryl groups

**TGF- $\beta$**  Tumor Growth Factor-  $\beta$

**TMA** Tissue Micro Array

**TNM** Tumor Node Metastasis

**TNF- $\alpha$**  Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor

**VEGFR** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor









# ÍNDEX

<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>VII</b>
-------------------------	------------

<b>RESUM .....</b>	<b>XI</b>
--------------------	-----------

<b>ABREVIACIONS .....</b>	<b>XIX</b>
---------------------------	------------

<b>1 INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>7</b>
----------------------------	----------

1.1	L'úter.....	7
1.2	El càncer d'endometri .....	10
1.3	Incidència.....	10
1.4	Classificació del carcinoma d'endometri.....	11
1.5	Factors de risc associats al càncer d'endometri .....	12
1.6	Histologia dels tumors epitelials .....	13
	• Adenocarcinoma endometriode.....	13
	• Adenocarcinoma serós .....	14
	• Adenocarcinoma de cèl·lules clares .....	14
	• Adenocarcinoma mixt .....	15
1.7	Histologia del Tumor Müllerià Mixt Maligne.....	15
1.8	Característiques clíniques .....	16
1.9	Estadiatge .....	16
1.10	Grau histològic .....	19
1.11	El carcinoma d'endometri recurrent.....	20
1.12	Biologia molecular del càncer .....	20
	• Els oncogens.....	21
	• Els gens supressors tumorals.....	22
	• Proteïnes que regulen l'apoptosi.....	23
	• Reparació del DNA.....	25
1.13	Alteracions moleculars del càncer d'endometri .....	25
	• Alteracions moleculars dels carcinomes endometrioides .....	28
	• Alteracions moleculars dels carcinomes no endometrioides .....	32
	• Gens implicats en la resistència a l'apoptosi en el càncer d'endometri .....	37
	• Altres gens implicats en la progressió del càncer d'endometri .....	40
1.14	Hipòxia i càncer .....	41
1.15	Tractament .....	43
	• La cirurgia .....	43
	• La radioteràpia.....	44
	• Inducció de mort cel·lular per radioteràpia (RT) .....	45
	• La quimioteràpia .....	48
	• L'hormonoteràpia .....	49
1.16	Teràpies dirigides contra el càncer d'endometri.....	50

1.17	Anàlisi de l'expressió de les proteïnes relacionades amb el EC .....	54
	• La Immunohistoquímica .....	54
	• Arrays Matricials de teixit (Tissue Micro Arrays) .....	55
<b>2</b>	<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>	<b>59</b>
2.1	Hipòtesi .....	59
2.2	Objectius.....	60
	• Objectiu 1 .....	60
	• Objectiu 2 .....	60
<b>3</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>63</b>
3.1	Objectiu 1 A .....	63
	Estudi de les alteracions del CE relacionades amb la hipòxia i amb l'adaptació a la radiació .....	63
3.2	Objectiu 1B .....	79
	Estudi del paper de les vies de senyalització que permeten al EC adaptar-se a la hipòxia .....	79
3.3	Objectiu 1C .....	965
	Estudi del valor d'ANXA2 com a marcador predictiu de EC recurrent .....	965
3.4	Objectiu 2 .....	109
	Determinació d'una firma molecular de diversos marcadors immunohistoquímics que permeti identificar correctament els EEC grau I, II, III, els SCE i els mixtes EEC-SCE per tal que millori l'acord interobservador. ....	109
<b>4</b>	<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>121</b>
4.1	Diverses proteïnes estan implicades en la resistència a la radiació en el càncer d'endometri.....	121
4.2	La hipòxia juga un paper important en la resistència a la radioteràpia.....	126
4.3	La resistència a la hipòxia implica activació de les dues vies de senyalització NF- $\kappa$ B (canònica i alternativa) .....	127
4.4	Annexina A2 és un marcador predictiu de malaltia recurrent en el càncer d'endometri.....	131
4.5	Una firma molecular permet predir el tipus histològic en el carcinoma d'endometri mitjançant immunohistoquímica.....	134
4.6	La tecnologia dels TMA i la immunohistoquímica són eines potencials per a l'estudi del càncer d'endometri.....	137
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>ANNEX .....</b>	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>151</b>

**Introducció**

---



# 1 INTRODUCCIÓ

## 1.1 L'úter

És un òrgan muscular, de parets gruixudes i localitzat a la pelvis entre la bufeta i el recte, es considera que està format per un *fundus*, un *corpus* o cos i un *cèrvix* o coll.

Principalment distingim el miometri, muscular i gruixut (envoltat per una serosa i/o adventícia) i l'endometri, una capa esponjosa i mucosa (Figura 1). L'úter està gairebé del tot cobert pel peritoneu.

Les parets de l'úter o miometri estan formades principalment per fibres de múscul llis i teixit fibrós. També hi trobem teixit elàstic, vasos sanguinis, limfàtics i nervis. El miometri augmenta molt durant l'embaràs, proporciona protecció al fetus i és un mecanisme per a l'expulsió d'aquest en el moment del part.

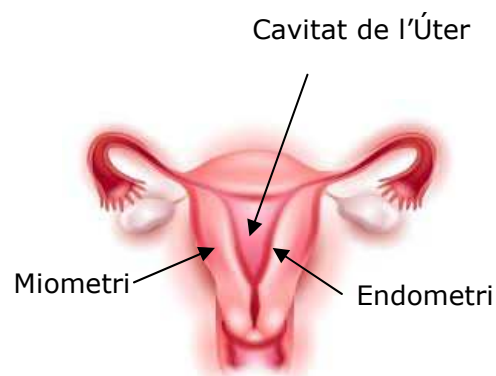


Figura 1: Esquema de l'Úter

**L'Endometri**, la membrana mucosa que encercla la cavitat uterina, té un gruix d'uns 2 mil·límetres aproximadament. Està subdividit en tres capes diferents, des del punt de vista histològic i funcional. La capa més profunda o capa basal, l'estrat basal, adjacent al miometri, és el que sofreix els canvis menys dramàtics durant el cicle menstrual i no es descama durant la menstruació. L'àmplia zona intermitja es caracteritza per la presència d'un estroma d'aspecte esponjós que es denomina estrat esponjós. La capa superficial, més prima, que té un estroma d'aspecte compacte, es denomina estrat compacte. Les capes compacta i esponjosa presenten canvis durant tot el cicle i es descamen durant la menstruació; d'aquí que se les conegui a les dues, conjuntament, com l'estrat funcional. Aquest consisteix en un epitelí de superfície, invaginacions tubulars (glàndules) i teixit



## Introducció

connectiu en l'estroma inter glandular. La capa funcional varia en gruix i passa per un seguit de fases durant el cicle menstrual. L'epiteli consisteix en una capa de cèl·lules epitelials sobre una membrana basal; les cèl·lules són columnars i ciliades (Figura 2).

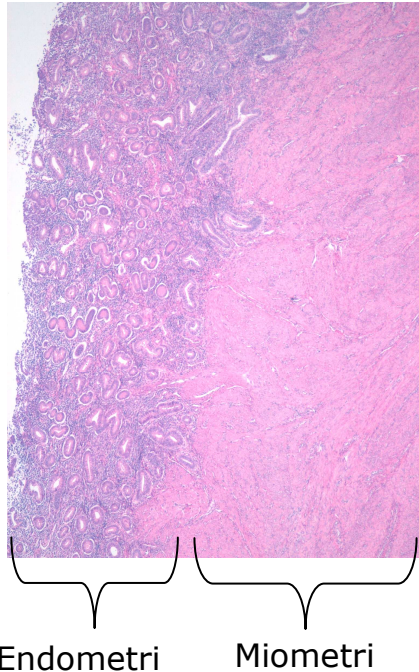


Figura 2: Tall histològic d'un endometri en fase proliferativa. (H&E 10X)

El cicle menstrual està íntimament relacionat amb el cicle ovàric. L'endometri sofreix canvis cíclics hormonalment modulats. Els tres estadis de l'endometri són els següents:

- **Fase proliferativa:** la fase proliferativa es iniciada i mantinguda per la producció progressiva d'estrògens que té lloc des de que els fol·licles ovàrics inicien la maduració fins a l'ovulació sota la influència de les hormones gonadotròfiques de la glàndula pituïtària (Hormona Estimulant del Fol·licle (FSH) al principi de la fase fol·licular i Hormona Luteïnitzant (LH) en el moment de l'ovulació). Durant la fase proliferativa la superfície de l'endometri es reepitelitza; les glàndules tubulars simples comencen a proliferar fins a formar nombroses glàndules que comencen a segregar en el moment de l'ovulació (les cèl·lules epitelials de les glàndules en formació presenten activitat mitòtica). Els elements del teixit connectiu i l'aportació vascular es reestableixen, és a dir, l'estroma endometrial prolifera fins a formar un teixit de suport ricament vascularitzat. En el moment de l'ovulació es produeix l'extrusió de l'òcit

secundari coincident amb el pic de concentració de LH. A l'òvari les restes del fol·licle madur (*fol·licle de Graff*) formen el que es coneix com a *cos luti* constituït per cèl·lules de la granulosa i de la teca i per estroma vascular.

- **Fase secretora:** l'alliberació de progesterona pel *cos luti*, després de l'ovulació, posa en marxa la producció d'una abundant i espessa secreció, rica en glicogen, en el lumen de les glàndules per la qual cosa augmenten de tamany i esdevenen tortuoses. A més els fibroblasts de l'estroma acumulen glicogen i greix. Al final de la fase secretora es produeix la regressió del *cos luti* que es tradueix en un descens dels nivells de LH, FSH i progesterona i l'inici de la fase menstrual.
- **Fase menstrual:** En el cas que no existeixi implantació, la producció de progesterona es inhibida per retroalimentació negativa. En absència d'aquesta, l'endometri no es pot mantenir i una gran part (la capa funcional de l'endometri) es desprèn durant el període hemorràgic denominat menstruació, mentre la capa basal es manté més o menys intacta (Figura 3).

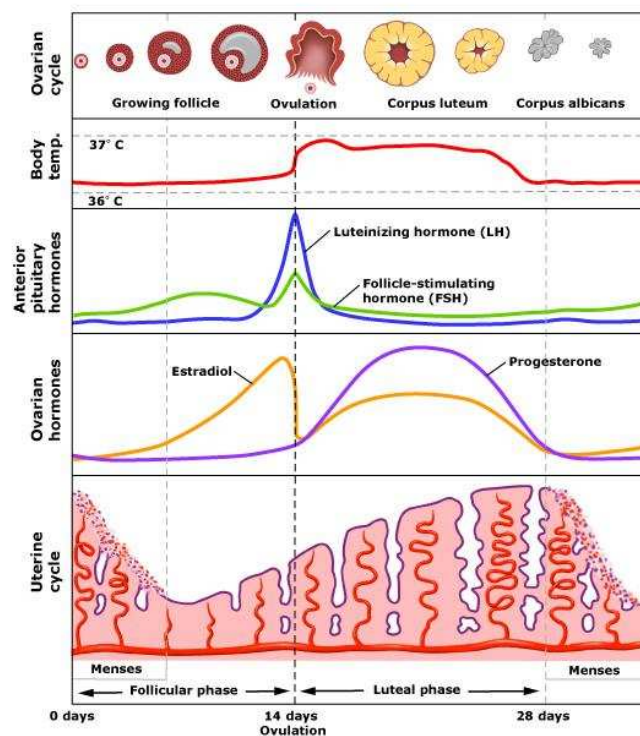


Figura 3: Esquema que mostra la distribució dels nivells hormonals al llarg del cicle menstrual.

## 1.2 El càncer d'endometri

El cos uterí representa el segon lloc més comú de malignitat del tracte genital femení. Aquestes neoplàsies es divideixen en epitelials, mesenquimals, tumors mixtes (epitelials i mesenquimals) i tumors trofoblàstics. Ens centrarem en l'estudi dels tumors epitelials i tumors mixtes ja que són els més comuns. La figura 4 mostra la imatge macroscòpica d'un EC.

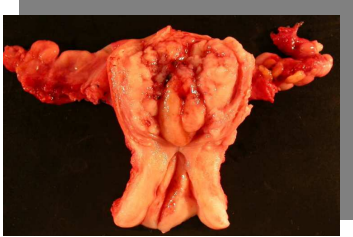


Figura 4: Imatge macroscòpica d'un Carcinoma d'Endometri.

## 1.3 Incidència

El EC és el tumor més comú del tracte genital femení, i el quart càncer més comú en dones dels països desenvolupats (20-25 casos per 100.000 habitants per any) darrera del càncer de mama, colon i pulmó (Figura 5). Aproximadament el 75% dels EC es localitzen a l'úter i s'associen a bon pronòstic; no obstant, un nombre significatiu de pacients presenten malaltia avançada o recurrent. Als Estats Units, el EC compta amb 6000 morts per any aproximadament (4-5 casos per 100.000 habitants).

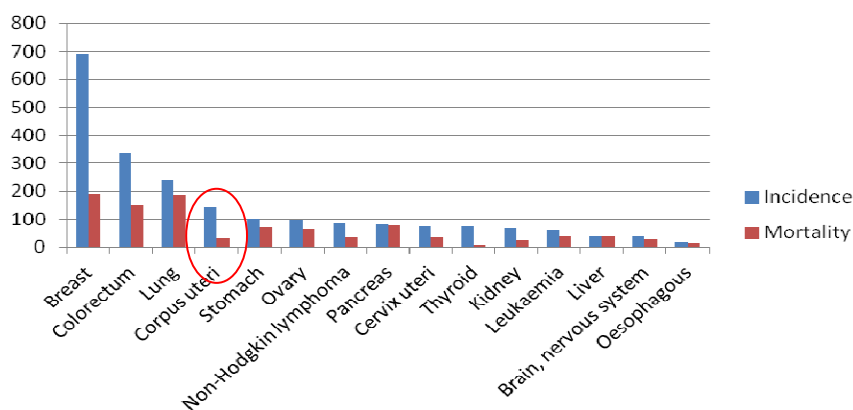


Figura 5: Nombres estimats (milers) de nous casos de càncer (incidència) i morts (mortalitat) en dones en regions desenvolupades l'any 2008. (Modificat de: Ferlay J; et al. *Int J Cancer*, 2010. 127(12): p. 2893-917) [1].

En els últims 30 anys hi ha hagut un increment en el nombre de casos diagnosticats d'adenocarcinoma d'endometri. L'increment, als anys 70-80, de l'ús d'estrògens amb la teràpia hormonal substitutiva durant la menopausa es considera un factor determinant tot i que també s'han de tenir en consideració altres causes.

La majoria de casos es diagnostiquen en dones post menopàusiques, entre 55-65 anys. El 25% es donen en dones pre menopàusiques i només el 5% es diagnostiquen en dones menors de 40 anys.

### **1.4 Classificació del carcinoma d'endometri**

El 1983 Bokhman i col·laboradors van descriure dos tipus principals de càncer d'endometri (EC, Endometrial Carcinoma) [2]. Els tumors tipus I (80-85% dels casos) i els tumors tipus II. Els tumors Tipus I estan relacionats amb estrògens i estan típicament representats per carcinomes endometrioides de baix grau (EEC, Endometrioid Endometrial Carcinoma). Els tumors tipus I es desenvolupen en dones peri menopàusiques i coexisteixen o estan precedits per hiperplàsia endometrial, particularment la hiperplàsia atípica i generalment estan associats a bon pronòstic (l'índex de supervivència a 5 anys és del 85-90%). Contràriament, els tumors tipus II (10-15% dels casos) o no-endometrioides (NEEC, Non Endometrioid Endometrial Carcinoma) són tumors molt agressius i no estan relacionats amb estimulació estrogènica (Taula 1). Els tumors tipus II normalment es desenvolupen en dones d'edat avançada, sorgeixen ocasionalment de pòlips endometrials o d'endometris atròfics i estan associats a mal pronòstic (els índexs de supervivència a 5 anys varien del 30 al 70%). Els NEEC inclouen principalment el carcinoma serós (SCE, Serous Carcinoma of the Endometrium) que és el més comú, el carcinoma de cèl·lules clares (CCC, Clear Cell Carcinoma) i l'adenocarcinoma mixt endometrioid-no endometrioid.

El carcinosarcoma o tumor müllerià mixt maligne (MMMT, Malignant Mixt Mullerian Tumour) s'ha inclòs majoritàriament en el grup de carcinomes tipus II, tot i que estan constituïts per un component d'origen epitelial i un component mesenquimal.

	<b>Tipus I</b>	<b>Tipus II</b>
<b>Edat</b>	<b>Pre i peri-menopàusia</b>	<b>Post-menopàusia</b>
Relació amb Estrògens	Present	Absent
Lesió precursora-Hiperplàsia	Present	Absent
Grau	Baix	Alt
Invasió miometrial	Mínima	Profunda
Subtipus específics	Carcinoma Endometriode	Carcinoma No-Endometriode
Comportament	Estable	Progressiu

Taula 1: Característiques clíniques i patològiques del Carcinoma d'Endometri (Tipus I i II).

### 1.5 Factors de risc associats al càncer d'endometri

Les pacients amb càncer endometrial tipus I freqüentment són obeses, diabètiques, nul·líparas, hipertenses o tenen una menopausa tardana. L'augment en l'ús del tamoxifè en el tractament del càncer de mama també ha estat associat a un increment del risc de patir càncer d'endometri, tot i que no hi ha un acord entre els diferents estudis. Per altra banda, les pacients amb un gran nombre de parts, edat avançada del primer part i una "vida menstrual" curta tenen un risc disminuït de càncer d'endometri post menopàusic, cosa que dona suport al paper protector de la progesterona en el context hormonal de la malaltia. L'estimulació estrogènica és la força impulsora d'aquest grup de tumors. Això pot ser el resultat de cicles anovulatoris en el període menopàusic. L'ús d'estrògens com a teràpia hormonal de substitució en dones grans és també un factor de predisposició per al desenvolupament del càncer d'endometri. En les pacients amb tumors tipus II, l'obesitat representa un factor de risc menys important. No ho és en canvi, la multi paritat, la raça, o el càncer de mama amb alteracions dels gens BRCA (Breast Cancer) (Taula 2).

<b>Tumors tipus I</b>	<b>Tumors tipus II</b>
Obesitat	Obesitat (però en menys intensitat)
Tamoxifè	
Nuliparitat	Multiparitat
Diabetis Melitus	Raça negra
Hipertensió arterial	Càncer de mama i mutacions en els gens BRCA (especialment SCE)
Familiar de primer grau amb EC	

Taula 2: Factors de risc associats al EC.

## 1.6 Histologia dels tumors epitelials

Els tumors epitelials (carcinomes) són els més freqüents. Tendeixen a formar estructures cohesives d'acord amb el seu grau de diferenciació i presenten modificacions estructurals i funcionals semblants als epitelis normals. Un adenocarcinoma d'endometri conté glàndules que s'assemblen a les de l'endometri normal. La majoria dels carcinomes d'endometri son adenocarcinomes i, d'aquests el més comú és el tipus endometriode (80%).

- **Adenocarcinoma endometriode**

Representen un espectre de diferenciació histològica que va des d'un carcinoma molt ben diferenciat difícil de distingir de la hiperplàsia complexa amb atípia fins a tumors mínimament diferenciats que es poden confondre, no només amb el carcinoma indiferenciat sinó també amb varis sarcomes.

Una característica de l'adenocarcinoma endometriode és la presència d'estructures glandulars o villoglandulars (Figura 6). A mesura que la diferenciació glandular disminueix i es substituïda per níus sòlids es diu que el tumor es desdiferencia i per tant, es classifica com a menys diferenciat (grau més elevat). La invasió miometrial i les metàstasis a nòduls limfàtics són freqüents i com a conseqüència, els índexs de supervivència són més baixos.

Les proliferacions endometrials poden presentar una varietat de tipus cel·lulars diferenciats. Les variants del carcinoma endometriode són les següents: variant amb diferenciació escamosa, variant villoglandular, variant secretora i variant de cèl·lules ciliades [3].

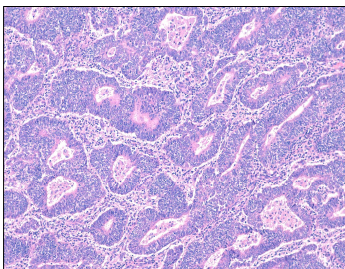


Figura 6: Adenocarcinoma Endometriode. H&E. 200X

- **Adenocarcinoma serós**

Tipifica l'anomenat carcinoma d'endometri tipus II. Es caracteritza per un patró de papil·les complex i es diferencia del tipus I per la falta d'associació amb l'hiperestrogenisme exogen o endogen, la falta d'associació amb la hiperplàsia endometrial i el seu comportament agressiu. Les cèl·lules i els nuclis són generalment ovalats i no presenten orientació perpendicular a la membrana basal. Els nuclis estan poc diferenciats, en situació apical i amb macro nuclèols eosinofílics. Les mitosis, les cèl·lules multi nucleades i els cossos de psammoma estan bastant presents (Figura 7). Està considerat un carcinoma d'alt grau per definició [3].

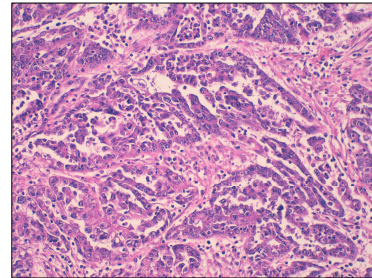


Figura 7: Adenocarcinoma Serós.  
H&E. 200X

- **Adenocarcinoma de cèl·lules clares**

És l'altre tipus majoritari dins del grup de carcinomes de tipus II. És menys comú que el carcinoma serós (1-5%) però també es dona en una població de pacients predominantment grans. Sovint són diagnosticats en estadis clínics avançats. Histològicament, les cèl·lules contenen glicogen (d'aquí que els citoplasmes siguin clars), els nuclis són molt pleomòrfics i multi nucleats (Figura 8). Aquests tumors també es consideren d'alt grau, es diagnostiquen en estadis avançats i tenen mal pronòstic [3].

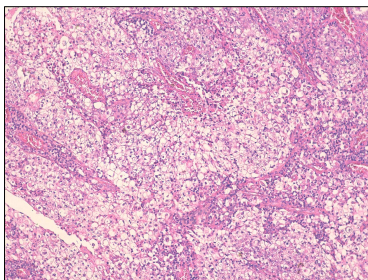


Figura 8: Adenocarcinoma de Cèl·lules Clares. H&E. 100X

- **Adenocarcinoma mixt**

Està compost per carcinoma tipus I (endometriode, incloses les seves variants) i carcinoma tipus II (serós o de cèl·lules clares) on el component minoritari té una presència de, com a mínim, el 5% (Figura 9). El pronòstic depèn de la proporció del component més agressiu [3].

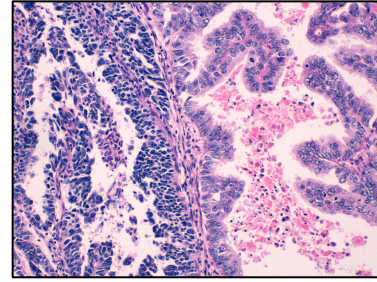


Figura 9: Adenocarcinoma mixt SCE-EEC. H&E. 200X

## 1.7 Histologia del Tumor Müllerià Mixt Maligne

El carcinosarcoma o tumor müllerià mixt maligne (MMMT, Malignant Mixt Mullerian Tumour) conté un patró bifàsic format per un component epitelial i un component mesenquimal o sarcoma. És una forma molt agressiva del càncer uterí i tot i que només constitueix un 3-4% de tots els tumors d'endometri, el percentatge de mortalitat associat amb aquest tipus de tumor és molt elevat. La taxa de supervivència a 5 anys varia d'un 5% a un 40%. El factor pronòstic més important és l'estadi tumoral. Aquests tumors els podem trobar en qualsevol òrgan del tracte genital femení però amb més freqüència els trobem a l'endometri.

En la gran majoria de carcinosarcomes tant el component epitelial com el mesenquimal són d'alt grau. El component sarcomatoide pot contenir elements heteròlegs malignes com cartílag o múscul esquelètic (Figura 10) [3].

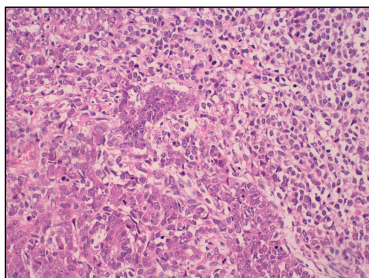


Figura 10: Tumor mixt epitelial i mesenquimal. H&E. 200X

No està clar si s'inicia amb un carcinoma que sofreix transformació sarcomatoide o a partir d'un sarcoma que sofreix diferenciació epitelial. Tot i que es classifica com un tumor mixt epitelial i mesenquimal, estudis moleculars i immunohistoquímics donen suport a la



## Introducció

inclusió d'aquest en el grup de tumors epitelials malgrat que té pitjor pronòstic que la resta de neoplàsies epitelials.

### **1.8 Característiques clíniques**

La majoria de casos de EC debuten clínicament amb un sagnat uterí anormal. Degut al fet que la majoria d'aquestes lesions es donen en dones post menopàusiques, aproximadament als 60 anys d'edat, la forma més comuna de presentació és el sagnat post menopàusic, tot i que en edats més joves el signe clínic més freqüent és la menor metrorràgia. No obstant, en mostres que s'envien al Servei d'Anatomia Patològica per altres raons (com per exemple, biòpsia endometrial per infertilitat o histerectomia per prolapse uterí), el carcinoma d'endometri i les lesions relacionades també poden ser troballes incidentals.

### **1.9 Estadiatge**

Després de la cirurgia es realitza l'estadiatge patològic. Juntament amb el grau histològic és el factor pronòstic més important.

La federació internacional de Ginecologia i Obstetrícia (FIGO, International Federation of Gynaecology and Obstetrics) proposa el següent sistema d'estadiatge per al carcinoma d'endometri la finalitat del qual és la de proporcionar una terminologia uniforme per a la millor comunicació entre els professionals de la salut i per a proporcionar un pronòstic apropiat als pacients la qual cosa resulta en una millora en el tractament.

L'estadiatge dels tumors uterins es basa en la classificació TNM (Tumor Node Metastasis)/FIGO. L'any 1998 es va passar d'un sistema d'estadiatge basat en l'examen clínic a un sistema quirúrgic en el qual es distingien 4 estadis diferents segons la localització del tumor. En l'estadi I les lesions estaven limitades a l'úter, en l'estadi II es descrivia una invasió local de la neoplàsia i aquesta afectava òrgans o estructures adjacents a l'úter. L'estadi III indicava una expansió local i/o regional i l'estadi IV indicava invasió de la bufeta i/o mucosa intestinal i/o metàstasis a distància. En l'actualitat (2009) s'han produït una sèrie de canvis en el sistema d'estadiatge de la FIGO de 1998. La classificació actual basada en aquestes modificacions es mostra en la taula següent (Taula 3).

<b>Estadis FIGO</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	
0	Tis	N0	M0	Tumor <i>in situ</i>
IA	T1a	N0	M0	Tumor limitat a l'úter, no o <1/2 invasió miometrial
IB	T1b	N0	M0	Tumor limitat a l'úter, >1/2 invasió miometrial
II	T2	N0	M0	Invasió de l'estroma cervical, però no més enllà de l'úter
IIIA	T3a	N0	M0	El tumor invaeix serosa o annexes
IIIB	T3b	N0	M0	Implicació de la vagina o parametris
IIIC1	T1-T3	N1	M0	Ganglis pèlvics implicats
IIIC2	T1-T3	N1	M0	Implicació Para-aòrtica
IVA	T4	Qualsevol N	M0	El tumor invaeix la bufeta i/o la mucosa intestinal
IVB	Qualsevol T	Qualsevol N	M1	Metàstasi a distància que inclou metàstasi abdominal i/o ganglis limfàtics inguinals

Taula 3: Classificació TNM/FIGO dels tumors no trofoblàstics del cos uterí. Agrupament d'estadis del EC, 2009.

Les modificacions respecte la classificació del 1998 es resumeixen a continuació. L'estadi IA (infiltració miometrial <50% ) unifica els antics estadis IA i IB, l'estadi II ara equival a l'antic estadi IIB (infiltració de l'estroma cervical ) i finalment, l'estadi III actualment es divideix en IIIC1: Adenopaties pèlviques (+) i IIIC2: Adenopaties paraòrtiques (+).

## Introducció

L'afectació dels ganglis regionals i la determinació de les metàstasis ajuda a establir les opcions de tractament (Taula 4).

N	Ganglis limfàtics regionals
NX	No es poden determinar els ganglis limfàtics regionals
N0	No metàstasis als ganglis limfàtics regionals
N1	Metàstasis als ganglis limfàtics regionals
M	Metàstasis a distància
MX	No es poden determinar les metàstasis
M0	Absència de metàstasis a distància
M1	Metàstasis a distància

Taula 4: Estadiatge dels ganglis limfàtics regionals i metàstasis a distància.

L'estadiatge, d'acord amb la FIGO és el paràmetre de pronòstic més robust pels pacients amb EC. Així, la supervivència lliure de malaltia als 5 anys és d'un 95.4 % pels estadis IB (invasió de menys de la meitat del gruix miometrial), i d'un 75 % pels estadis IC (invasió de més de la meitat del gruix miometrial). Aquests valors estan basats en l'antic estadiatge de la FIGO (1998) i són els que s'han utilitzat en la literatura majoritàriament. La taula següent (Taula 5) mostra la supervivència a 5 anys de la resta d'estadis del EC d'acord amb el tipus histològic.

Estadi FIGO	Supervivència als 5 anys		
	EEC	SCE	CCC
I	95%	74%	88%
II	86%	56%	67%
III	67%	33%	48%
IV	37%	18%	18%

Taula 5: Pronòstic del càncer d'endometri. Supervivència als 5 anys segons estadi. Diferències entre EEC, SCE I CCC. (In SEER Survival Monograph: cancer survival among adults US, 1988-2001)

## 1.10 Grau histològic

El grau histològic (G), anomenat també diferenciació, es refereix a la semblança o no que tenen les cèl·lules tumorals a les cèl·lules normals del teixit en qüestió. Per tal de determinar el grau d'un tumor es consideren diversos factors que inclouen l'estructura i el patró de creixement de les cèl·lules. El grau nuclear es refereix al tamany i forma del nucli de les cèl·lules tumorals i al percentatge de cèl·lules del tumor que s'estan dividint.

Els adenocarcinomes no endometrioides (serós i cèl·lules clares) es consideren d'alt grau per definició.

En el sistema de gradació de la FIGO/ISGP de 1988, la determinació del grau en l'adenocarcinoma endometriode d'endometri es basa principalment en característiques arquitecturals i es subdivideix en els següents grups (Taula 6):

<b>Grau 1</b>	Ben diferenciat. Carcinomes en els que el patró de creixement sòlid (glandular, no morular i no escamós) és inferior al 5%.
<b>Grau 2</b>	Moderadament diferenciat. Carcinomes en els que el patró de creixement sòlid (glandular, no morular i no escamós) està comprés entre el 6 i el 50%.
<b>Grau 3</b>	Pobrement diferenciat o indiferenciat. Carcinomes en els que el patró de creixement sòlid (no morular i no escamós) és superior al 50%.

Taula 6: Grau histològic.

Cal tenir present que el grau pot augmentar en una unitat si s'observen nuclis notablement engrandits amb nuclèols prominents.

Per consegüent, el coneixement dels graus nuclears [4] té sentit per augmentar o mantenir el grau tal i com s'ha definit anteriorment (Taula 7).

<b>Grau nuclear 1</b>	Carcinomes en què les cèl·lules presenten nuclis ovalats amb la cromatina regularment distribuïda.
<b>Grau nuclear 2</b>	Carcinomes en què les cèl·lules presenten nuclis que no corresponen ni al grau 1 ni al grau 3.
<b>Grau nuclear 3</b>	Carcinomes en què les cèl·lules presenten nuclis pleomòrfics, engrandits amb una cromatina distribuïda irregularment de grànuls toscos i macro nuclèols eosinofílics.

Taula 7: Grau nuclear.

## Introducció

L'índex de supervivència relativa a 5 anys és del 94% per als pacients amb tumors de grau 1 i disminueix a un 84% i un 72% per als pacients amb tumors de grau 2 i grau 3 respectivament.

### **1.11 El carcinoma d'endometri recurrent**

Una recidiva és la reaparició del tumor maligne després d'un període més o menys llarg d'absència de malaltia. Els factors que s'han associat a un risc augmentat de malaltia recurrent en els EC amb estadi inicial (I) són el tipus histològic, la histologia G3, la invasió miometrial  $\geq 50\%$ , la invasió de l'espai limfovacular, les metàstasis en ganglis limfàtics i el diàmetre tumoral  $\geq 2$  cm.

Els SCE són tumors més agressius i per tant presenten risc més elevat de patir malaltia recurrent (el 50 % dels SCE recidiven); en canvi, només un 20% dels EEC recidiven. Les recurrències poden ser locals i/o distants (abdominals i toràciques). El EC recurrent es limita a la pelvis en el 50% dels pacients i, en aproximadament la meitat d'aquests el tumor es troba localitzat a la vagina. No obstant, la radiació pot afectar el patró de recidiva, ja que els pacients que reben teràpies de radiació presenten menys recurrències a nivell local. En un assaig clínic fase III amb pacients EC de risc intermedi la incidència de recurrència global acumulada en dos anys era d'un 12%, comparat amb el 3% dels pacients que van rebre radioteràpia [5].

Els mecanismes moleculars involucrats en les recidives poden incloure alteracions en els gens responsables de la progressió tumoral (invasió, formació tumoral distant i resistència a la hipòxia), però també altres associats amb la resistència a la radiació.

### **1.12 Biologia molecular del càncer**

La carcinogènesi és un procés de múltiples passos, tant a nivell fenotípic com genètic, que resulten de l'acumulació de varies alteracions gèniques i epigenètiques. Un tumor es forma a partir de l'expansió clonal d'una cèl·lula precursora que sofreix dany genètic; tot i això, en el moment en que els tumors es fan clínicament evidents, les seves cèl·lules són altament heterogènies. Davant la gran diversitat de cèl·lules canceroses, Robert

Weinberg i Douglas Hanahan van sistematitzar sis característiques comunes que defineixen les cèl·lules tumorals [6]. 1) activació de senyals de proliferació; 2) insensibilitat a senyals antiproliferatius; 3) evasió de la mort cel·lular programada o apoptosi; 4) potencial replicatiu il·limitat; 5) alta capacitat angiogènica, i 6) invasió de teixits pròxims i metastasi en teixits llunyans. Posteriorment i com a resultat de les noves dades, n'hi han afegit unes quantes més, com evasió de l'atac immunològic, inestabilitat genòmica, inflamació o desregulació metabòlica [7].

Les principals dianes del dany genètic són quatre tipus de gens reguladors normals: els protooncogens, els gens supressors tumorals, els gens que regulen la mort cel·lular programada o apoptosi i els gens implicats en la reparació del DNA. Tots ells estan implicats en els processos anteriorment esmentats. El dany genètic que sofreixen aquests gens pot afectar tant a segments grans dels cromosomes com a petits grups de nucleòtids. Mutacions, delecions, amplificacions, canvis epigenètics, miRNAs i translocacions cromosòmiques que afecten aquests gens contribueixen a l'adquisició del fenotip tumoral o carcinogènesi [8].

- **Els oncogens**

Els gens que promouen el creixement de les cèl·lules normals s'anomenen protooncogens. Les mutacions que afecten aquests gens els converteixen en oncogens potencialment actius de forma constitutiva que estan implicats en el desenvolupament tumoral. Es caracteritzen per la capacitat que tenen de promoure el creixement cel·lular en absència de senyals promotores del creixement normals.

Els factors de creixement i els seus receptors, les proteïnes transductores de senyal, els factors de transcripció, les ciclines i les cinases dependents de ciclina en són alguns exemples.

Existeixen diversos mecanismes mitjançant els quals es pot produir l'activació dels protooncogens: l'amplificació gènica, les alteracions per mutacions, delecions, insercions i translocacions cromosòmiques [8].

La mutació puntual dels gens de la família RAS és l'anomalia aïllada més freqüent dels protooncogens en tumors humans (15-25%). Les proteïnes RAS (HRAS, KRAS, NRAS) normals estan unides a la cara citoplasmàtica de la membrana plasmàtica, a les membranes del reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. Es poden activar mitjançant la unió del factor de

## Introducció

creixement a receptors de la membrana plasmàtica. RAS inactiu (unit a GDP, Guanosine Diphosphate) canvia de conformació gràcies a l'intercanvi de GDP per GTP (GTP, Guanosine Triphosphate) i genera RAS actiu el qual estimula la cascada de la proteïna cinasa activada per mitogens (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase) que estimula la proliferació cel·lular [9] (Figura 11).

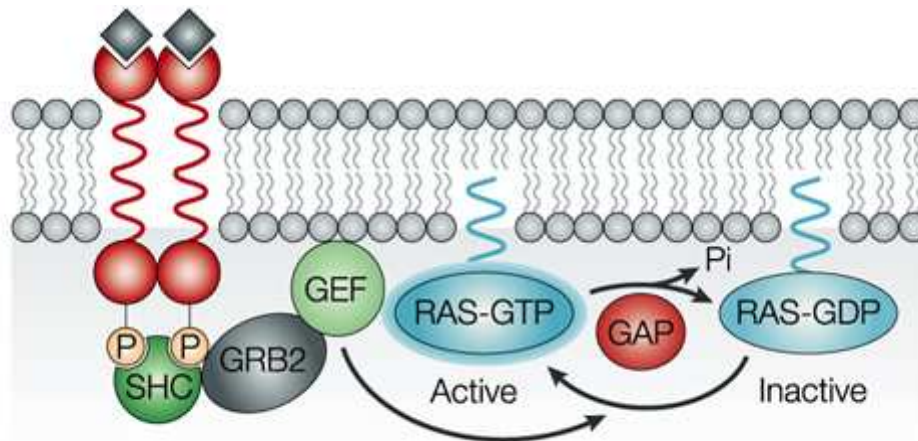


Figura 11: Model d'acció dels gens RAS. Un factor de creixement estimula el seu receptor i RAS inactiu s'activa fins a un estat unit a GTP. La proteïna RAS mutada estaria permanentment activada degut a la incapacitat per hidrolitzar la GTP, de manera que s'estimularia les cèl·lules de manera contínua sense cap desencadenant extern. (*Downward J; et al. Nat Rev Cancer, 2003. 3(1): p. 11-22*) [9].

El 19% dels càncers d'endometri presenten mutacions de *KRAS*, la majoria dels casos són endometrioides (81%). Les mutacions més freqüents afecten el codó 12 del gen *KRAS* (G12D (33%) i G12V (29%)) [10, 11].

- **Els gens supressors tumorals**

Els productes dels gens supressors tumorals apliquen frens a la proliferació cel·lular. La pèrdua de la seva funció i el fracàs en la inhibició del creixement contribueix en el procés de desregulació del cicle cel·lular i carcinogènesi. Les mutacions que es donen en els gens supressors de tumors són de pèrdua de funció i per això afecten els dos al·lels d'un gen. Les principals alteracions que s'observen i que inactiven la seva activitat funcional són delecions, mutacions sense sentit, mutacions que afecten el marc de lectura, insercions i mutacions

amb sentit erroni. El gen del retinoblastoma, *TP53*, gens de la via TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor-  $\beta$ ) i *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) entre altres, en són exemples [8].

*PTEN* és un dels gens supressors tumorals més freqüentment mutat en el EC (40%) [11, 12]. El seu mecanisme d'acció el veurem més endavant.

- **Proteïnes que regulen l'apoptosi**

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular necessari per evitar l'acumulació de cèl·lules amb mutacions. Existeixen dues vies diferents per activar l'apoptosi, la via intrínseca i la via extrínseca. La via extrínseca s'inicia amb Fas/CD95 i el seu lligand, FasL. La interacció entre Fas i el seu lligand dóna lloc a la formació del complex de senyalització inductor de mort (DISC, Death- Inducing Signalling Complex). El domini de mort (DD, Death Domain) intracel·lular atreu FADD (FADD, Fas Associated DD-containing protein) i aquesta recluta la procaspasa 8. L'activació autoproteolítica de la procaspasa 8 inicia la senyalització apoptòtica. La caspasa 8 activa la caspasa 3 executora, la qual pot trencar el DNA i altres substrats i causar la mort cel·lular. A més la caspasa 8 pot activar la proteïna BID (BID, BH3 Interacting Domain death agonist) i activar la via intrínseca. La via intrínseca pot ser activada per varis estímuls que condueixen a una permeabilització de la membrana mitocondrial i una alliberació del citocrom c. La integritat de la membrana està regulada per membres antiapoptòtics (BCL-2, BCL-XL) i proapoptòtics (BAX, BAK) de la família de proteïnes de Bcl-2. Les proteïnes BH3-*only* (BAD (BAD, Bcl-2 Associated Death promoter), BID I PUMA (PUMA, P53 Upregulated Modulator of Apoptosis)) regulen l'equilibri entre els membres pro i antiapoptòtics detectant els estímuls inductors de mort i promovent l'apoptosi. El citocrom c al citosol activa la caspasa 9 la qual pot activar les caspases executores de la mateixa manera que ho fa la caspasa 8 a la via extrínseca. Les caspases poden ser inhibides per una família de proteïnes anomenades proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP, Inhibitor of Apoptosis Protein) (Figura 12).

Les cèl·lules tumorals poden evadir l'apoptosi per varis mecanismes, alguns poden afectar directament a les proteïnes components de la via de l'apoptosi en si mateixa, com la sobreexpressió de FLIP (FLIP, FLICE Inhibitory Protein) o de BCL-2, o l'alteració de les Caspases, entre altres. Per altra banda, altres mecanismes poden resultar en la inhibició de l'apoptosi, com la pèrdua de detectors de la integritat genòmica, per exemple p53 [8].



## Introducció

P53 pot activar l'apoptosi en resposta al dany al DNA quan aquest és irreparable. No obstant, aproximadament el 50% dels càncers humans presenten alteracions del gen *TP53* i com a conseqüència, les cèl·lules amb p53 mutada són més resistents a l'apoptosi, poden reparar el dany del DNA i finalment promoure la supervivència [13]. Per altra banda, p53 mutada també pot inhibir els nivells de p53 *wild-type* [14].

FLIP es troba sobreexpressat en el EC i juga un paper en la resistència a l'apoptosi induïda per TRAIL [15]. S'ha vist que KSR1 regula la sensibilitat endometrial a l'apoptosi induïda per TRAIL regulant els nivells de FLIP [16]. Alguns autors suggereixen que C/EBPalpha o les seves oncoproteïnes activen els gens *BCL-2* i *FLIP* mitjançant la unió als seus promotors amb presència de NF- $\kappa$ B p50 [17].

Polimorfismes genètics en els gens de les Caspases poden afectar el risc de desenvolupar càncer mitjançant l'alteració dels nivells d'expressió i de les funcions d'aquests gens. En un estudi de Xu HL i col·laboradors [18] es van relacionar variants genètiques de caspasa 3 i caspasa 7 amb un risc augmentat de desenvolupar càncer d'endometri.

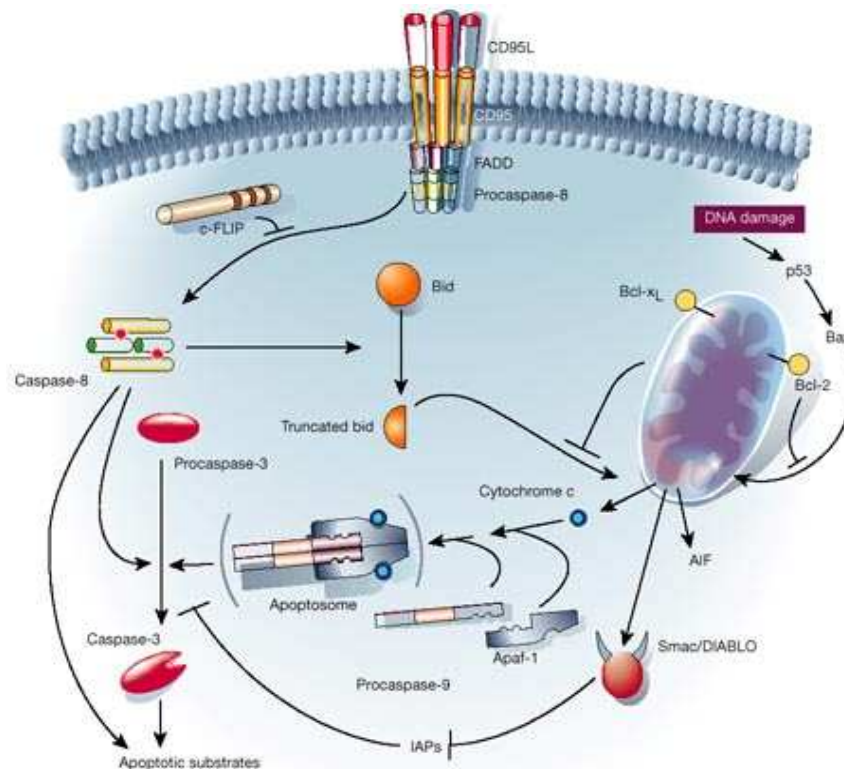


Figura 12: Mecanisme apoptòtic. (Ochoa E *Biología de sistemas: una mirada a lo más profundo de nuestro origen, evolución y funcionamiento*. Edu Cómputo A.C., UMSNH, ANUIES y SINED (2010).MX[19])

- **Reparació del DNA**

Diferenciem tres sistemes principals de reparació del DNA: la reparació dels errors d'aparellament on estan implicats gens com *MLH1* (MLH1, MutL Homolog 1), *MSH2* (MSH2, MutS Homolog 2), *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* (PMS1, Postmeiotic Segregation increased 1), *MLH3* i *PMS2*, la reparació de la escissió de nucleòtids i la reparació dels trencaments de doble cadena. La reparació dels trencaments bicatenaris del DNA engloba la fusió no homòloga d'extrems (NHEJ, Non-Homologous End Joining) que funciona sobretot en fase G1/S (abans de la replicació) i la recombinació homòloga (HR, Homologous Recombination) que teòricament actua en fase S/G2 quan ja hi ha dues cromàtides germanes, de manera que s'utilitza la doble cadena homòloga com a motlle per a la replicació. En la HR hi estan implicats gens com *BRCA1* (BRCA1, Breast Cancer 1) i *BRCA2*.

Defectes en els gens necessaris per la reparació de danys en el DNA poden conduir a un risc augmentat de desenvolupar càncer. Concretament, alteracions en els gens reparadors (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) donen lloc a la Inestabilitat de Microsatèl·lits (MI, Microsatellite Instability) la qual es troba en neoplàsies (colòniques, endometrials i altres) de pacients amb càncer de colon hereditari no polipòsic (HNPCC, Hereditary Nonpoliposis Colorectal Cancer) o Síndrome de Lynch però també es troba en el 25-30% dels EC esporàdics [20, 21].

### 1.13 Alteracions moleculars del càncer d'endometri

Les alteracions moleculars implicades en el desenvolupament dels EC tipus I o EEC són diferents de les del EC tipus II o NEEC [22-24].

EEC mostra inestabilitat de microsatèl·lits, mutacions en *PTEN*, *PIK3CA* (PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha), *K-RAS*, i *CTNNB1* [25]. En canvi, pel que fa als NEEC, els SCE es caracteritzen per presentar mutacions en p53, sobreexpressió de p16, inestabilitat cromosòmica i alteracions moleculars de E-cadherina i C-erbB2 [25, 26]. Els CCC presenten immunotinció positiva per HNF1 $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ ) [27], mutacions en *PIK3CA*, *PTEN* i *ARID1A* (ARID1A, AT rich interactive domain 1A) i pèrdua del producte proteic de *ARID1A*, BAF250a [28]. Aproximadament el 67% dels adenocarcinomes endometrioides són diploides mentre que només el 45% dels no endometrioides ho són. La immunotinció positiva de p53 es troba molt

## Introducció

sovint en els NEEC però ocasionalment la trobem als EEC, particularment en els tumors de grau III [29] (Taula 8).

En general, les principals alteracions característiques dels EEC (MI, mutacions en *PTEN*, *k-RAS*, *PIK3CA* i *CTNNB1*) no es troben en els NEEC. No obstant, la detecció ocasional d'aquestes alteracions moleculars en els NEEC indica que aquest es podria originar seguint dues vies diferents: (1) *de novo*, a través de mutacions de *TP53*, LOH en diversos *loci*, i altres alteracions que encara es desconeixen; o (2) mitjançant la desdiferenciació d'un EEC preexistent. Aquesta hipòtesi explicaria l'existència de carcinomes mixtes EEC-NEEC, i la presència de MI, així com alteracions en *PTEN*, *k-RAS* o  $\beta$ -catenina en els NEEC. D'acord amb això, els NEEC sorgits *de novo* (la situació més comuna) complirien les característiques clinicopatològiques i moleculars dels NEEC (serós papil·lar pur o morfologia de cèl·lules clares, edat avançada, absència d'estimulació estrogènica, falta d'hiperplàsia endometrial preexistent, mutacions de p53, absència de MI o mutacions de *PTEN*), mentre que el carcinoma desdiferenciat presentaria característiques superposades amb el EEC (morfologia mixta EEC-NEEC, edat de presentació anticipada, evidència d'estimulació estrogènica o hiperplàsia preexistent, coexistència de mutacions de *TP53*, MI, o mutacions de *PTEN*) [30].

	<b>Tipus I /Endometriode</b>	<b>Tipus II/No endometriode</b>
Inestabilitat de microsatèl·lits	20-40%	0-5%
Mutació de <i>PTEN</i>	30-50%	10%
Mutació de <i>k-RAS</i>	15-30%	0-5%
Mutació de <i>PIK3CA</i>	30%	5%
Mutació de $\beta$ - Catenina/ <i>CTNNB1</i>	25-40%	0-5%
Alteració de p53	10-20%	90%
Inactivació de p16	10%	40%
Inactivació de E-cadherina	10-20%	80-90%
Amplificació de <i>ERBB2</i>	29%	43%
Amplificació de Ciclina D1 ( <i>CCND1</i> ) i E ( <i>CCNE1</i> )	2-5%	26-42%

Taula 8: Principals alteracions del EC [22-24].

Recentment s'han utilitzat les tecnologies d'alta capacitat per a determinar l'expressió de gens, com per exemple els micro arrays de cDNA, per tal de definir les empremtes genètiques d'una gran varietat de càncers, entre ells el d'endometri [31-33]. Aquestes han demostrat que el perfil d'expressió dels EEC és diferent dels NEEC. S'ha vist que els gens que s'expressen de forma diferencial en els EEC són aquells relacionats amb la homeòstasi endometrial i que es coneix que estan regulats hormonalment durant el cicle menstrual mentre que els tumors tipus II solen sobreexpressar gens implicats en la regulació del punt de control del fus mitòtic, i associats amb aneuploidia i fenotip agressiu. Recentment s'han reclassificat els EC. Kandoth i col·laboradors (The Cancer Genome Atlas Research Network, TCGA) [34] van caracteritzar 373 EC mitjançant seqüenciació de DNA, seqüenciació de RNA, seqüenciació de miRNA, anàlisi de metilació del DNA i assaigs proteics. L'agrupació jeràrquica de les alteracions somàtiques del número de còpies va agrupar els casos en quatre grups. El clúster 1 contenia casos sense alteracions en el nombre de còpies i estava principalment format per EEC. Els clústers 2 i 3 contenien EEC però presentaven alteracions específiques com l'amplificació de *IGF1R* o de 1q. El clúster 4 contenia la majoria de SCE i carcinomes mixtes, però també un 12% de EEC (principalment grau 3) i presentaven moltes alteracions en el nombre de còpies. De la mateixa manera, l'anàlisi de seqüenciació de l'exoma distingia quatre grups de tumors: en general, els SCE i aproximadament el 25% dels EEC d'alt grau tenien moltes alteracions en el nombre de còpies, pocs canvis en la metilació del DNA, baixos nivells de ER/PR i mutacions de *TP53*. La majoria dels EEC tenien poques alteracions en el nombre de còpies o mutacions de *TP53* però freqüentment tenien mutacions de *PTEN*, *CTNNB1*, *PIKC3A*, *ARID1A*, *KRAS* i *ARID5B*. Un subgrup de EEC presentava un gran augment de la freqüència mutacional transversal i noves mutacions en punts calents o "hotspots" en *POLE* (*POLE*, Polymerase  $\epsilon$ ). Així doncs, es reclassifica el EC en quatre categories: POLE (ultramutats), MI (hipermutats), baix nombre de còpies i alt nombre de còpies (Figura 13). Aquesta reclassificació permetrà millorar el tractament adjuvant de les pacients amb EC agressiu [34].

## Introducció

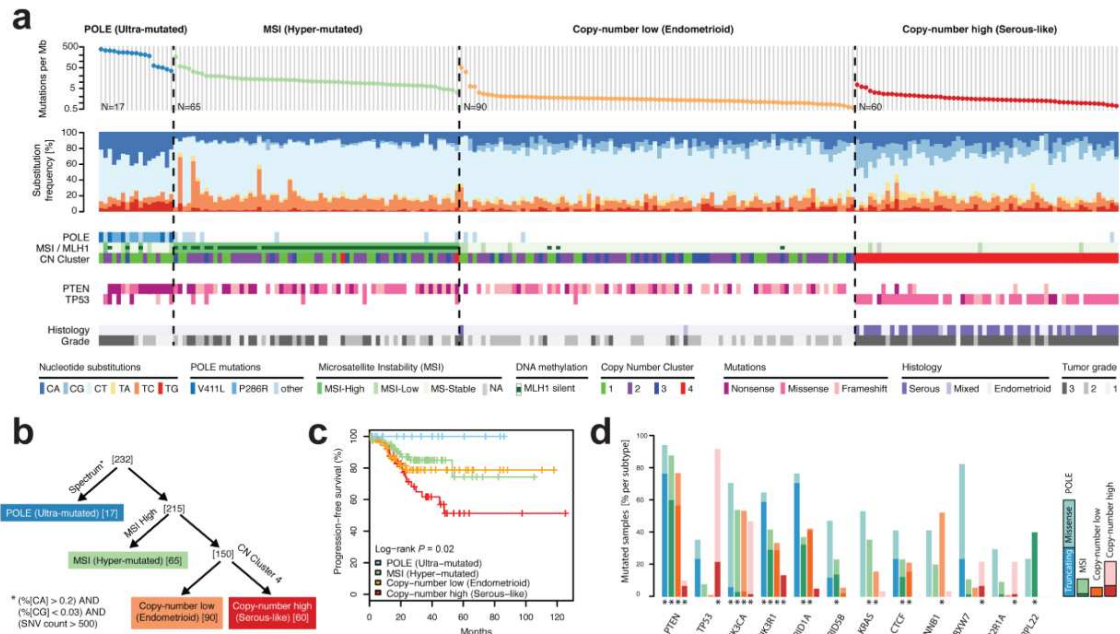


Figura 13: Espectre de mutacions en el EC. a) freqüències de mutació (eix vertical, panell superior) per cada tumor (eix horitzontal). Les substitucions de nucleòtids es mostren en el panell central amb una alta freqüència de canvis de C–A en les mostres amb mutacions de POLE. b) Els tumors es van classificar en 4 grups mitjançant 1) les freqüències i patrons de substitució de nucleòtids, 2) l'estat de MSI, i 3) el clúster del nombre de còpies. c) els tumors amb mutacions de POLE presenten, de manera significativa, millor supervivència lliure de progressió (PFS, Progression Free Survival) mentre que els tumors amb un alt nombre de còpies tenen el pitjor pronòstic. d) els gens mutats de manera recurrent són diferents en els quatre grups. Es mostren les freqüències de mutació de tots els gens que estaven mutats de manera significativa en almenys un dels grups. (MUSiC, FDR < 0.05, indicat amb asterisc).

(Kandoth et al., Nature 2013;497(7447):p. 67-73) [34].

### • Alteracions moleculars dels carcinomes endometrioides

#### Inestabilitat de microsatèl·lits (MI)

La pèrdua d'estabilitat genòmica té lloc a les primeres etapes del procés de tumorigènesi. Aquest fenomen contribueix a crear un ambient que permet que tinguin lloc les alteracions en gens clau en el control de la proliferació cel·lular, com els oncogenes i els gens supressors tumorals. Els microsatèl·lits són particularment susceptibles a errors en la replicació. La inestabilitat de microsatèl·lits és una situació en la qual la longitud d'un microsatèl·lit ha augmentat o ha disminuït, cosa que implica un canvi somàtic en el seu tamany. Els aparellaments incorrectes del DNA normalment tenen lloc durant la replicació,

però la majoria es rectificuen gràcies a la maquinària de reparació de la cèl·lula. Quan no es poden reparar els errors, s'adquireix la MI i es desenvolupa el tumor. La MI es troba en càncers (colònic, endometri i altres) de pacients amb càncer de colon hereditari no polipòsic (HNPCC, Hereditary Nonpoliposis Colorectal Cancer) o Síndrome de Lynch però també es troba en el 25-30% dels EC esporàdics. El EC és la segona neoplàsia més comuna en dones amb HNPCC. Aquests pacients tenen una mutació germinal en els gens *MLH-1*, *MSH-2*, *MSH-6* o *PMS-2* ("primer hit"), però el EC només es desenvolupa amb l'aparició de la deleció o mutació del segon al·lel de *MLH-1*, *MSH-2*, *MSH-6* o *PMS-2* ("segon hit"). Després de que tinguin lloc els dos "hits" el paper deficient en la reparació dels errors en el DNA per part d'aquests gens causa l'adquisició de la MI i el desenvolupament del tumor. En els EC esporàdics en canvi, la inactivació de *MLH-1* per hipermetilació del promotor és la causa principal de la deficiència en la reparació, la qual normalment té lloc en la lesió precursora (hiperplàsia atípica). Per tant, és un esdeveniment que té lloc en estadis inicials de la patogènia del EC.

La instauració de la MI, anomenat fenotip mutador, dona lloc a la subseqüent acumulació de vàries mutacions. Les repeticions en tàndem curtes, com els microsatèl·lits, com hem dit, són particularment susceptibles de sofrir alteracions però normalment estan localitzades en regions no codificants del DNA i la presència d'insercions o delecions no dona lloc a proteïnes anormals. No obstant, algunes repeticions en tàndem, com les repeticions de mononucleòtids, de vegades estan localitzades en la seqüència codificant de gens importants (*BAX*, *MSH3*, *MSH6*). Aquestes mutacions s'interpreten com a esdeveniments secundaris en la via del fenotip mutador en càncers amb MI, i probablement són els responsables de la progressió tumoral [20, 21, 35, 36].

### **PTEN**

La via PI3K (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT és una de les vies més freqüentment alterades en el EC [37]. Aproximadament el 80% dels EEC tenen una o més alteracions somàtiques que afecten aquesta via [38].

PTEN és un gen supressor tumoral localitzat al cromosoma 10q23.2 que codifica per una fosfatasa lipídica que antagonitza la via PI3K/AKT desfosforilant fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat (PIP3, Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate), el producte de PI3K. Aquest és un missatger important que regula la fosforilació de la proteïna AKT o proteïna cinasa B. La

## Introducció

disminució de l'activitat de PTEN dona lloc a un augment de la proliferació cel·lular i supervivència a través de la modulació de diferents vies moleculars (Figura 14).

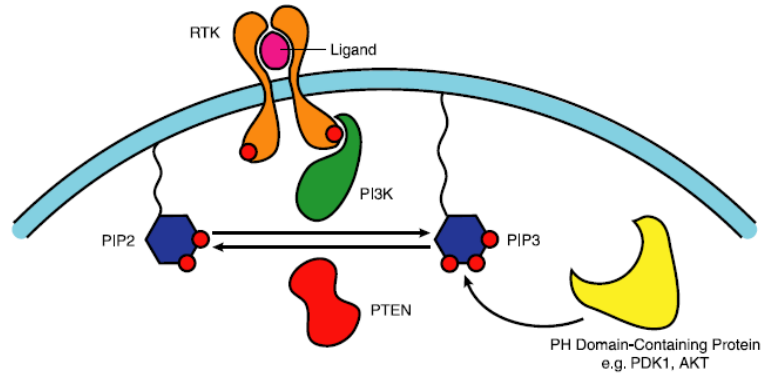


Figura 14: Activitat catalítica de PTEN. PTEN catalitza la defosforilació PIP3 a la posició D3 resultant en PIP2 (PIP2, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). PTEN antagonitza l'activitat fosfatidilinositol 3 cinasa estimulada pel receptor tirosina cinasa (RTK, Receptor Tyrosine kinase) que catalitza la producció de PIP3. Aquest fosfolípida permet el reclutament de molècules de senyalització a la membrana via dominis d'homologia plecstrina (PH, pleckstrin-homology) com per exemple PDK1 (PDK1, phosphatidylinositol-dependent kinase 1) i membres de la família AKT. (Chow L.M.; et al. *Cancer Lett*, 2006. 241(2): p. 184-96) [39].

*PTEN* està freqüentment alterat al EC. Pot estar inactivat per diferents mecanismes com mutacions puntuals, pèrdua d'heterozigotat (LOH, Loss Of Heterozigosity), hipermetilació del promotor, miRNAs, repressió transcripcional, interrupció de les xarxes de RNAs endògens competitiu o modificacions post traduccionals [40]. Com a gen supressor teòricament necessita alteracions en els dos al·lels per participar en el desenvolupament i la progressió tumoral. En primer lloc normalment es donen les mutacions puntuals, en canvi les delecions són característiques del segon "hit". No obstant, s'ha demostrat recentment que una alteració és suficient per inactivar PTEN i per tant participar en la tumorigènesi [41]. El 40% dels EC presenten LOH del cromosoma 10q23.2 i el 37-61% dels EEC tenen mutacions de PTEN [42, 43]. També s'han detectat mutacions d'aquest gen en hiperplàsies endometrials coexistent amb MI, cosa que suggereix que les mutacions de PTEN són un esdeveniment precoç en el EC [39] (Figura 15).

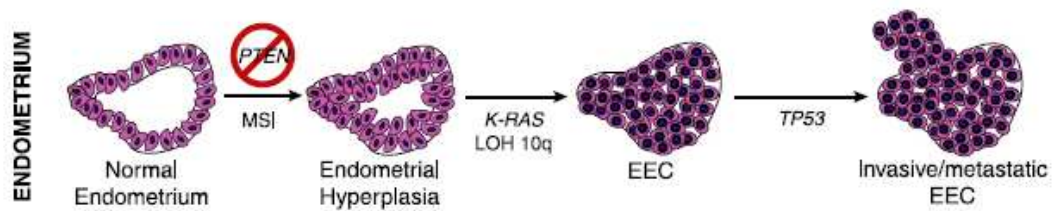


Figura 15: La hiperplàsia d'endometri presenta freqüentment inactivació de PTEN i en combinació amb MI inicia el procés neoplàsic donant lloc al EEC. (Modificat de: Chow L.M.; et al. *Cancer Lett*, 2006. 241(2): p. 184-96) [39].

### **β-catenina**

β-catenina (3p21) (*CTNNB1*) és un dels components principals de la unitat E-cadherina-catenina, important per a la diferenciació cel·lular i el manteniment de l'arquitectura dels teixits normals. També és important per la transducció de senyals.

β-catenina està involucrada en la via Wnt. La proteïna APC (APC, Adenomatosis Polyposis Coli) regula a la baixa els nivells de β-catenina col·laborant amb la cinasa glicogen sintasa (GSK-3b, Glycogen Synthase Kinase-3 beta) induint fosforilació dels residus de serina-threonina codificats a l'exó tres del gen *CTNNB1* i la seva degradació a través de la via d'ubiquitinització del proteasoma. Les mutacions a l'exó 3 de β-catenina donen lloc a una estabilització de la proteïna, acumulació citoplasmàtica i nuclear i participació en la transducció de senyals i l'activació transcripcional a través de la formació de complexos amb les proteïnes d'unió al DNA. Aquestes mutacions a l'exó 3 amb acumulació nuclear de β-catenina es troben en el 14-44% dels EC. Es creu que és un esdeveniment inicial en la gènesi dels tumors endometrials [44-47].

### **Els receptors hormonals**

En l'endometri els receptors d'estrògens (ER, Estrogen Receptor) i els receptors de progesterona (PR, Progesterone Receptor) s'expressen en la primera meitat del cicle menstrual i es deixen d'expressar en la fase lútea.

Històricament s'ha considerat que els estrògens promouen el càncer d'endometri mitjançant l'activació de la proliferació. Aquests es poden unir als receptors nuclears, promoure l'expressió d'altres gens i augmentar l'índex mutacional. No obstant, la seva expressió s'associa a bon pronòstic. Més del 95% dels EC expressen ER, en canvi el PR no sempre s'expressa. Els tumors ER+/PR- tendeixen a tenir pitjor pronòstic i no responen a les



## Introducció

teràpies amb progestàgens. Existeixen dues formes del Receptor d'Estrògens, la forma original, ER $\alpha$  (codificat al cromosoma 6) i ER $\beta$  (codificat al cromosoma 14) el qual s'ha identificat més recentment. Els dos receptors s'uneixen amb igual afinitat als estrògens i es coneix poc sobre els gens que estan regulats per ER $\beta$  en comparació amb ER $\alpha$ . Pel que fa al PR també existeixen dues isoformes, A i B, les dues codificades al cromosoma 11 i es creu que es necessiten les dues per a la diferenciació endometrial .

Els receptors de les hormones esteroidees, ER i PR, s'associen als carcinomes d'endometri tipus I i a la hiperplàsia d'endometri. Per altra banda, la seva pèrdua s'associa a una disminució de la supervivència global i a una disminució de la supervivència lliure de malaltia, histologia no endometriode, invasió miometrial i augment de l'angiogènesi [48-50].

## • Alteracions moleculars dels carcinomes no endometriodes

### **P53**

El gen TP53, localitzat al cromosoma 17p13.1, és el gen més freqüentment mutat en els càncers humans [51]. TP53 activat (degut al dany produït en el DNA a causa de radiacions ionitzants, carcinògens, mutàgens i altres factors desconeguts) contribueix en la supressió de tumors inhibint la proliferació cel·lular i induint apoptosi (Figura 16).

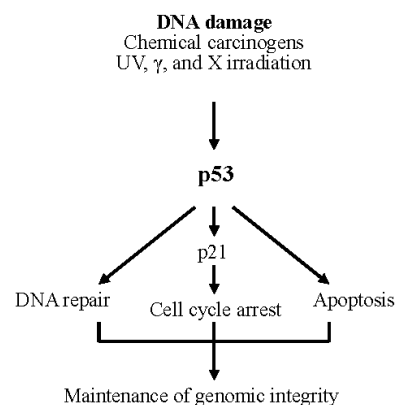


Figura 16: Mecanisme d'actuació de p53.

Les mutacions de TP53 permeten el creixement continuat de les cèl·lules mutades cosa que permet l'acumulació de més mutacions i la possibilitat d'una expansió clonal de níus neoplàsics. Les mutacions de TP53 són actualment les alteracions genètiques més freqüentment identificades en el carcinoma serós d'endometri [52]. Les alteracions de TP53 es creu que tenen lloc en les fases inicials de la carcinogènesi del SCE i que estan implicades en la seva evolució. Els resultats més recents han trobat mutacions fins a un 90% dels SCE [53]. El tipus de mutació més comú és la mutació amb sentit erroni o missense (51,57) i en un estudi de Jia i col·laboradors [52] les mutacions en el codó 248 de CGG a TGG o a CAG van ser les més freqüentment identificades. S'ha vist que el 76% dels SCE tenen

sobreexpressió de p53 per immunohistoquímica [54]. La mutació de *TP53* sense sobreexpressió de la proteïna pot ser deguda a una proteïna inestable o absent [52, 55]. Per altra banda també es pot observar sobreexpressió de la proteïna sense mutació del gen cosa que indica que probablement hi ha altres mètodes d'inactivació funcional de *TP53* [56].

### **E-cadherina**

El gen supressor de tumors *CDH1* codifica per la proteïna E-cadherina. És una molècula d'adhesió cel·lular dependent de calci ( $Ca^{2+}$ ), la pèrdua de la qual es relaciona amb la transició epiteli- mesènquima [57].

En els EC s'observa una reducció en l'expressió de E-cadherina. S'observa LOH al cromosoma 16q22.1 en el 60% dels NEEC i en canvi només en el 22% dels EEC [58]. La hipermetilació del promotor de *CDH1* també és freqüent entre els EC (21-40%) però no sempre correlaciona amb una disminució de l'expressió [59].

L'expressió d'aquesta proteïna s'associa a una disminució de la mortalitat per EC i a una disminució de la progressió de la malaltia i de les recidives a distància [60].

### **Les claudines**

Les claudines pertanyen a una família de proteïnes de membrana que formen part de les unions estretes entre cèl·lules (TJ, Tight Junctions). L'organització dels complexos E-cadherina/ $\beta$ -catenina de les unions adherents (AD, Adherent Junctions) durant la transformació cel·lular és àmpliament reconegut; en canvi, les implicacions de les TJs en aquest procés són més desconegudes. Tant la claudina 3 com la claudina 4 s'han vist altament expressades en càncer de mama, pròstata, ovari i pàncrees i més recentment en el carcinoma serós papil·lar uterí [61]. Alguns estudis suggereixen que poden estar implicades en processos d'invasió i metàstasi [62].

### **HER-2/*neu***

La família de receptors tirosina cinasa del factor de creixement epidèrmic (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) està formada per quatre membres: EGFR (ErbB1), HER-2/*neu* (ErbB2), HER-3 (ErbB3) i HER-4 (ErbB4). HER-2 es troba sobreexpressat en aproximadament un 20% dels càncers de mama. La dimerització de HER-2 amb qualsevol dels altres membres dóna lloc a una autofosforilació dels residus tirosina del domini

## Introducció

citoplasmàtic dels receptors i inicia una varietat de vies de senyalització. Pel que fa al càncer d'endometri, també es troba sobreexpressat i amplificat de forma més freqüent en els NEEC, en comparació amb els EEC (43% i 29% respectivament). Els alts nivells d'expressió de HER-2/*neu* s'han associat a resistència a la quimioteràpia i baixa supervivència, cosa que suggereix que aquestes cèl·lules tenen un comportament biològic més agressiu i un avantatge pel que fa al creixement respecte les cèl·lules HER-2/*neu* negatives [63, 64].

### **P16**

P16 és un inhibidor de la cinasa dependent de ciclina 4 (CDK4, Cyclin-Dependent Kinase 4) i s'expressa en alguns teixits normals i tumorals. És una proteïna supressora de tumors codificada pel gen *CDKN2A*. Joga un paper important en la regulació del cicle cel·lular aturant la progressió de la fase G1 a la fase S. Molts tumors presenten una *downregulació* de p16, no obstant també es troba sobreexpressada en una gran varietat de tumors, entre ells, el d'endometri [65, 66]. Aproximadament el 80-90% dels carcinomes serosos papil·lars expressen p16 enfront d'un 30-40% dels EEC [67, 68]. Per aquest motiu s'ha proposat com a marcador addicional, dins d'un panell immunohistoquímic, per a distingir els SCE dels EEC [65].

### **HMGA2 (high mobility group AT-hook 2)**

El factor de transcripció HMGA2 es troba en teixits embrionaris i és un regulador important de la diferenciació, creixement, apoptosi i transformació maligna de les cèl·lules. Es troba sobreexpressió d'aquesta proteïna en moltes neoplàsies epitelials i mesenquimals. La immunotinció nuclear de HMGA2 és molt comuna en els carcinomes serosos (91%) i en les seves lesions precursorses, i és negativa en la majoria de EEC [69].

### **IMP/IGF2BP (insulin-like growth factor II messenger RNA binding protein)**

IMP/IGF2BP constitueixen una família de proteïnes d'unió al mRNA necessàries per al desenvolupament fetal [70].

Aquestes proteïnes es poden unir fortament i de forma específica a transcrits d'mRNA com els que codifiquen pel factor de creixement tipus insulina II (IGF-II, Insulin-like Growth Factor II), molècules d'adhesió cel·lular i altres.

**IMP2/IGF2BP2** (insulin-like growth factor II messenger RNA binding protein 2)

Es troba localitzat al cromosoma 3q27.2. Recentment ha estat implicada en la diabetis tipus 2 [71]. Zhang L i col·laboradors [72] han vist que IMP2 s'expressa en les cèl·lules glandulars dels endometris proliferatius i inactius, i que aquest patró es manté en els SCE. En canvi, en els EEC l'expressió de IMP2 es perd en un 25-90% de les cèl·lules tumorals. De la mateixa manera IMP2 es perd en el component endometriode dels carcinomes mixtes d'endometri, mentre que el component serós en manté l'expressió.

**IMP3/IGF2BP3** (insulin-like growth factor II messenger RNA binding protein 3)

Està localitzat al cromosoma 7p11.5. Com la resta de proteïnes de la seva família està altament expressada en teixit fetal, en canvi en teixits adults només s'expressa en les gònades. No obstant, s'expressa en un cert nombre de càncers on ha estat implicada en creixement, migració i invasió. S'ha vist immunoexpressada en un 94-100% dels carcinomes serosos d'endometri i només en un 7-25% dels carcinomes endometrioides [73-75].

### **FOLR1 (Folat Receptor-1)**

El receptor de folat és una proteïna de membrana unida al glicosil-fosfatidilinositol que facilita l'entrada del folat a la cèl·lula el qual es necessari per regular els diferents processos cel·lulars. Principalment intervé en la síntesi de nucleòtids *de novo*. Hi ha tres gens que codifiquen pels receptors de folat, *hFRa*, *hFRβ*, i *hFRγ* també anomenats *FOLR1*, *FOLR2* i *FOLR3*, respectivament. A més de la seva funció com a transportador transmembrana també intervé en la proliferació. L'associació entre el receptor de folat i la proliferació és encara desconeguda però s'ha vist sobreexpressió d'aquest en els carcinomes serosos d'ovari i d'endometri (48%) [76]. Es creu que les teràpies anti-FOLR poden ser útils en el tractament de les neoplàsies amb alts nivells d'expressió d'aquests receptors en les seves cèl·lules tumorals.

### **Mesotelina**

La mesotelina és una proteïna de membrana que s'expressa a les cèl·lules mesotelials normals i que està sobreexpressada en la majoria de mesoteliomes i carcinomes de pàncrees, d'ovari (70%) i de pulmó (50%). Tot i que s'ha demostrat que pot estar implicada en l'adhesió cel·lular, la funció biològica d'aquesta proteïna es poc coneguda. S'ha vist que l'expressió de mesotelina indueix l'expressió de Metaloproteïnases 7 de la matriu extracel·lular (MMP7, Matrix Metalloproteinases 7) [77] i que confereix resistència a l'apoptosi en resposta a TNF- $\alpha$  [78]. Wang i col·laboradors han demostrat que en silenciar el gen que codifica per la mesotelina (*MSLN*) mitjançant un lentivirus amb expressió de microRNA (miRNA) anti mesotelina, es reduïa de forma significativa la viabilitat i la capacitat d'invasió de les cèl·lules del carcinoma d'ovari [79]. Pel que fa al EC, Dainty i col·laboradors han observat una sobreexpressió de mesotelina (32%) en els SCE en correlació amb FOLR1 [76].

### **Ciclina E**

La ciclina E (*CCNE*) és un component de la via del Retinoblastoma (Rb). La fosforilació del Rb, l'alliberació de E2F i la conseqüent transició a la fase S està regulada per dos tipus de ciclines-Cdks, les ciclines tipus D que activen les Cdk 4/6 i les ciclines E que activen Cdk2. En algunes sèries de càncers ovàrics [80], colònics, gàstrics [81, 82] i de mama [83] s'ha vist ampliació del gen amb una freqüència del 2-20%, la qual en alguns casos dona lloc a un augment dels nivells de mRNA. En un estudi amb TMA's de 1500 carcinomes de bufeta es va veure sobreexpressió de Ciclina E en un 1,9% dels casos [84]. En carcinomes endometrials s'ha vist que la sobreexpressió de Ciclina E s'associa amb el grau histològic i immunotinció de p53. A més, en un treball de Cassia R i col·laboradors, el 54.5% dels casos amb sobreexpressió de la proteïna eren NEEC i l'amplificació de CCNE s'associava al tipus histològic [85]. No obstant, es creu que, freqüentment, els mecanismes implicats en aquesta sobreexpressió són mutacions en vies reguladores, més que en la Ciclina E en si mateixa.

### **NRF2 (Erythroid-E2-related factor 2)**

NRF2 és un factor de transcripció nuclear que s'ocupa de mantenir la homeòstasis intracel·lular a través de la regulació de la transcripció de gens diana. La funció biològica

principal de NRF2 és antioxidant. Generalment aquesta proteïna es manté a nivells basals baixos regulada per Keap 1, un regulador negatiu, mitjançant ubiquitinització i processament per part del proteasoma [86]. Els components químicopreventius l'estabilitzen i activen la resposta antioxidant dependent de NRF2.

Recentment s'han observat mutacions i canvis dels nivells d'expressió d'aquesta proteïna en varis càncers, incús el EC [87, 88]. La desregulació de NRF2 dona lloc a una sobreexpressió dels gens diana que intensifica l'efecte protector de NRF2 i confereix avantatge a les cèl·lules tumorals i resistència a la quimioteràpia [87-89]. Chen N i col·laboradors han vist que l'expressió de NRF2 està altament relacionada amb els carcinomes serosos d'endometri i sembla no estar relacionada amb els EC tipus I. L'expressió intensa i difusa s'observa no només en els SCE sinó també en les seves lesions precursors cosa que indica que aquesta alteració de l'expressió és un esdeveniment primerenc en la transformació neoplàsica del SCE [90].

### • **Gens implicats en la resistència a l'apoptosi en el càncer d'endometri**

L'apoptosi és un mecanisme de mort cel·lular programada necessari per mantenir l'homeostasi cel·lular. Aquest procés permet que cèl·lules que ja no són necessàries o han estat danyades, es renovin. El fet que es produeixin alteracions en proteïnes que regulen l'apoptosi pot resultar en el desenvolupament i progressió del càncer així com en la resistència a tractaments.

#### **FLIP, FLICE Inhibitory Protein**

La proteïna inhibidora de FLICE (FLIP, FLICE Inhibitory Protein) és un inhibidor de l'apoptosi iniciada per la unió als receptors de mort. La forma llarga de FLIP, FLIP-L té un alt grau d'homologia amb caspasa-8 i conté dos dominis efectors de mort (DED) i un domini similar a caspasa, tot i que aquest no té activitat proteolítica. D'aquesta manera, alts nivells de FLIP donen lloc a una inhibició de l'activació de la caspasa-8 i de l'apoptosi desencadenada pels receptors de mort (Figura 17).

S'ha observat que FLIP està altament expressat en molts tumors, com en càncer de pròstata [91], càncer gàstric [92], carcinoma de bufeta [93], limfoma de Hodgkin [94] i en

## Introducció

línies cel·lulars de cèl·lules mesotelials malignes [95]. Pel que fa el EC, FLIP es troba sobreexpressat respecte l'endometri normal i correlaciona amb invasió miometrial i metàstasis als ganglis limfàtics [15, 96].

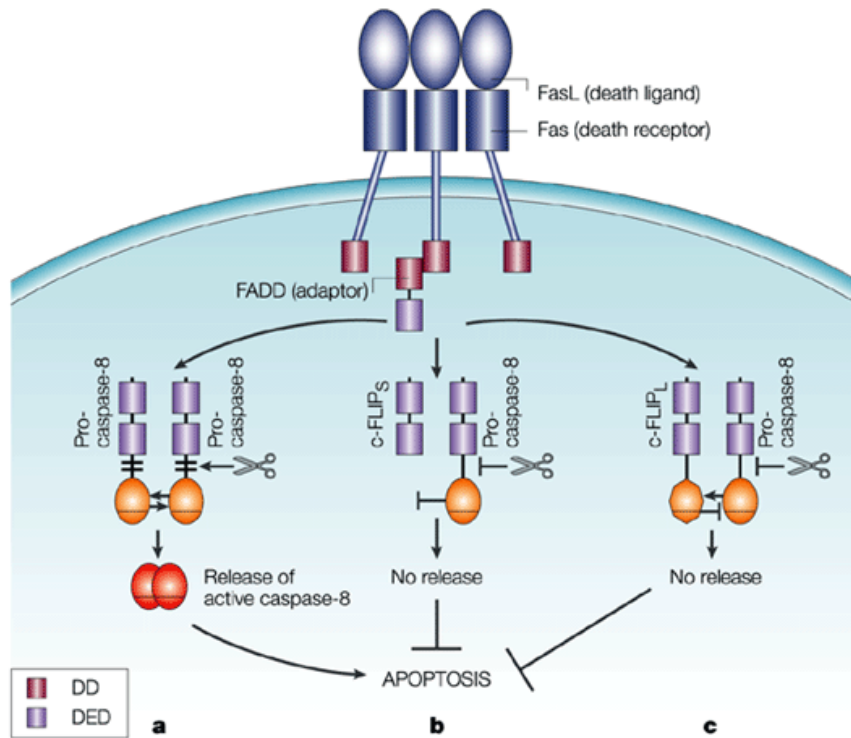


Figura 17: Senyalització per receptors de mort en absència o presència de FLIP. A) En absència de FLIP la caspasa-8 es activa. Com a resultat, el fragment amino-terminal de caspasa-8 que conté DED es manté unit al complex inductor de mort, mentre el dímer de caspasa-8 activa s'allibera al citoplasma per iniciar la cascada apoptòtica. B) La forma curta de FLIP cel·lular (c-FLIP<sub>S</sub>) inhibeix el processament de la caspasa 8. C) La forma llarga de FLIP cel·lular (c-FLIP<sub>L</sub>) té dos DED i un domini similar a caspasa sense activitat proteolítica. La caspasa 8 es pot processar de forma parcial però no es pot alliberar al citosol.

(Thome M, Tscop J. *Nat Rev Immunol*, 2001. 1(1): p. 50-8) [97].

## **CK2, Casein Kinase 2**

La proteïna caseïna cinasa 2 (CK2, Casein Kinase 2)) és una serina/treonina cinasa que ha estat implicada en creixement cel·lular, diferenciació, proliferació i apoptosi. S'ha vist que pot estar desregulada en varis tumors [98]. CK2 és un enzim que consisteix en dues subunitats catalítiques ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ) i una subunitat reguladora ( $\beta$ ). En la subunitat reguladora

trobem residus cisteïna que juguen un paper important en la unió de la cinasa a les estructures nuclears. L'activitat de CK2 pot jugar un paper en el creixement cel·lular a través de la seva senyalització en llocs clau de la matriu nuclear i estructures de la cromatina [99]. De fet, alguns estímuls de creixement poden promoure l'expressió nuclear de CK2, i s'observa una major localització nuclear de CK2 en cèl·lules tumorals en comparació amb cèl·lules normals [100]. Pel que fa al EC, en un estudi del nostre grup vam observar que la intensitat de la immunotinció de CK2 $\beta$  era més elevada en el EC en comparació amb l'endometri normal, i aquesta correlacionava amb l'expressió de AKT, PTEN,  $\beta$ -catenina i FLIP, cosa que suggeria un paper de CK2 en la proliferació cel·lular i la resistència a l'apoptosi [101, 102].

### **NF- $\kappa$ B, Nuclear Factor- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B és una família de factors de transcripció que s'activen per una gran varietat d'estímuls, com citocines, radiació ionitzant i drogues quimioterapèutiques [103] i que controlen diferents esdeveniments moleculars com respostes a l'estrès, viabilitat cel·lular, angiogènesi i progressió tumoral [104].

La família de NF- $\kappa$ B està formada per 5 subunitats estructuralment relacionades que pertanyen a dues classes:

Primera classe: està formada per RelA (p65), RelB, i c-Rel que es sintetitzen com a formes madures.

Segona classe: formada per NF- $\kappa$ B1 (p105) i NF- $\kappa$ B2 (p100) que sofreixen el procés d'ubiquitinització i degradació per la via del proteasoma per generar les subunitats madures p50 i p52, respectivament.

Aquestes proteïnes comparteixen un domini Rel d'homologia, que controla la interacció amb el DNA, la dimerització i les interaccions amb els factors inhibidors I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3). En l'anomenada via canònica o clàssica, els heterodímers d'NF- $\kappa$ B contenen c-Rel o Rel-A units a p50 i estan presents al citoplasma units a I $\kappa$ B. Mitjançant un estímul, les I $\kappa$ B cinases (IKKs, I $\kappa$ B Kinases) fosforilen I $\kappa$ B que s'ubiquitinitza i es degrada per la via del proteasoma deixant que NF- $\kappa$ B transloqui al nucli i actuï com a factor de transcripció. Alguns dels gens diana poden inhibir l'apoptosi (BCL-XL, FLIP) o promoure la progressió del cicle cel·lular (Ciclina D1). NF- $\kappa$ B pot estar sobrerregulada per una inactivació de PTEN.



## Introducció

En la via no canònica o alternativa els dímers estan formats per Rel-B i p100. Aquesta via activa la cinasa IKK $\alpha$  que serà l'encarregada de fosforilar p100. Un cop fosforilada serà proteolitzada i es generarà la forma madura. Finalment els dímers translocaran al nucli on activaran la transcripció de gens diana (Figura 18).

L'activació de les dues vies augmenta en una gran varietat de càncers, inclòs el EC [105], on controlaria la proliferació i l'apoptosi i per tant, seria important en la carcinogènesi.

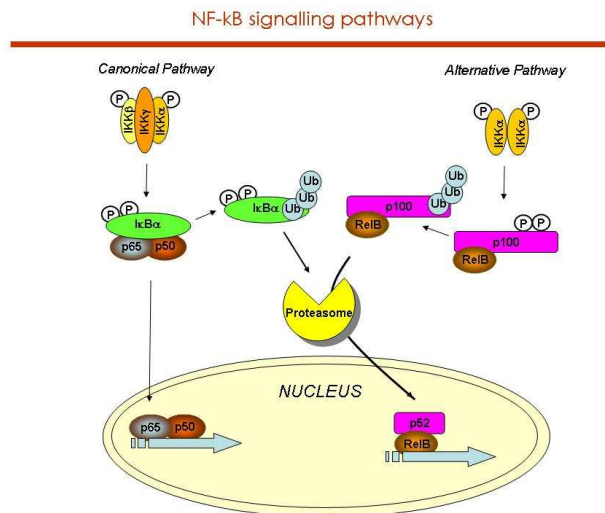


Figura 18: Vies canònica i alternativa d'activació de NF-  $\kappa$ B. (Dolcet X; et al. *Virchows archives*,2005. 446: p. 475-82) [106].

- **Altres gens implicats en la progressió del càncer d'endometri**

### **Annexina A2**

Annexina A2 és una proteïna multi funcional d'unió als fosfolípids dependent de calci que s'uneix al col·lagen tipus I, a la catepsina B i a tenascina-C. Bàsicament està implicada en el manteniment de la comunicació entre el microambient intracel·lular i extracel·lular. Interacciona amb els fosfolípids de membrana i la matriu extracel·lular i ajuda en el manteniment de la plasticitat i el reagrupament del citoesquelet d'actina [107]. També juga un paper important en el sistema d'activació del plasminogen i actua com un receptor activador del plasminogen a la superfície cel·lular de les cèl·lules endotelials i tumorals, on fa de mitjancer en el procés de conversió del plasminogen a plasmina [108].

Varis estudis han trobat un augment dels nivells tissulars d'annexina A2 en neoplàsies de mama, pàncrees, fetge, ronyó, orofaringe i intestí [109]. S'ha vist que promou la invasió cel·lular i metàstasi en neoplàsies de la mama, cervell, fetge, ovari i pàncrees i millora la motilitat i adhesió cel·lular en el carcinoma de pròstata i hepatocel·lular [109-113]. En l'endometri s'ha vist que annexina A2 contribueix en la patogènia de l'adenomiosi [114]. També s'ha vist una sobreexpressió d'ANXA2 en EC estadi I en comparació amb l'endometri normal [115], i una sobreexpressió d'ANXA2 s'ha relacionat amb marcadors de transició epiteli-mesénquima (EMT).

### **1.14 Hipòxia i càncer**

Thomlinson i Gray (1955), basant-se en observacions en seccions histològiques de carcinoma bronquial, van ser els primers en indicar de manera clara que la hipòxia podia estar present en els teixits tumorals. La hipòxia cel·lular es dona en la majoria, sinó tots, els tumors sòlids com a conseqüència d'un desequilibri entre l'aportació d'oxigen i el creixement tumoral. Evidències clíniques uneixen la hipòxia tumoral amb la formació del càncer, la progressió del càncer, i la resistència a la quimioteràpia i a la radioteràpia [116, 117]. En el carcinoma d'endometri la hipòxia s'ha associat amb la invasió miometrial i amb les recidives post radioteràpia [118].

L'ambient hipòxic es caracteritza per l'acidosi i la baixa disponibilitat de nutrients, això indueix mecanismes d'adaptació cel·lulars i genòmics que permeten a les cèl·lules adaptar-se a l'estrès a través de la promoció d'un comportament més agressiu del tumor i resistència a la teràpia [117]. Tot i que l'adaptació genòmica resulta en inestabilitat genòmica, que permet el creixement de clons tumorals resistents, l'adaptació cel·lular a baixes concentracions d'oxigen és un procés que s'aconsegueix a través de nombrosos mecanismes com l'angiogènesi i la transició de la fosforilació oxidativa a la glicòlisi, i està controlat principalment pel Factor de transcripció Induïble per Hipòxia 1 (HIF-1, Hypoxia Inducible Factor-1). L'acumulació de HIF-1 està regulada principalment per la hipòxia. Tot i que s'ha vist que molts estímuls indueixen la seva activació, com els bacteris o els estrògens [119, 120].

A més a més de HIF-1 hi ha altres factors de transcripció que s'activen a concentracions baixes d'oxigen com la família de gens NF- $\kappa$ B. Un treball recent suggereix

## Introducció

associacions transcripcionals entre HIF1 $\alpha$  i NF- $\kappa$ B de manera que p65 augmenta l'expressió de HIF-1 $\alpha$  a través de l'activació del seu promotor en cèl·lules de EC IK (IK, Ishikawa). Per altra banda, la sobreexpressió de HIF-1 $\alpha$  també activa la transcripció dependent de NF- $\kappa$ B, i dóna suport a l'existència d'una retroalimentació positiva [121].

### **HIF1 $\alpha$**

HIF1 $\alpha$  és un factor de transcripció heterodimèric que consta de dues subunitats HIF-1 $\alpha$ , i HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  s'expressa de forma constitutiva, en canvi l'estabilitat de la proteïna HIF-1 $\alpha$  és oxigen-dependent. Els nivells proteics de HIF-1 $\alpha$  són baixos sota condicions aeròbiques. Aquest control dels nivells de proteïna l'exerceix una classe de prolil hidroxilases, les quals amb presència d'oxigen hidroxilen HIF-1 $\alpha$  en dos residus de prolina (Pro 402 i 564). Aquesta hidroxilació és un primer pas necessari pel reconeixement i unió a la proteïna Von Hippel-Lindau, la qual dirigirà HIF-1 $\alpha$  per a la ubiquitinització i degradació proteasòmica [122]. Sota condicions d'hipòxia HIF-1 $\alpha$  no es degrada per la via del proteasoma, s'estabilitza, transloca al nucli, dimeritza amb HIF-1 $\beta$  i inicia la transcripció de diversos gens relacionats amb la glicòlisi, l'angiogènesi i l'homeòstasi d'oxigen [123] (Figura 19). HIF-1 induïx l'expressió d'enzims glicolítics i transportadors de glucosa i permet la supervivència de les cèl·lules tumorals controlant la producció suficient d'ATP. HIF-1 $\alpha$  també controla l'angiogènesi induïnt la transcripció del factor de creixement endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), de manera que augmenti la disponibilitat d'oxigen [124].

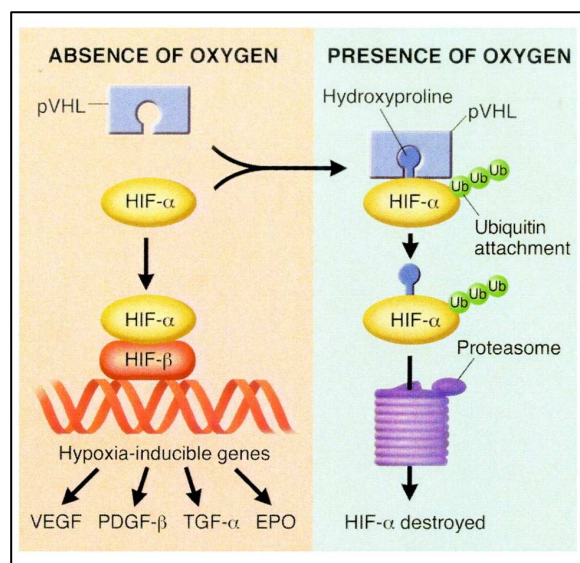


Figura 19: VHL i HIF1. (*The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. Mani et al., Journal of clinical oncology, 2005. 23(21): p. 4776-89*) [125]).

## 1.15 Tractament

### • La cirurgia

**La cirurgia** és el tractament primari pel EC. Normalment inclou l'extracció quirúrgica de l'úter, el cervix, els ovaris i les trompes de fal·lopi (histerectomia amb salpingo-forectomia).

El tractament adjuvant després de la cirurgia i l'estadificació dels tumors es basa en el risc de recidiva i persistència de la malaltia, que ve determinada per l'estadiatge quirúrgic i els factors pronòstics. Segons les recomanacions del grup d'oncologia ginecològica (GOG, Gynecologic Oncology Group) els pacients amb càncer d'endometri s'estratifiquen en tres grups de risc (Taula 9):

Baix risc	Risc intermedi		Alt risc
EEC G1-2 estadi IA	EEC G3 estadi IA o EEC G1-2-3 estadi IB-II		EEC G1-2-3 estadi III-IV o NEEC (serós-papil·lar, cèl·lules clares) Estadi I-II-III-IV
	Baix	Alt	
	Sense factors de mal pronòstic	Amb factors de mal pronòstic (≥2 factors) ·Edat > 60 anys ·Invasió miometrial >50% ·Tumor > 2 cm ·G3 ·Invasió vasculo-limfàtica	

Taula 9: Grups de risc

La linfoadenectomia pèlvica i para-aòrtica es apropiada quan hi ha evidència d'indicadors de baix pronòstic (alt grau, morfologia no endometriode, invasió miometrial profunda o extensió al cervix o annexes).

El paper de la linfoadenectomia en dones amb tumor d'endometri en les primeres etapes és controvertit ja que en assaigs grans aleatoris no s'ha trobat benefici en la supervivència global o lliure de recidives [126, 127]. Per tant, no es recomana com a procediment rutinari amb finalitats terapèutiques. Així mateix cap estudi de tractament adjuvant ha demostrat de manera convincent benefici en la supervivència en tumors

## Introducció

considerats de risc intermedi amb estadis I/II, tot i que es recomana en estadis II per guiar l'estadi quirúrgic i la teràpia adjuvant [128].

El risc de recidiva després de la cirurgia en dones amb malaltia de baix risc és molt baix (5% o menys) i per tant, no es recomana tractament addicional. En canvi, després de la cirurgia, les dones amb EC de risc intermedi-alt normalment reben **radioteràpia (RT)** adjuvant. Les pacients amb tumors amb característiques d'alt risc (alt grau, invasió profunda del miometri, implicació del cèrvix) també reben, normalment, teràpia adjuvant per radiació. I finalment, en dones amb malaltia disseminada es pot considerar la **quimioteràpia** citotòxica o la **teràpia sistèmica hormonal** amb progestàgens [128].

- **La radioteràpia**

La radioteràpia és un tractament que utilitza raigs X d'alta energia o altres tipus de radiació per matar les cèl·lules tumorals o aturar-ne el creixement. Es pot utilitzar com a tractament únic o en combinació amb altres tractaments com la quimioteràpia o la cirurgia. Els EC irradiats es divideixen en dos grups, els tractats amb radiació pèlvica externa i els tractats amb braquiteràpia o radioteràpia interna. En la braquiteràpia, la font de radiació es col·loca dins de la cavitat vaginal.

Tant la radiació pèlvica externa com la braquiteràpia s'utilitzen per irradiar llocs de potencial metastàtic d'expansió local del tumor, com per exemple, la regió supravaginal, els parametris i els ganglis limfàtics regionals. Això es deu al fet que la cavitat abdominal és el lloc més comú de fracàs en el tractament, particularment en pacients amb NEEC. En concret, la braquiteràpia de la cavitat vaginal, s'utilitza únicament per tractar la part superior de la vagina, degut al fet que és un lloc comú de recurrència pèlvica [129].

Com hem dit, la RT adjuvant es limita als pacients amb factors de risc intermedi i alt.

Per aquells pacients amb característiques de risc intermedi-alt, la braquiteràpia vaginal proporciona un bon control regional, menys morbiditat i millor qualitat de vida en comparació amb la RT pèlvica externa.

Pels pacients amb estadi I-III amb característiques d'alt risc, la quimioteràpia sola no ha mostrat benefici comparat amb la RT pèlvica externa. En un assaig que comparava la radiació pèlvica externa amb o sense quimioteràpia es va veure que la teràpia combinada

oferia una millor supervivència lliure de malaltia. La radiació pèlvica externa millora el control local de manera significativa dels pacients amb estadi I, tot i que això no implica un avantatge en la supervivència [129].

- **Inducció de mort cel·lular per radioteràpia (RT)**

La finalitat de la radioteràpia és la de destruir o disminuir el nombre de cèl·lules tumorals.

La radiació ionitzant indueix dany al DNA (DNA, Deoxyribonucleic Acid) ja sigui directament, causant trencaments de la doble cadena (DSBs, Double-Strand Breaks) o de cadena simple (SSB, Single Strand Breaks), o indirectament via la generació de radicals lliures (Figura 20).

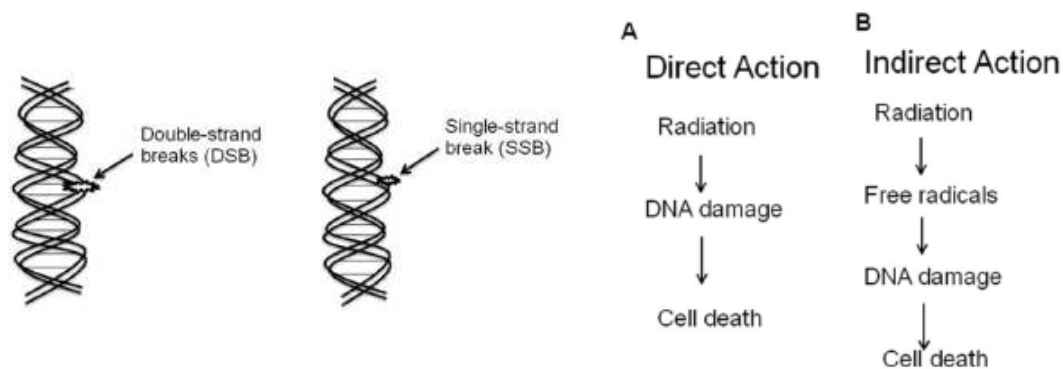


Figura 20: DSBs són els responsables de la mort cel·lular. Incús un SSB es suficient per matar una cèl·lula o pertorbar la integritat genòmica causada per la radioteràpia. La radiació actua directament (A) o indirectament (B) al DNA cel·lular. (Baskar R; et al. *Int J Med Sci*, 2012. 9(3): p. 193-9)[130].

La radioteràpia danya tant les cèl·lules normals com les cèl·lules tumorals però a diferència de les cèl·lules tumorals, les cèl·lules normals són més eficients en reparar el dany al DNA ja que proliferen menys i per tant tenen més temps per reparar el dany abans de la replicació.

Hi ha varis factors que repercuteixen en l'èxit de la radioteràpia. Les cèl·lules són més radiosensibles quan es troben en fase de mitosi (G2/M), però l'efectivitat de la radioteràpia també depèn d'altres factors intrínsecs com la dosi total, l'índex de fraccionament, la transferència lineal d'energia (LET) o la radio-sensibilitat del teixit.

## Introducció

La presència d'O<sub>2</sub> influeix la teràpia de radiació. Quan un material biològic absorbeix la radiació els radicals lliures (R') que es generen inicien una sèrie d'esdeveniments que desemboquen en un dany biològic. Aquestes molècules són molt inestables i reaccionaran ràpid amb l'O<sub>2</sub> per produir RO<sub>2</sub> i finalment ROOH en la molècula diana, cosa que dóna lloc a un canvi estable. En aquest moment es diu que el dany està químicament "fixat" [131]. A continuació aquest dany pot ser reconegut per les vies moleculars que participen en la resposta al dany del DNA (DDR, DNA Damage Response) per tal de reparar-lo, aturar el cicle cel·lular (senescència) o del contrari, destruir les cèl·lules danyades.

La DDR engloba un grup de vàries vies moleculars interrelacionades. En general aquest sistema es divideix en dues parts, els sensors i transductors del dany del DNA i els efectors de la resposta al dany del DNA. Un dels sensors/transductors importants és la proteïna ATM ( ATM, Ataxia Talangectasia Mutated). ATM, juntament amb MRN i altres proteïnes s'uneixen als DSB, permeten la fosforilació de H2AX, el reclutament d'altres proteïnes i la formació final dels "foci" induïts per la radiació (IRIF, Ionizing Radiation Induced "Foci"). Un altre dels sensors/transductors importants és la proteïna cinasa dedent del DNA (DNA-PKcs, DNA-Dependent Protein Kinase catalytic subunit) que juntament amb el complex Ku70-Ku80 s'uneix als extrems dels DSBs. Finalment, la proteïna ATR (ATR, AT-Related Kinase) juntament amb ATRIP (ATRIP, ATR Interacting Protein) actua principalment en resposta al dany de cadena simple.

Les Chk1 o Chk2 (Chk, Checkpoint proteins) són substrats clau de ATM i ATR. Aquestes fosforilen altres substrats necessaris per l'activació dels punts de control del cicle cel·lular per finalment, en cas de no poder reparar el dany, aturar-lo. Quan el dany no es pot reparar també es pot promoure la mort cel·lular o apoptosi [132](Figura 21).

Mutacions en aquests gens resulten en un augment de la probabilitat de desenvolupar càncer [133]

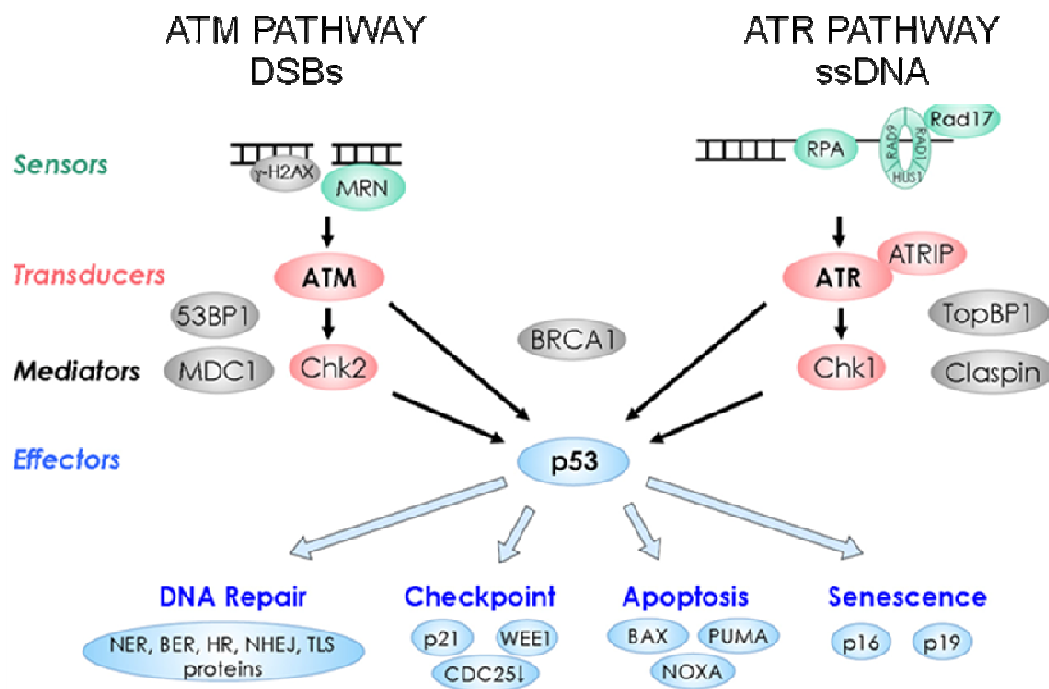


Figura 21: Vies de resposta al dany del DNA en animals. Detecció dels DSBs i ssDNA a través dels sensors (es mostren en verd), les cinases transductores de senyal (es mostren en vermell), els mediadors (es mostren en gris) i els efectors (es mostren en blau) que condueix a la reparació del dany, control del cicle cel·lular, apoptosi o senescència. (Yoshiyama KO; et al. *Biology*, 2013. 21;2(4): p. 1338-56)[132].

Així doncs, després del tractament amb radioteràpia les cèl·lules tumorals poden morir per varis mecanismes: Apoptosi, catàstrofe mitòtica (aquestes són les 2 formes de mort induïdes per la radiació ionitzant més comunes), necrosi, senescència i autofàgia. L'apoptosi es caracteritza per la formació de cossos apoptòtics, nuclis amb fragmentació del DNA i cromatina condensada amb una participació especial dels mitocondris i es la forma principal de mort induïda per radioteràpia. La catàstrofe mitòtica és un tipus de mort que normalment té lloc després d'un error en la segregació dels cromosomes, això dóna lloc a la formació de cèl·lules gegants amb nuclis aberrants. En la necrosi s'observen nuclis atípics, es desintegren els orgànuls cel·lulars, es produeix un trencament de la membrana cel·lular i com a conseqüència es produeix una pèrdua del contingut intracel·lular. L'autofàgia és una forma de mort programada en la qual la cèl·lula s'autodigereix. I finalment, la senescència es refereix a una forma permanent de pèrdua de la capacitat proliferativa.

Hi ha varies vies moleculars que s'han vist implicades en les diferents formes de mort cel·lular induïda per radioteràpia. Aquestes involucren principalment el gen *TP53* i les alteracions afecten principalment la supervivència cel·lular (Figura 22). Per compensar la



## Introducció

pèrdua d'una de les vies de reparació del DNA, les cèl·lules poden activar vies alternatives. Aquest mecanisme també podria ser responsable de la disminució de la resposta a la radioquimioteràpia.

Les principals vies implicades en la resistència a la radioteràpia són les vies de transducció ATM/TP53, RAS-MAPK, entre altres [134].

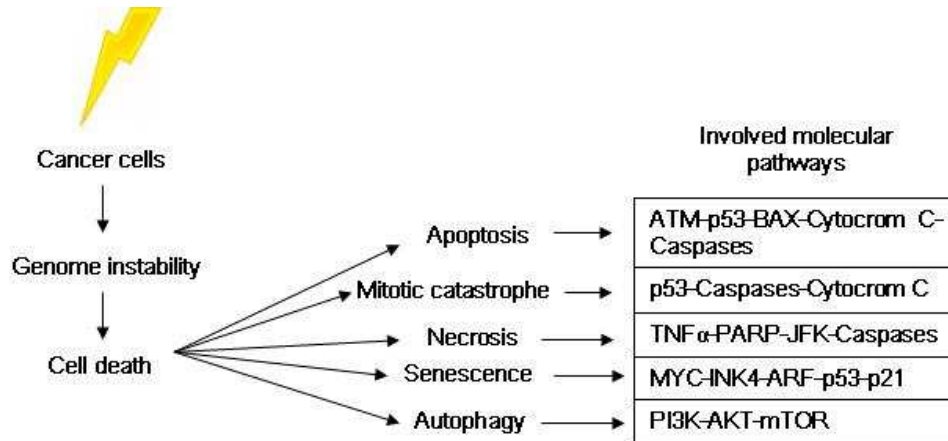


Figura 22: Tipus de mort cel·lular induïda per radiació. Vies moleculars implicades. (Modificat de: Baskar R; et al. *Int J Med Sci*, 2012. 9(3): p. 193-9) [130].

### • La quimioteràpia

La quimioteràpia consisteix en l'administració de fàrmacs a l'organisme per tal d'aturar el creixement o eliminar les cèl·lules tumorals. Aquest tractament es potencialment efectiu per aquells càncers disseminats. Pot ser sistèmica o regional. La quimioteràpia combinada normalment funciona millor que la quimioteràpia amb un únic fàrmac. Els fàrmacs que més freqüentment s'utilitzen són:

- Carboplatin (Taxol®)
- Paclitaxel
- Doxorubicin (Adriamicin®)
- Cisplatin

Les combinacions més freqüents són carboplatin+paclitaxel i doxorubicin+ cisplatin [135]

- **L'hormonoteràpia**

La teràpia hormonal [136] consisteix en la utilització d'hormones o medicaments que bloquegen les hormones per combatre el càncer. És una opció disponible únicament en els tumors de tipus endometriode amb receptors hormonals positius.

En aquests casos es pot considerar tractament amb:

- Progestàgens
  - o Els anàlegs de progesterona més utilitzats són l'acetat de medroxiprogesterona (Povera®) i l'acetat de megestrol (Megace®).
  - o Algunes vegades la hiperplàsia endometrial o càncers d'endometri en fase molt inicial es poden tractar amb un aparell intrauterí que conté levonorgestrel, un progestagen. Aquest normalment es combina amb un altre anàleg de la progesterona, medroxiprogesterona o agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina.
- Tamoxifè
  - o És un fàrmac antiestrogènic que normalment s'utilitza per al tractament del càncer de mama i que es pot utilitzar per al tractament del EC avançat o recurrent.
- Fulvestrant
  - o És un fàrmac antagonista dels ER sense efecte agonista que accelera la degradació del ER per part del proteasoma i que ha estat utilitzat en càncers de mama metastàtics o localment avançats.
- Agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina (GNRH)
  - o Aquests fàrmacs s'utilitzen per disminuir els nivells d'estrogen en dones que encara tenen els ovaris funcionals.

## Introducció

- Inhibidors de l'aromatasa
  - o Són útils per evitar la formació d'èstrogen. Normalment s'utilitzen per al tractament del càncer de mama però poden ser útils per al tractament del càncer d'endometri (per exemple: anastrozol (Arimidex®), letrozol (Femara®))

### **1.16 Teràpies dirigides contra el càncer d'endometri**

Les teràpies dirigides són aquells tractaments que actuen sobre gens o proteïnes concretes que contribueixen al creixement i a la supervivència tumoral. Actualment existeixen diversos agents i estratègies que es troben en diferents fases clíniques per tal d'estudiar la seva activitat antitumoral i la seva aplicació en humans.

#### **Inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR**

La via PI3K/AKT/mTOR és la via que està alterada amb més freqüència al EEC, normalment per mutacions del gen supressor *PTEN* o per mutacions activadores de *PIK3CA* [37]. Això fa creure que inhibidors de PI3K com Wortmannin o ZSTK474 es poden utilitzar com a agents anticancerígens [137]. Aquests tipus de tumors també són susceptibles a tractaments amb inhibidors de mTOR (rapamicina i derivats) com CCI-779 (temsirolimus), RAD001 (everolimus), AP23573 (deforolimus), els quals s'utilitzen actualment en assaigs clínics Fase II en càncer d'endometri recurrent [138-140]. També existeixen tractaments combinats com un inhibidor dual de PI3K i mTOR, BEZ235 que ha estat sintetitzat recentment el qual ha demostrat ser més eficient que rapamicina, ja que pot inhibir l'activació *feedback* de la via PI3K/AKT causada per rapamicina [141].

Altres agents com MKC-1 (EntreMed), un inhibidor oral del cicle cel·lular, redueix phospho-AKT i ha estat avaluat recentment en un assaig clínic fase II amb dones amb càncer d'endometri i ovari recurrent [142].

#### **Inhibidors dels receptors tirosina cinasa**

Altres dianes terapèutiques importants són els receptors tirosina cinasa (Figura 23). La família dels factors de creixement epidèrmics està constituïda per EGFR (ErbB1), HER-2/neu (ErbB2), HER-3 (ErbB3) i HER-4 (ErbB4). Concretament, ErbB2 es troba

sobreexpressat en el càncer d'endometri. Existeixen diversos inhibidors de l'activitat tirosina cinasa com: Gefitinib (Iressa®, ZD1839), Lapatinib (Tykerb®, GW572016) i Erlotinib (Tarceba®) que afecten la via EGFR. Aquests inhibidors prevenen la fosforilació de MAP cinasa Erk1/2, MAP cinasa MEK 1/2, CDK1, AKT, RAF 1 i Rb-1. En línies cel·lulars de EC s'ha vist que tant els EEC com els NEEC responen al tractament amb ZD1839 tot i que els NEEC responen menys degut, probablement, a l'activació constitutiva d'altres vies. Neratinib (HKI-272), un inhibidor de HER-2, ha demostrat produir un arrest del cicle cel·lular en fase G0/G1 i una disminució de l'autofosforilació de HER-2 en línies cel·lulars amb sobreexpressió de HER-2 [143]. A més, en xenografts amb SCE amb amplificació de *HER-2* tractats amb Neratinib es va veure una millora en la supervivència global respecte els controls [143].

Pel que fa als assaigs amb pacients, s'ha estudiat ZD1839 en un assaig clínic Fase II (GOG 229C) en dones amb EC avançat. Els resultats mostren una resposta completa i malaltia estable en varis pacients després de 6 mesos. Sunitinib per altra banda, és una petita molècula que inhibeix les senyals cel·lulars per unió amb els receptors tirosina cinasa i que per tant, se li ha associat una activitat anti angiogènica i antitumoral. Ha estat estudiat en pacients amb càncer d'endometri recurrent/metastàtic en un assaig clínic Fase II [144] i ha demostrat una activitat prometedora. Erlotinib també ha estat estudiat en assaigs clínics fase II en dones amb EC avançat [145].

Anticossos monoclonals contra EGFR com trastuzumab també s'han estudiat amb dones amb EC [146, 147] i en alguns casos s'han obtingut bones respostes.

Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) és un inhibidor dels receptors tirosina cinasa que té activitat anti proliferativa i anti angiogènica. Presenta activitat contra VEGFR2, el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (Platelet-derived Growth Factor Receptor, PDGFR) i c-Kit, entre altres [148]. Un assaig Fase II multicèntric recent ha demostrat que pacients amb EC avançat o recurrent es poden beneficiar del tractament [149]. Per altra banda, el nostre grup ha demostrat que la inhibició farmacològica de B-Raf mitjançant Sorafenib sensibilitza les cèl·lules de EC a l'apoptosi induïda per TRAIL, *down*-regulant FLIP [150].

Finalment, la via del FGFR és una de les vies de senyalització implicades en la patogènesi i progressió del EC. Agents contra aquest receptor han estat provats en models de EC i en assaigs clínics [151].

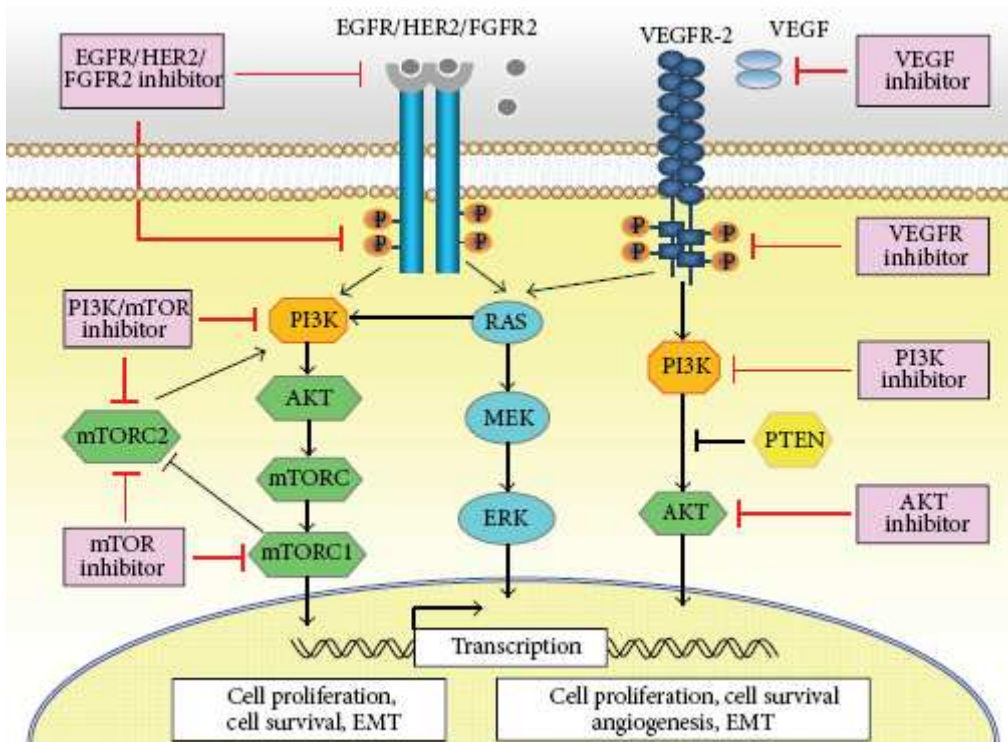


Figura 23 : Diances moleculars terapèutiques en el EC. El EC tipus I freqüentment mostra alteracions de la via PI3K/PTEN/AKT/mTOR en canvi, els tipus II presenten alteracions de p53 i sobre expressió de HER-2. La sobre expressió de EGFR i VEGF, la desregulació dels microRNAs, l'activació de les CSC i la transició epiteli-mesénquima estan implicades en la oncogènesi i progressió dels dos tipus de càncers. Assaigs clínics contra mTOR i EGFR/HER2 així com agents anti angiogènics han mostrat efectes modestos. (Dong, P; et al. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 130362) [152].

### **Les teràpies hormonals**

La via EGFR pot estar induïda per les hormones esteroidees les quals constitueixen el principal mecanisme de promoció del creixement en l'endometri. Com s'ha comentat anteriorment, existeixen diverses teràpies hormonals per al tractament del càncer d'endometri avançat o recurrent que estan indicades en pacients amb un mal estat general el qual impedeix l'administració d'altres teràpies. L'Acetat de Medroxiprogesterona per exemple, és una variant sintètica de l'hormona humana progesterona i el seu ús ha estat estudiat en pacients amb EC. Fulvestrant, un antagonista dels ER també s'ha estudiat en un assaig clínic fase II en pacients amb EC metastàtic o recurrent [153]. Els estrògens i la progesterona són les hormones esteroidees més importants que modulen la proliferació i diferenciació de la cèl·lula endometrial i com hem dit anteriorment, el 80% dels EEC expressen els seus

receptors. Malauradament, els NEEC no responen al tractament hormonal i els EEC amb pèrdua de diferenciació, tampoc. Dos assaigs GOG en aquests pacients van mostrar una taxa de resposta global del 15-25% amb una mitjana de supervivència lliure de malaltia de 4 mesos i una supervivència global de menys d'11 mesos.

El fracàs en el tractament pot ser degut al fet que el tumor no expressi PR. La majoria dels EEC expressen ER però l'expressió del PR varia. A més aquesta expressió moltes vegades és heterogènia i grups de cèl·lules negatives per PR poden ser les causants de la resistència al tractament. Per altra banda, estudis recents demostren que l'absència o l'expressió reduïda de la isoforma B del PR pot donar lloc a un fracàs del tractament i una mala senyalització mediada per PR B [154].

Les estratègies de tractament en pacients amb EC no son tan efectives en quant a la supervivència lliure de malaltia i la prevenció de l'aparició de recidives com ho són en altres tipus de càncers hormono-depenents (mama o pròstata). Així doncs, les estratègies terapèutiques futures s'haurien de centrar en vies per tal de restablir el balanç hormonal. Algunes d'aquestes estratègies apunten a la utilització dels inhibidors de les DNA metiltransferases (DNMT, DNA Methyltransferases) mitjançant els quals es podria revertir la metilació del promotor de PR i restaurar-ne els seus nivells [155, 156].

### **Els Inhibidors del proteasoma**

Els proteasomes representen un mecanisme important pel qual les cèl·lules controlen la concentració de determinades proteïnes mitjançant la seva degradació. Els Inhibidors del proteasoma s'utilitzen actualment com a drogues quimioterapèutiques degut a la seva habilitat d'aturar el cicle cel·lular o induir apoptosi en alguns tumors [157-159]. En molts tipus diferents de cèl·lules tumorals, els inhibidors del proteasoma com Bortezomib, causen mort cel·lular mitjançant el bloqueig de l'activitat de NF- $\kappa$ B [160]. No obstant, en el càncer d'endometri, els inhibidors del proteasoma indueixen mort cel·lular però enlloc de bloquejar NF- $\kappa$ B, augmenten la seva activitat transcripcional [161]. El bloqueig de l'activitat NF- $\kappa$ B per part de Sunitinib augmentava la mort cel·lular en les línies de EC tractades amb Bortezomib [162].

## **Els inhibidors de les histones deacetilases (HDACI, Histone Deacetylase Inhibitors)**

L'acetilació d'histones és un mecanisme important pel que fa al control epigenètic de l'expressió de gens i per tant, alteracions d'aquest mecanisme d'acetilació pot ser que impliquin una inactivació de gens supressors de tumors o l'activació d'oncogens [163]. Els HDACI són agents terapèutics importants ja que poden donar lloc a un arrest del cicle cel·lular i a l'apoptosi [164]. Causen la desrepressió de gens, la reactivació dels quals promou un efecte anti proliferatiu. S'han aprovat assaigs clínics amb SAHA (Vorinostat) per al tractament dels limfomes i en tumors sòlids s'ha vist que són eficaços com a agents únics o en combinació amb altres tractaments [165]. En el EC s'hi troben alteracions epigenètiques com la sobreexpressió de les HDAC, o el silenciament epigenètic dels gens reparadors del DNA com *MLH1* o el silenciament de *PTEN* o de *PR* [166]. Per aquest motiu es suggereix que el EC pot ser especialment sensible als HDACI. Alguns estudis pre clínics en línies cel·lulars de EC han donat bons resultats [167].

Finalment, altres agents com els inhibidors de les proteïnes de xoc tèrmic (HSP, Heat Shock Proteins) o els inhibidors de PARP (PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase) també s'estudien com a noves estratègies per al tractament del càncer [168, 169].

### **1.17 Anàlisi de l'expressió de les proteïnes relacionades amb el EC**

- **La Immunohistoquímica**

La immunohistoquímica (IHQ) neix a partir de la immunofluorecència. És una tècnica que permet detectar *in situ* components cel·lulars i extracel·lulars (antígens) mitjançant anticossos específics utilitzant sistemes de detecció enzimàtics.

La fixació i la posterior inclusió de les mostres en parafina permet transformar el material biològic semi-líquid en un de sòlid, homogeni i dur, d'aquesta manera es poden realitzar talls fins preservant l'estructura.

S'ha de tenir en compte però, que el procés de fixació té molta influència sobre la qualitat de la IHQ. La fixació òptima per a mostres histològiques es duu a terme en formol al

10% durant 24 hores de manera que s'obté el millor balanç entre una bona morfologia i una bona antigenicitat. En un estudi recent del nostre grup hem optimitzat un protocol per a la IHQ de PTEN després de comprovar la influència de diverses variables analítiques i pre analítiques. Hem observat diferències importants en la IHQ de PTEN en els aspirats uterins en comparació amb les mostres d'histerectomies sotmeses condicions incontrolades de retard en la fixació i sobrefixació. Per aquest motiu es recomana la realització de la IHQ de PTEN en mostres sotmeses a una fixació òptima [170].

En els darrers anys s'ha incrementat molt la sensibilitat de la tècnica així com l'estandardització de la mateixa. Avui en dia es disposa d'un gran nombre d'anticossos que funcionen en parafina i, a més a més, s'han desenvolupat sistemes de detecció molt sensibles. A això li hem d'afegir l'aparició de tècniques de recuperació antigènica millorades, les quals permeten l'obtenció de resultats fiables a partir de teixits fixats i processats de diferents maneres.

- **Arrays Matricials de teixit (Tissue Micro Arrays)**

Els TMAs consisteixen en seccions cilíndriques de teixit dipositades en blocs de parafina. Les seccions s'obtenen de blocs donadors que poden ser mostres quirúrgiques, de recerca, etc. Per a la construcció d'un TMA s'utilitza un instrument específic (Tissue arrayer, Beecher Instruments, Silver spring, MD, USA) el qual permet treballar amb coordenades definides.

La construcció d'un TMA comença amb la selecció de les zones d'interès del teixit dels blocs de parafina donadors a partir de les seccions tenyides amb Hematoxilina-eosina. A continuació, les mostres cilíndriques s'insereixen en un bloc de parafina receptor d'acord amb les coordenades preestablertes. Els cilindres solen tenir un tamany entre 0.6mm i 1mm cada un (Figura 23).

La tecnologia dels TMA és una eina potent per estudiar l'expressió de gens en centenars de tumors simultàniament. Els blocs multi-teixit van ser introduïts per primera vegada per Battifora i col·laboradors el 1990 [171]. Mitjançant el "mètode salsitxa" es van processar fins a 100 mostres de teixit en un únic bloc de parafina. El 1998, Kononen i col·laboradors van introduir un nou mètode de combinació de múltiples teixits en un únic bloc de parafina. Van utilitzar un *tissue arrayer*, un mètode més precís per alinear les

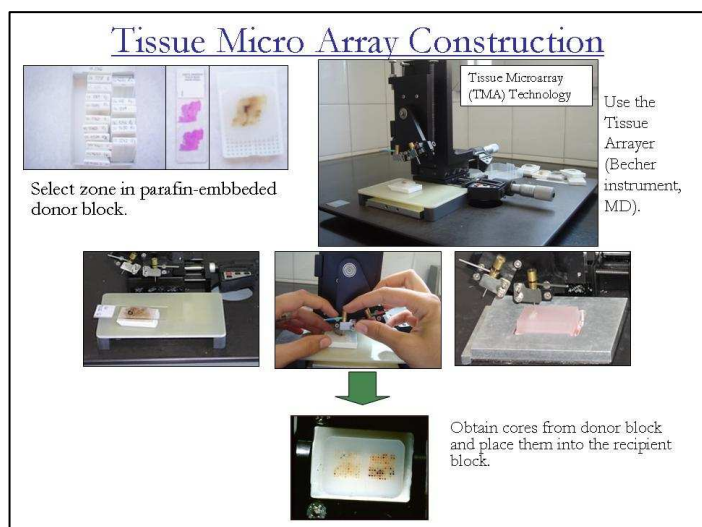


## Introducció

mostres en els blocs. Els TMA es poden utilitzar per determinar la rellevància d'un gen concret i per analitzar dianes potencials que poden ser importants per al pronòstic i tractament del càncer.

L'avaluació simultània de molts tumors en un únic experiment permet l'estandardització del procés i ajuda a economitza l'ús dels reactius. Mitjançant la tecnologia dels TMA es poden validar dades provinents d'arrays de DNA i definir perfils moleculars en grans sèries de tumors mitjançant varis biomarcadors. També es poden traslladar dades de línies cel·lulars i models animals al càncer en humans, avaluar molècules que poden tenir impacte en el pronòstic i el tractament del càncer i finalment correlacionar resultats amb dades clíniques i patològiques. Malgrat això, existeixen alguns desavantatges. Un d'ells és la baixa reproductibilitat degut a la heterogeneïtat dels teixits. Això es pot millorar seleccionant el tamany i el nombre de cilindres. També és aconsellable realitzar un estudi de validació pels diferents antígens quan es vol determinar el valor pronòstic d'un nou marcador. Per fer-ho es comparen els resultats obtinguts en el TMA amb els que s'obtenen en les seccions senceres corresponents en un nombre significatiu de casos escollits a l'atzar i es determina la concordança mitjançant l'índex  $\kappa$ . Una altra de les limitacions dels TMA és el risc inevitable de perdre alguns dels cilindres degut als errors de mostreig, dany del teixit o cilindres buits. Per solucionar aquesta pèrdua de cilindres es recomana construir TMA amb mostres per triplicat o quadruplicat. No obstant, la utilitat de la tecnologia dels TMA com a eina d'alt rendiment per a l'estudi de la patologia molecular ha estat demostrada en molts treballs [172, 173].

Figura 23: Procés de construcció d'un array matricial de teixits



**Hipòtesi i objectius**

---



## 2 HIPÒTESI I OBJECTIUS

### 2.1 Hipòtesi

El carcinoma d'endometri en general s'associa a bon pronòstic si es detecta en situació de baix risc. Malauradament existeixen EC amb característiques d'alt risc i associats a mal pronòstic. La radioteràpia constitueix un mètode de tractament del EC però sovint el tractament fracassa i apareix la malaltia recurrent. El fet d'entendre els mecanismes moleculars involucrats en les recidives pot tenir un impacte important en reduir els nivells de mortalitat i de morbiditat associats a aquest tumor. Per aquest motiu és necessari identificar marcadors fiables que permetin detectar aquells EC que presentaran malaltia recurrent en un futur així com conèixer els mecanismes implicats en la resistència a la radioteràpia. Sensibilitzar les cèl·lules tumorals a la radiació mitjançant estratègies que intervinguin les vies implicades en la resistència a la RT pot donar bons resultats en un futur.

El tipus histològic és un factor biològic predictiu important en el EC. En funció del tipus histològic es determina l'extensió del procés quirúrgic i la subseqüent teràpia adjuvant. Generalment, la classificació histològica del EC és fàcil, no obstant en la pràctica diària un alt percentatge de EC presenten histologia mixta endometriode - no endometriode i també existeix certa controvèrsia pel que fa a la classificació dels EEC grau III. Per aquest motiu moltes vegades l'acord interobservador és baix. La troballa d'una firma de biomarcadors per predir el tipus histològic del EC permetria classificar-lo de manera objectiva i mitjançant una tècnica d'ús habitual en la pràctica diària dels Serveis d'Anatomia Patològica (la Immunohistoquímica).

### HIPÒTESIS

- La Immunohistoquímica i els TMA són eines potencials per a l'estudi del càncer d'endometri.
- És possible detectar i estudiar l'expressió de gens relacionats amb la resistència a la radioteràpia i la hipòxia així com l'expressió de gens predictius de malaltia recurrent.

## Hipòtesi i objectius

- La determinació d'una firma molecular de biomarcadors permetria predir el tipus histològic del EC de manera objectiva de manera que millori l'acord interobservador.

## 2.2 Objectius

Per tot això, hem considerat important:

- **Objectiu 1**

A- Estudiar les alteracions del CE relacionades amb la hipòxia i amb l'adaptació a la radiació

B- Estudiar el paper de les vies de senyalització que permeten al EC adaptar-se a la hipòxia

C- Estudiar el valor d'ANXA2 com a marcador predictiu de EC recurrent

- **Objectiu 2**

Determinar una firma molecular de diversos marcadors immunohistoquímics que permeti identificar correctament els EEC grau I, II, III, els SCE i els mixtes EEC-SCE per tal que millori l'acord interobservador.

**Results**

---



### 3 RESULTATS

#### 3.1 Objectiu 1 A

##### **Estudi de les alteracions del EC relacionades amb la hipòxia i amb l'adaptació a la radiació**

*Maria Santacana, Andree Yeramian, Ana Velasco, et al. **Immunohistochemical features of post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium: role of proteins involved in resistance to apoptosis and hypoxia.***

*Histopathology 2012;60:460-471*

1. Les recidives post radioteràpia mostren valors lleugerament més elevats de ER, així com valors significativament més elevats de p53, FLIP citoplasmàtic i nuclear, HIF-1 $\alpha$  i Ki67, i s'associen a una expressió nuclear d'alguns membres de la família NF- $\kappa$ B: p50, c-Rel, RelB.
2. Les recidives post radioteràpia mostren valors de PR i E-cadherina menors respecte els tumors primaris.
3. Les recidives post radioteràpia presenten més acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina en comparació amb els tumors primaris. Les recidives post radioteràpia amb expressió nuclear de  $\beta$ -catenina no mostren mutacions de CTNNB1.
4. La línia cel·lular de EC Ishikawa sotmesa a condicions d'hipòxia mostra translocació nuclear de HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina i FLIP i augment de l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B. Els extractes nuclears de la línia cel·lular de CE Ishikawa exposada a radiació ionitzant mostren una lleu expressió de  $\beta$ -catenina a 3Gy però no mostren augment de l'activitat de NF- $\kappa$ B ni expressió de HIF-1 $\alpha$  i FLIP.





# Immunohistochemical features of post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium: role for proteins involved in resistance to apoptosis and hypoxia

Maria Santacana,<sup>1,\*</sup> Andree Yeramian,<sup>1,\*</sup> Ana Velasco,<sup>1</sup> Laura Bergada,<sup>1</sup> Sonia Gatus,<sup>1</sup> Virginia García,<sup>1</sup> Ainara Azueta,<sup>1,2</sup> Jose Palacios,<sup>2</sup> Xavier Dolcet,<sup>1</sup> Esther Oliva<sup>3</sup> & Xavier Matias-Guiu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics and Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Lleida, <sup>2</sup>Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, and <sup>3</sup>Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

Date of submission 9 December 2010  
Accepted for publication 28 March 2011

---

Santacana M, Yeramian A, Velasco A, Bergada L, Gatus S, García V, Azueta A, Palacios J, Dolcet X, Oliva E & Matias-Guiu X

(2012) *Histopathology* 60, 460–471

## Immunohistochemical features of post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium: role for proteins involved in resistance to apoptosis and hypoxia

**Aims:** Endometrioid carcinoma of the endometrium (EEC) is treated with surgery and radiotherapy. Post-radiation recurrences are associated with increased risk of metastases. Comparison of the expression of genes important in the development and progression of EEC, and others involved in resistance to apoptosis and hypoxia and adaptation to radiation, was performed between post-radiation vaginal recurrences (PVRs) and primary EECs. We tried to reproduce the results by exposing an EEC cell line to hypoxia and radiation.

**Methods and results:** Immunohistochemistry and tissue microarrays were used to compare 24 PVRs with 82 primary EECs. PVRs exhibited increased expression of p53 ( $P < 0.0001$ ), cytoplasmic FLICE-inhibitory protein (FLIP) ( $P < 0.0001$ ), and Ki67 ( $P < 0.0001$ ),

and nuclear staining for FLIP, nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) family members (p50,  $P < 0.0001$ ; c-Rel,  $P = 0.0077$ ; RelB,  $P = 0.0157$ ), and  $\beta$ -catenin ( $P = 0.0001$ ). Differences regarding p50, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), and cytoplasmic FLIP were statistically significant when PVRs and primary EECs were matched for histological grade. Exposure of the EEC cell line to hypoxia induced nuclear expression of  $\beta$ -catenin, FLIP, and HIF-1 $\alpha$ , as well as increased NF- $\kappa$ B activity. No changes in FLIP, HIF-1 $\alpha$  or NF- $\kappa$ B were seen when cells were exposed to radiation. Nuclear expression of  $\beta$ -catenin was seen at 3 Gy, but not at 1 Gy.

**Conclusions:** Genes involved in resistance to hypoxia are expressed in PVRs, and may play a role in the development of post-radiation recurrences.

**Keywords:** apoptosis, endometrial carcinoma, hypoxia, tissue microarray, vaginal recurrence

**Abbreviations:** EC, endometrial carcinoma; EEC, endometrioid endometrial carcinoma; ER, oestrogen receptor; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; FLIP, FLICE-inhibitory protein; HIF, hypoxia-inducible factor; NEEC, non-endometrioid carcinoma; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappaB; PCR, polymerase chain reaction; PR, progesterone receptor; TMA, tissue microarray

---

Address for correspondence: X Matias-Guiu, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Av. Alcalde Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain. e-mail: xmatias@arnau.scs.es

\*These authors should be considered as first authors.

## Introduction

Endometrial carcinoma (EC) is the most common malignant tumour of the female genital tract, and the fourth most common cancer in women from developed countries. Approximately 75% of ECs are confined to the uterus and associated with a good prognosis; however, a significant number of patients present with advanced or recurrent disease. In the USA, EC accounts for approximately 6000 deaths per year.

Two main types of EC have been described.<sup>1,2</sup> Type I tumours are low-grade and oestrogen-related, and are typically represented by low-grade endometrioid carcinomas (EECs), which usually develop in perimenopausal women, and coexist with or are preceded by endometrial hyperplasia. Type II tumours, or non-endometrioid carcinomas (NEECs), are very aggressive cancers that are unrelated to oestrogen stimulation and mainly occur in older women, arising occasionally in endometrial polyps or in atrophic endometrium. The molecular alterations involved in the development of type I EEC are different from those for type II NEEC.<sup>1,2</sup> EEC shows microsatellite instability, as well as mutations in *PTEN*, *PIK3CA*, *k-Ras*, and *CTNNB1*. In contrast, NEEC is characterized by p53 mutations, p16 overexpression, and chromosomal instability. Positive p53 immunostaining is a very frequent finding in NEEC, but is occasionally seen in EEC, particularly in grade III tumours.<sup>3</sup>

International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging is the single strongest prognostic parameter for patients with EC. The 5-year disease-free survival is 90% for stage I, 83% for stage II, and 43% for stage III. Univariate analysis has revealed 93.8% 5-year survival rates for stage IA (tumour limited to the endometrium), 95.4% for stage IB (invasion of less than half of the myometrial thickness), and 75% for stage IC (invasion of more than half of the myometrial thickness). These results are based on the older FIGO staging, which has been used in most of the literature. Surgery is the primary treatment for patients with EC. After surgery, patients with tumours showing high-risk features (high grade, deep myometrial invasion, and cervical involvement) usually receive adjuvant radiation therapy. Irradiated ECs fall into two groups: those treated with pelvic external-beam radiation therapy, and those treated with vaginal vault brachytherapy. Clinical studies have shown that in early-stage EC, adjuvant radiotherapy improves local regional control.

Recurrences may be local and/or distant (abdominal and thoracic). Recurrent EC is restricted to the pelvis in 50% of patients, and in approximately half of them the

tumour is confined to the vagina. However, irradiation may affect the pattern of recurrence, as patients receiving radiation therapy show fewer local recurrences. The overall 2-year cumulative incidence of recurrence in EC is about 12%, as compared with 3% in patients who have received radiation therapy.<sup>4</sup>

The molecular mechanisms involved in recurrence may include alterations in genes responsible for tumour progression (invasion, distant tumour formation, and resistance to hypoxia), but also others associated with resistance to radiation. Understanding these mechanisms may have an important impact in reducing the mortality and morbidity rates associated with this tumour. In a previous study, we demonstrated that two members of the nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) family (p65 and p52) showed significant increases in expression in post-radiation recurrences in comparison with primary tumours. We also showed that EEC cells exhibited nuclear translocation of these two proteins when they were subjected to hypoxic conditions, indicating that resistance to hypoxia involves activation of both the classical and alternative NF- $\kappa$ B signalling pathways.<sup>5</sup> In the present study, we aimed to assess the expression of genes important in the development and progression of EEC, as well as others involved in resistance to apoptosis and hypoxia and in adaptation to radiation, in a series of post-radiation vaginal recurrences of EEC in comparison with primary tumours. Finally, we attempted to reproduce some of the results by exposing the Ishikawa EEC cell line to hypoxic conditions and radiation.

## Materials and methods

### TISSUE MICROARRAYS (TMAS)

Two TMAs were constructed. The first contained samples of 24 post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium, which were obtained from the Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Spain. Information regarding histological grade of the primary tumour was available in eight cases (grade I, two cases; grade II, six cases). Post-radiation recurrences showed increased histological grade in comparison with those of the corresponding primary tumours from the same patients (grade II, four cases; grade III, seven cases). The second TMA was constructed from paraffin-embedded blocks of 82 endometrioid carcinomas of the endometrium (EECs), previously evaluated for microsatellite instability, and alterations in *PTEN*,

*PIK3CA*, *k-Ras*, and  $\beta$ -catenin.<sup>6–10</sup> They were obtained from the Departments of Pathology of Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona and Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Spain, and none of them corresponded to the primary tumours of the patients with post-radiation recurrences. The tumours were collected between 1996 and 2007, and were classified according to the most recent World Health Organization criteria.<sup>11</sup> They were surgically staged and graded using the FIGO staging and grading systems.<sup>12</sup> They included 26 grade I endometrioid carcinomas (EECs), 35 grade II EECs, and two grade III EECs. The study was approved by the local Ethical Committee, and specific informed consent was obtained.

A tissue arrayer device (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) was used to construct the TMA. Briefly, all of the samples were histologically reviewed, and representative areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in largest diameter) from two different areas were included in each case. Control normal tissues from the same EEC specimens were also included.

#### IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Tissue microarrays blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m and dried for 1 h at 65°C, before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series, and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 min in EDTA (pH 8.9). Before staining of the sections, endogenous peroxidase was blocked. The antibodies used are shown in Table 1. After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (Dako, Glostrup, Denmark), using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with haematoxylin. Appropriate positive and negative controls were also tested.

The results of immunohistochemical staining were evaluated by two pathologists, following uniform pre-established criteria. As each TMA included two different tumour cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was based on an examination of both samples. For some markers [oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), p53, E-cadherin, and Ki67], immunohistochemical staining was graded semiquantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score ('histo-score') was obtained for each sample, ranging from 0 (no immunoreactivity) to 300 (maximum immunoreactivity), by applying the following formula:  $\text{histoscore} = 1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate}$

**Table 1.** Antibodies used in this study

Antibody	Clone	Source	Dilution
ER	NCL-ER-6F11	Novocastra	1:50
PR	PgR 636	Dako	Prediluted
p53	DO-7	Dako	1:25
Ki67	MIB-1	Dako	Prediluted
E-cadherin	NCH-38	Dako	Prediluted
$\beta$ -Catenin	14	BD Biosciences	1:300
HIF-1 $\alpha$	Ab1	Abcam	1:100
FLIP	H-202	Santa Cruz Biotechnology	1:10
MLH-1	G168-15	BD Biosciences	1:40
MSH-2	FE11	Calbiochem	1:40
P50	Polyclonal	Cell Signalling	1:50
IKK $\alpha$	H744	Santa Cruz Biotechnology	1:50
c-Rel	C	Santa Cruz Biotechnology	1:50
RelB	C-19	Santa Cruz Biotechnology	1:100

ER, Oestrogen receptor; FLIP, FLICE-inhibitory protein; HIF, hypoxia-inducible factor; PR, progesterone receptor.

staining) + 3 $\times$  (% strong staining). The reliability of such a score for interpretation of immunohistochemical staining in EC TMAs has been shown previously.<sup>13–18</sup> For the remaining markers [ $\beta$ -catenin, MLH-1, MSH-2, p50, IKK $\alpha$ , c-Rel, RelB, and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ ], cases were classified as positive when there was positive nuclear staining, or as negative when nuclear staining was absent. For FLICE-inhibitory protein (FLIP), cytoplasmic and nuclear staining were evaluated separately.

The reproducibility of TMA immunostaining was assessed by comparing the results of TMA with those obtained in sections from the corresponding paraffin blocks of 37 randomly selected cases. The overall concordance was 89.2%. The kappa index of agreement between the two methods ranged from 0.68 to 0.83.

#### *CTNNB1* MUTATIONAL ANALYSIS

Mutations of *CTNNB1* were assessed by polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by

sequencing analyses. The third coding exon of *CTNNB1* was amplified by the use of oligonucleotide primers: 5'-ATTTGATGGAGTTGGACATGGC-3' and 5'-CCAGCTACTTGTTCTTGAGTGAAG-3'. PCR amplification was performed in 20- $\mu$ l reaction volumes that contained 100 ng of DNA, 75 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2  $\mu$ M each primer, 0.2 mM each dNTP, and 1 unit of Taq DNA polymerase (Biotools, B&M Labs, S.A, Madrid, Spain). DNA was amplified with the following PCR conditions: an initial 5-min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C, and 1 min at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C. PCR products were first purified with the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and then bidirectionally sequenced using the original primer pair and an Applied Biosystems Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA). Samples were analysed on the ABI Prism 3100-Avant instrument, with standard run parameters. The separation matrix used was POP-6, with 1  $\times$  TBE and EDTA running buffer (Applied Biosystems).

#### CELL CULTURE, HYPOXIC CONDITIONS, IONISING RADIATION TREATMENT, AND WESTERN BLOT ANALYSIS

The Ishikawa 3-H-12 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 mM HEPES (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) at 37°C with saturating humidity and 5% CO<sub>2</sub>. Hypoxia (0.2% O<sub>2</sub>, 94.8% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) was achieved with an Invivo2 hypoxic workstation (Ruskin Technologies, Leeds, UK). Ionising radiation treatment of cultured cells was performed in culture dishes exposed to 6-MV irradiation from a linear accelerator at a dose rate of 300 cGy/min. Dishes were plated at 50% confluence, irradiated with different doses (1 and 3 Gy), and returned to the tissue culture incubator for 24 h. Nuclear and cytoplasmic extracts were obtained with the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein concentrations were determined with the Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins were subjected to sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked in Tris-buffered saline-

Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) plus 5% non-fat milk for 1 h to avoid non-specific binding, and then incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then incubated with peroxidase-coupled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody for 1 h, and this was followed by chemiluminescent detection using the ECL Advance western blotting detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Luciferase assays were performed as previously described.<sup>5</sup>

#### STATISTICAL ANALYSIS

Immunohistochemical results for primary tumours and post-radiation recurrences, as assessed by histoscore, were compared by use of the Mann-Whitney test *U*-test. The Fisher exact test was used for evaluation of nuclear markers (positive versus negative). Subgroup analysis for tumours of histological grades II and III was also performed, and adjusted with the Bonferroni method to take into account multiple comparisons. The significance level was fixed at 0.05 (0.05/2 for subgroup analysis results).

## Results

#### IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS

A summary of the findings of the immunohistochemical studies is shown in Tables 2 and 3. For each marker, there were always some cases that could not be interpreted because of technical problems (no representative tumour sample left in the cylinders, detachment, cylinders missed in the construction of the array, necrosis, and absence of viable tumour cells).

For PR, the histoscores found in primary tumours (median, 7; mean, 51; range, 0–290) were higher than those seen in post-radiation recurrences (median, 0; mean, 37; range, 0–255). For ER, histoscores in primary tumours (median, 10; mean, 59; range, 0–280) were slightly lower than those in post-radiation recurrences (median, 40; mean, 60; range, 0–267) (Figure 1). These differences in PR and ER histoscores were not statistically significant. For p53, histoscores in primary tumours (median, 0; mean, 17; range, 0–285) were lower than those in post-radiation recurrences (median, 18; mean, 82; range, 0–290), and the differences were statistically significant ( $P < 0.0001$ ) (Figure 2).

Regarding MLH-1, MSH-2, and  $\beta$ -catenin, statistically significant results were found on comparison of

**Table 2.** Summary of immunohistochemical study findings; proteins evaluated by histoscore

Protein	Primary EEC			Post-radiation recurrences			P-value
	Histoscore			Histoscore			
	Median	Mean	Range	Median	Mean	Range	
ER	10	59	0–280	40	60	0–267	0.7659
PR	7	51	0–290	0	37	0–255	0.3331
p53	0	17	0–285	18	82	0–290	<0.0001
E-cadherin	95	118	0–295	0	52	0–280	0.0001
FLIP	17	33	0–170	90	109	0–285	<0.0001
Ki67	10	16	2–80	25	28	7–70	0.0012

EEC, endometrioid endometrial carcinoma; ER, oestrogen receptor; FLIP, FLICE-inhibitory protein; PR, progesterone receptor.

**Table 3.** Summary of immunohistochemical study findings; proteins evaluated by the presence of positive nuclear staining

Protein	Primary EEC			Post-radiation recurrences			P-value
	Positive	Negative	Non-assessable	Positive	Negative	Non-assessable	
β-Catenin	13	61	8	14	8	2	0.0001
MLH-1	54	23	5	17	5	2	0.5805
MSH-2	62	10	10	20	2	2	0.7255
P50	6	70	6	15	8	1	<0.0001
IKKα	29	44	9	12	7	5	0.0763
c-Rel	39	38	5	19	4	1	0.0077
RelB	11	62	9	9	13	2	0.0157
HIF-1α	19	53	10	19	2	3	<0.0001
FLIP	30	44	8	11	7	6	0.066

EEC, endometrioid endometrial carcinoma; ER, oestrogen receptor; FLIP, FLICE-inhibitory protein; HIF, hypoxia-inducible factor; PR, progesterone receptor.

nuclear accumulation of β-catenin in primary EECs (13 of 74 assessable cases) with that in post-radiation recurrences (14 of 22 assessable cases) (Figure 3A) ( $P = 0.0001$ ).

The histoscores for cytoplasmic FLIP found in primary EECs (median, 17; mean, 33; range, 0–170) were significantly lower than those seen in post-radiation recurrences (median, 90; mean, 109; range, 0–285) ( $P = 0.0001$ ) (Figure 4). Nuclear expression of FLIP was detected in 11 of 18 post-radiation recurrences (61.1%), and 30 of 74 primary tumours (40.5%), but these results were not statistically signif-

icant ( $P = 0.066$ ). The histoscores for Ki67 in primary tumours (median, 10; mean, 16; range, 2–80) were significantly lower than those in post-radiation recurrences (median, 25; mean, 28; range, 7–70) ( $P = 0.0012$ ). Statistically significant differences were also seen with regard to E-cadherin expression between primary EECs (median, 95; mean, 118; range, 0–295) and post-radiation recurrences (median, 0; mean, 52; range, 0–280) ( $P = 0.0001$ ).

Post-radiation recurrences showed a significant association with nuclear staining for some members of the NF-κB family, such as p50, c-Rel, and RelB (p50,

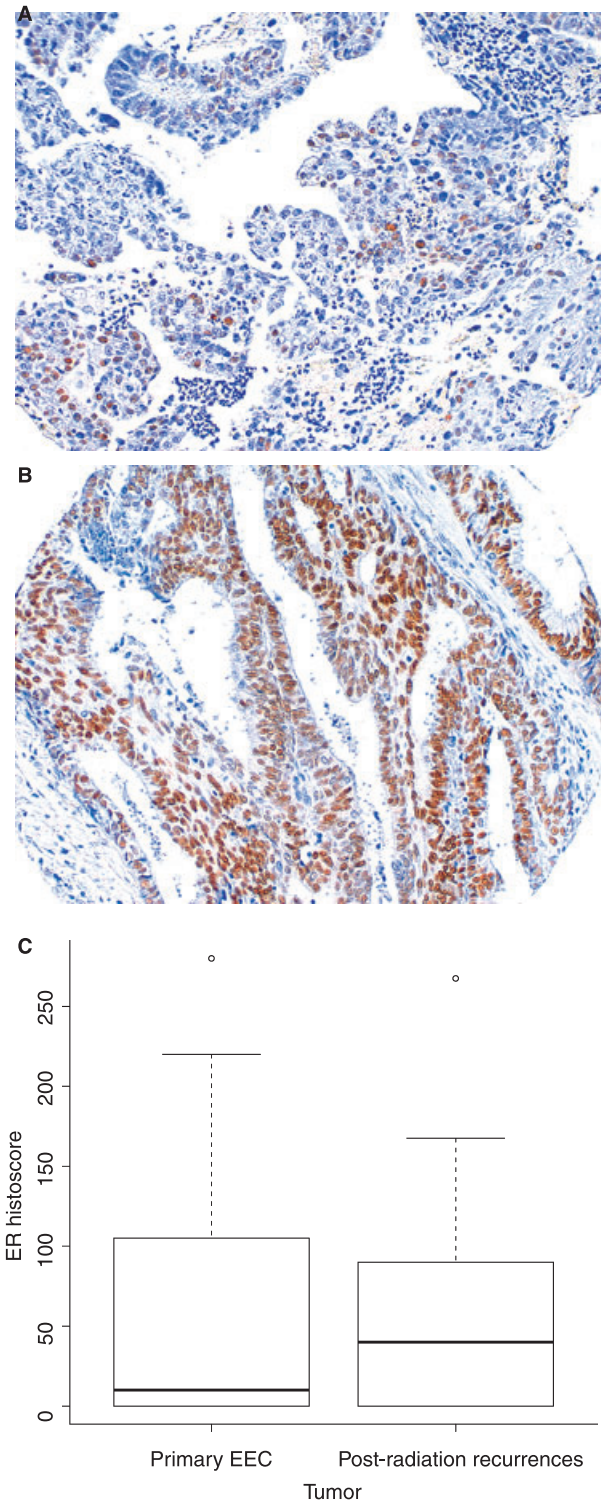


Figure 1. A, B, Oestrogen receptor immunostaining was slightly lower in primary endometrioid carcinomas (EEC) (A) than in post-radiation recurrences (B). (C) Box-plot comparison.

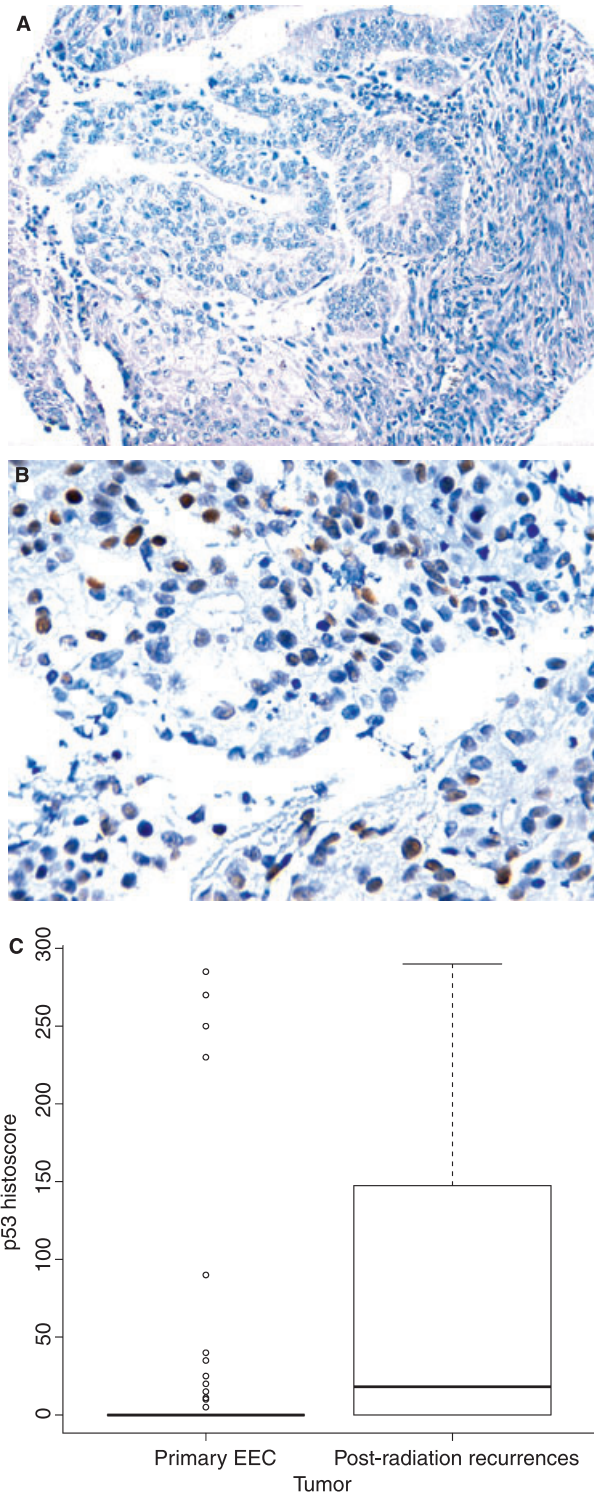
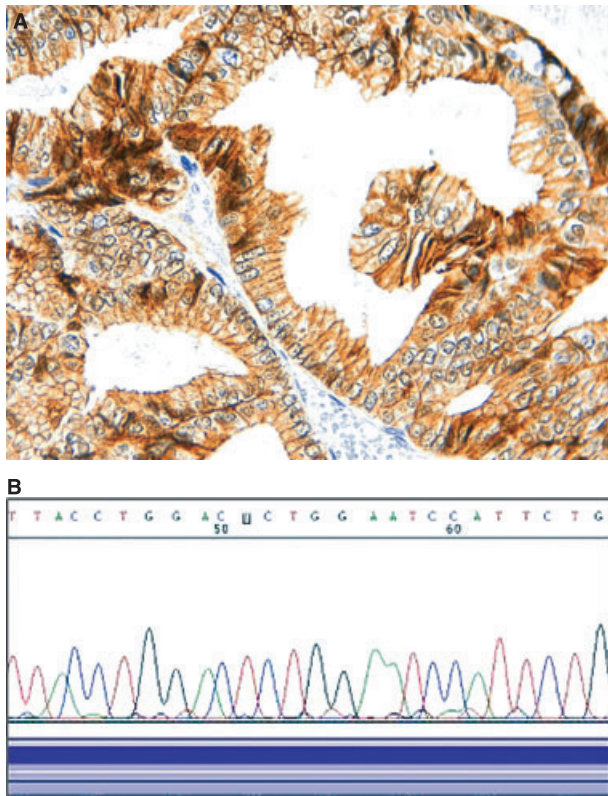


Figure 2. A, B, p53 expression in a primary tumour (A) and one post-radiation recurrence (B). (C) Box-plot comparison.



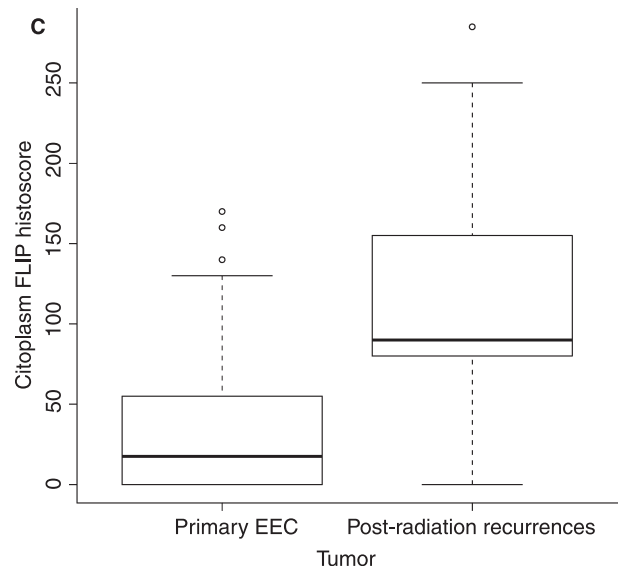
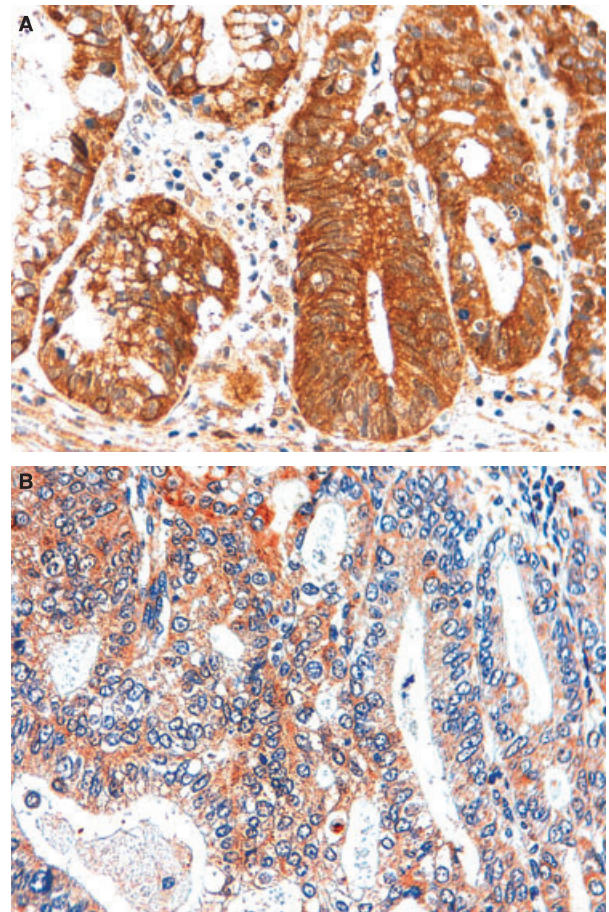
**Figure 3.** A,  $\beta$ -Catenin nuclear expression in a recurrent tumour. B, Partial representative nucleotide sequence of sense strand of exon 3 of *CTNNB1*, showing the wild-type sequence.

$P < 0.0001$ ; c-Rel,  $P = 0.0077$ ; RelB,  $P = 0.0157$ ), as compared with primary EECs (Figure 5). Finally, as expected, HIF-1 $\alpha$  showed nuclear staining more frequently among post-radiation recurrences than among primary EECs ( $P = 0.0001$ ) (Figure 6).

Some of the differences were statistically significant when recurrences and primary tumours were matched for histological grade. For recurrences and primary tumours of histological grade II, we found statistically significant differences for p50 ( $P = 0.0006$ ), and FLIP ( $P = 0.0073$ ). For recurrences and primary tumours of histological grade III, we found statistically significant differences for p50 ( $P = 0.0010$ ), FLIP ( $P = 0.0014$ ), and HIF-1 $\alpha$  ( $P = 0.0065$ ).

**CTNNB1 MUTATION RESULTS**

None of the 14 post-radiation recurrence tumour samples with nuclear  $\beta$ -catenin staining showed a *CTNNB1* mutation. Figure 3B shows a partial representative nucleotide sequence of the sense strand of one of the samples, indicating an absence of point mutations.



**Figure 4.** A, B, Cytoplasmic expression of FLICE-inhibitory protein (FLIP) was higher in recurrent tumours (A) than in primary endometrioid carcinomas (EECs) (B). (C) Box-plot comparison.



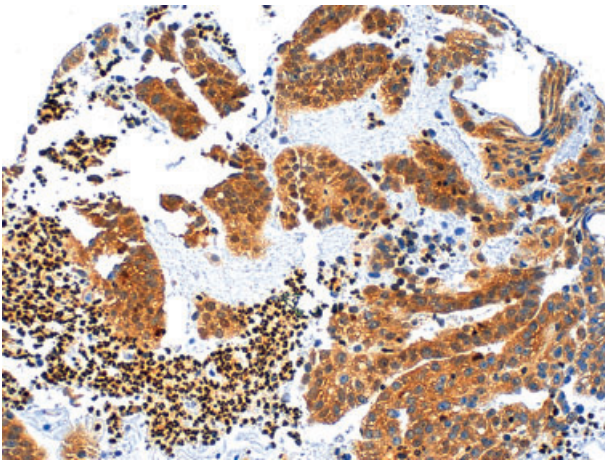


Figure 5. Nuclear staining for p50 in a post-radiation recurrence.

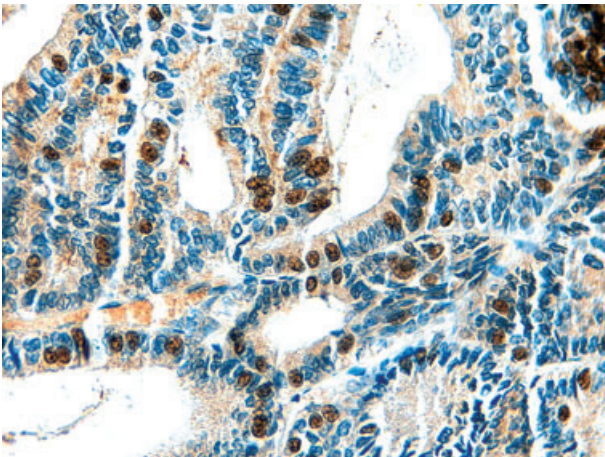


Figure 6. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression in a post-radiation recurrence.

#### CELL CULTURE RESULTS

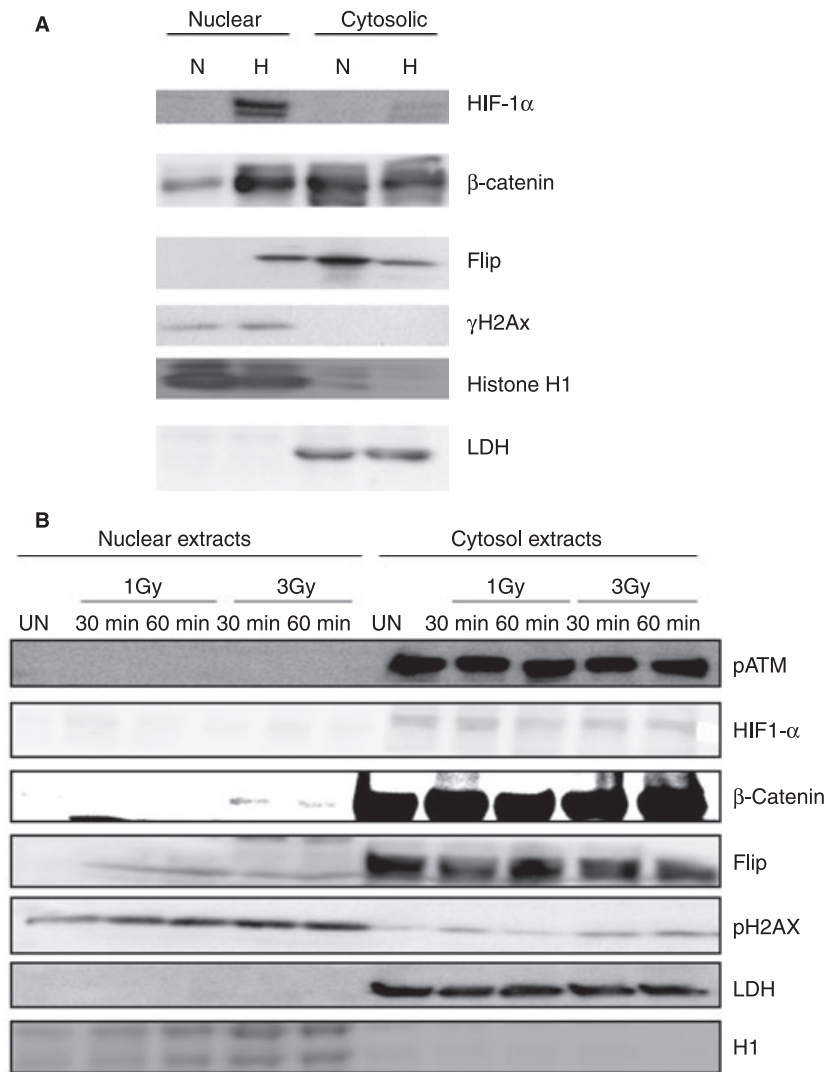
Exposure of the Ishikawa cell line to hypoxia induced nuclear translocation of HIF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -catenin, which correlated with the immunohistochemical results in post-radiation recurrences (Figure 7A). There was also some degree of nuclear translocation of FLIP. In contrast, nuclear translocation of HIF-1 $\alpha$  and FLIP was not detected when Ishikawa cell lines were exposed to ionising radiation (Figure 7B). Low-level expression of  $\beta$ -catenin was seen in nuclear extracts when Ishikawa cells were exposed to 3 Gy, but was not detected at 1 Gy. Increased NF- $\kappa$ B activity as measured by the luciferase assay was seen when the Ishikawa cell line was exposed to hypoxia, but not when it was exposed to radiation (Figure 8).

## Discussion

Some investigators have addressed the molecular mechanisms involved in resistance to radiotherapy in EC. PR expression and polymorphisms in the gene coding for PR seem to play an important role. In one series, low PR expression tended to be associated with recurrent disease, and PR expression in tumours from patients carrying one specific DNA polymorphism (the so-called *PROGINS* allele) was predictive of the risk of recurrence.<sup>19</sup> Defective mismatch repair has also been investigated in this setting. In one study, MLH-1 promoter methylation and decreased MLH-1/MSH-2 expression were not predictive of recurrence in stage I EC, but *de-novo* MLH-1 promoter methylation was occasionally detected during tumour progression in patients receiving radiation therapy.<sup>20</sup> In another study, alterations in the p53 suppressor gene were assessed in a series of patients with ECs with and without recurrences. In this series, p53 overexpression was significantly predictive for recurrence and was mostly not correlated with p53 mutations.<sup>21</sup> Finally, three components of the Wnt pathway (APC,  $\beta$ -catenin, and E-cadherin) were evaluated in a small series of patients with stage I EC in respect to the development of recurrence. In this study, absence of E-cadherin expression was predictive for distant metastasis, but not for local recurrence, whereas nuclear localization of  $\beta$ -catenin was not predictive of recurrent disease.<sup>22</sup>

Increasing evidence indicates that adaptation to hypoxia may play a significant role in resistance to radiotherapy in cancer.<sup>23</sup> In one study, microvessel density and the expression of HIF-1 $\alpha$  and its target gene, encoding carbonic anhydrase IX, were studied in primary and recurrent ECs. These three parameters were not significantly different in patients with primary ECs with and without recurrence, but HIF-1 $\alpha$  expression was higher in recurrent ECs than in primary tumours. HIF-1 $\alpha$  expression correlated with p53 immunostaining in primary ECs, but not in recurrent tumours.

In this study, we compared the immunohistochemical staining pattern for several proteins in tumour tissue from a series of patients with recurrent tumours and a series of patients with primary EECs. Special attention was given to proteins related to cell differentiation (ER and PR), cell proliferation (Ki67), apoptosis resistance (FLIP and NF- $\kappa$ B), and hypoxia (HIF-1 $\alpha$ ), and genes involved in EC development or progression (the genes encoding  $\beta$ -catenin, E-cadherin, MLH-1, MSH-2, and p53). First, post-radiation recurrences showed higher histological grade and increased Ki67 staining ( $P = 0.0012$ ). We also found decreased

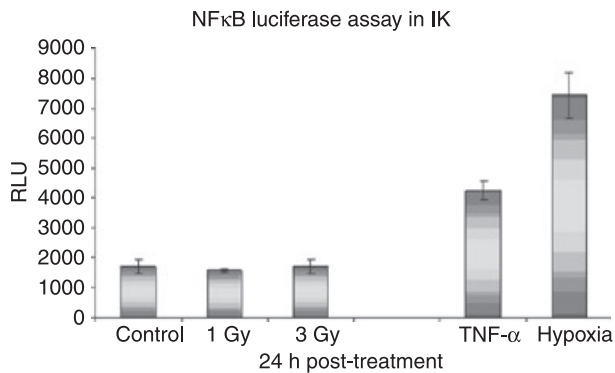


**Figure 7.** Western blot analysis of the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin and FLICE-inhibitory protein (FLIP) in Ishikawa cells subjected to hypoxia and radiation. **A**, HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin and FLIP showed nuclear translocation when Ishikawa cells were subjected to hypoxia. Ishikawa cells were either maintained under normoxia (N) or subjected to hypoxia (H) for 24 h, and nuclear and cytoplasmic lysates were analysed with HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin and FLIP antibodies. **B**, HIF-1 $\alpha$  and FLIP did not show nuclear translocation when Ishikawa cells were subjected to radiation.  $\beta$ -Catenin showed low-level nuclear translocation at 3 Gy, but not at 1 Gy. Ishikawa cells were maintained under normoxia and subjected to radiation for 30 and 60 min at 1 Gy and 3 Gy. Nuclear and cytoplasmic lysates were analysed with HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin and FLIP antibodies. Membranes were also incubated with anti-histone H1 (a marker of the nuclear fraction), pATM (a marker of the cytoplasmic fraction under radiation), pH2AX (marker of the nuclear fraction under radiation), and anti-lactate dehydrogenase (cytoplasmic fraction).

expression of PR in recurrent tumours in comparison with primary ECs, but the differences were not statistically significant. On the other hand, p53 expression was statistically higher in patients with post-radiation recurrences. Also, HIF-1 $\alpha$  expression was higher in recurrent ECs than in primary tumours, as described previously.<sup>23</sup> As expected, HIF-1 $\alpha$  nuclear expression was evident when Ishikawa cells were subjected to hypoxia. It has been shown previously that HIF-1 is involved in adaptive responses to intratumoral hypoxia and resistance to radiation therapy in different types of

tumour.<sup>24,25</sup> Interestingly, nuclear expression of HIF-1 $\alpha$  was not obtained after exposure of Ishikawa cells to radiation.

This study included several genes, such as those encoding FLIP and members of the NF- $\kappa$ B family, that are important in apoptosis resistance in EC. NF- $\kappa$ B encompasses different members of a family of transcription factors involved in the regulation of genes encoding cytokines, cytokine receptors, and cell adhesion molecules.<sup>26,27</sup> Recent studies have indicated a role for NF- $\kappa$ B in carcinogenesis, by regulating genes



**Figure 8.** Nuclear factor kappaB (NF-κB) transcriptional activity was increased when Ishikawa cells were subjected to hypoxic conditions, but not under radiation. Ishikawa cells were transfected with the NF-κB-luciferase reporter construct, and treated with 50 ng/ml tumour necrosis factor-α (TNF-α) or exposed to either hypoxia for 24 h or radiation (1 and 3 Gy). Cell lysates were assayed for luciferase activity. Results are expressed as relative luciferase units.

involved in apoptosis, the cell cycle, differentiation, and cell migration. There are five known members of the NF-κB family: p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), c-Rel, RelB, and p65 (RelA). These proteins share a Rel homology domain, which controls DNA binding, dimerization, and interactions with inhibitory factors known as IκB (IκBα, IκBβ, IκBε, and bcl-3). Heterodimers of NF-κB are present in the cytoplasm bound to IκB proteins. Under the influence of appropriate stimuli, inducible phosphorylation of IκB by the IKB kinase complex is a signal for its subsequent ubiquitination and proteasome-mediated degradation, leading to NF-κB nuclear translocation and transcriptional activation. In other words, detection of nuclear translocation of NF-κB subunits is indicative of their activation and the transcription of target genes involved in apoptosis, the cell cycle, differentiation, and cell migration. Activation of NF-κB family members has been detected in primary ECs (both endometrioid and non-endometrioid) (p50, 20%; p65, 16.5–21.9%; p52, 9.3%; c-Rel, 48.9%; RelB, 15.7%).<sup>13</sup> On the other hand, an important protein responsible for resistance to the extrinsic apoptotic pathway (triggered by FasL and TRAIL) is FLIP.<sup>28</sup> FLIP shares a high degree of homology with caspase-8, but lacks protease activity. High levels of FLIP are found in many tumour tissues. FLIP is frequently expressed in ECs (both endometrioid and non-endometrioid), and is regulated by CK2, a serine/threonine kinase that has also been implicated in cell growth, differentiation, proliferation, and apoptosis, and has been shown to be deregulated in several kinds of tumour.<sup>15,16</sup> High levels of FLIP compete with

caspase-8, resulting in inhibition of apoptosis. In a previous study, we showed that inhibition of FLIP expression sensitized EC cells to TRAIL-induced apoptosis.<sup>15</sup> The results obtained herein demonstrate that cytoplasmic FLIP is statistically significantly expressed in recurrent tumours, in comparison with primary tumours. Moreover, post-radiation recurrences exhibited increased nuclear expression of FLIP, but the differences did not reach statistical significance. Exposure of Ishikawa cells to hypoxia revealed some degree of nuclear translocation of FLIP. However, exposure of Ishikawa cells to radiation did not result in increased cytoplasmic or nuclear expression of FLIP. These results suggest that the increase in FLIP levels in post-radiation recurrences may be related in part to an adaptive response to hypoxia, but it is probably associated with the proposed role of FLIP in distant tumour formation.<sup>29</sup> The present study has also shown frequent NF-κB subunit (p50, c-Rel, and RelB) nuclear translocation in EC recurrences. Interestingly, when Ishikawa cells were subjected to hypoxic conditions, there was increased NF-κB activity, as measured by a luciferase assay. NF-κB activation was not observed when Ishikawa cells were subjected to radiation. These proteins (FLIP and NF-κB family members) have also been related to resistance to chemotherapy and radiation therapy in some other tumours. For example, previous studies have shown that *in-vitro* inhibition of FLIP sensitizes human cervical Hela cells to radiotherapy.<sup>30</sup> Moreover, NF-κB has been implicated in adaptive resistance to radiation.<sup>31</sup> There is much evidence suggesting that NF-κB, together with ATM, modulates the development of radioresistance in irradiated tumour cells.<sup>32</sup>

With regard to proteins involved in the Wnt signalling pathway, decreased E-cadherin levels and a high frequency of β-catenin nuclear translocation were seen in post-radiation recurrences as compared with primary ECs. β-Catenin, encoded by *CTNNB1*, is a component of the E-cadherin–catenin unit, which is very important in cell differentiation and maintenance of the normal tissue architecture, and is also key for signal transduction. Increased cytoplasmic and nuclear levels of β-catenin produce transcriptional activation of target genes (those encoding c-Myc, cyclin D1, and others) through the LEF/TCF pathway. APC down-regulates β-catenin levels by cooperating with glycogen synthase kinase-3β, inducing phosphorylation of the serine/threonine residues encoded in exon 3 of *CTNNB1*, and the degradation of β-catenin through the ubiquitin–proteasome pathway. In ECs, mutations in exon 3 of *CTNNB1* result in protein stabilisation, cytoplasmic and nuclear accumulation, and

participation in signal transduction and transcriptional activation through the formation of complexes with DNA-binding proteins. Mutation in exon 3 of *CTNNB1* with nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin occurs in 10–44% of ECs.<sup>10,33,34</sup> Although there are controversial data regarding the prognostic significance of  $\beta$ -catenin mutations in ECs, they have been associated with a relatively good prognosis. In our series, nuclear localization of  $\beta$ -catenin was seen in 13% of primary ECs, and *CTNNB1* mutations were identified in 20% of them (data not shown). In contrast, nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin was seen in the vast majority of post-radiation recurrences (66.7%), without an association with *CTNNB1* mutations. Interestingly, nuclear translocation of  $\beta$ -catenin also occurred when Ishikawa cells were subjected to hypoxia. We observed low levels of nuclear  $\beta$ -catenin when Ishikawa cells were exposed to radiation at 3 Gy, but not at 1 Gy. These results suggest that EC cells, when subjected to hypoxia, show activation of the Wnt signalling pathway, promoting  $\beta$ -catenin nuclear accumulation, in the absence of *CTNNB1* mutations. Again, previous experimental studies have suggested a role for the Wnt signalling pathway in radiation resistance in some tissues, such as mammary cells.<sup>35</sup> Interestingly, there is one report of the activation of  $\beta$ -catenin as a result of nuclear localization of FLIP.<sup>36</sup> In our post-radiation recurrences, there was frequent nuclear expression of these two proteins. FLIP nuclear expression has also been detected in other types of cancer, with immunohistochemistry and TMA technology.<sup>37</sup> Moreover, decreased E-cadherin expression in post-radiation recurrences may be explained by the development of epithelial to mesenchymal transition features during the process of metastasis.

In summary, our results suggest that genes that are important in resistance to apoptosis and hypoxia may play a significant role in adaptation of tumour cells to radiation therapy and hypoxia. Moreover, under these circumstances, tumour cells activate the Wnt signalling pathway, as well as HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B, promoting the transcription of target genes. These results give support to the possible use of drugs targeting these proteins as adjuvant therapy to increase the efficacy of radiation therapy.

## Acknowledgements

This work was supported by grants FIS PI070276, FIS PI100922, FIS PI070304, Marató de TV3 2005-47, 2009SGR794, RD06/0020/0013, RD06/0020/1034 and programa de intensificaci3n de la investigaci3n, Instituto Carlos III. X. Dolcet holds a postdoctoral

fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028). A. Yeramian holds a postdoctoral fellowship from Programa Juan de la Cierva, Ministerio de Ciencia e Innovaci3n (JCI-2008-1969). L. Bergada holds a fellowship from Fundaci3n Alicia Cuello de Merig3. Tumour samples were obtained with the support of Xarxa catalana de Bancs de Tumors, the Tumour Bank Platform of RTICC and RD09/0076/00059.

## References

1. Bockman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1983; **15**: 10–17.
2. Matias-Guiu X, Catusas L, Bussaglia E *et al.* Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum. Pathol.* 2001; **32**: 569–577.
3. Catusas L, Gallardo A, Cuatrecasas M *et al.* Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Mod. Pathol.* 2009; **22**: 522–529.
4. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL *et al.* A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 2004; **92**: 744–751.
5. Yeramian A, Santacana M, Sorolla A *et al.* Nuclear factor- $\kappa$ B2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF-1 $\alpha$  independent manner. *Lab. Invest.* 2011; **91**: 859–871.
6. Catus3s Ll, Mach3n P, Matias-Guiu X *et al.* Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinico-pathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum. Pathol.* 1998; **29**: 1160–1164.
7. Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X *et al.* PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum. Pathol.* 2000; **31**: 312–317.
8. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J *et al.* PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.* 2006; **37**: 1465–1472.
9. Lagarda H, Catusas Ll, Argu3lles RM *et al.* k-RAS mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J. Pathol.* 2001; **193**: 193–199.
10. Machin P, Catusas L, Pons C *et al.* CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum. Pathol.* 2002; **33**: 206–212.
11. Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female organs.* Lyon: IARC Press, 2003.
12. Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2009; **105**: 109–110.
13. Pallares J, Mart3nez-Guitarte JL, Dolcet X *et al.* Abnormalities in NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J. Pathol.* 2004; **204**: 569–577.
14. Pallares J, Mart3nez-Guitarte JL, Dolcet X *et al.* Survivin expression in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2005; **24**: 247–253.
15. Dolcet X, Llobet D, Pallares J *et al.* FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab. Invest.* 2005; **85**: 885–894.
16. Pallares J, Llobet D, Santacana M *et al.* CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 2009; **174**: 287–296.
17. Pallar3s J, Velasco A, Eritja N *et al.* Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular

- alterations of endometrial carcinoma. *Mod. Pathol.* 2008; **21**: 691–699.
18. Pallares J, Santacana M, Puente S *et al.* A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2009; **31**: 217–226.
  19. Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC *et al.* Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *J. Pathol.* 2005; **205**: 597–605.
  20. Pijnenborg JM, Dam-de Veen GC, de Haan J *et al.* Defective mismatch repair and the development of recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2004; **94**: 550–559.
  21. Pijnenborg JM, van de Broek L, Dam de Veen GC *et al.* TP53 overexpression in recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2006; **100**: 397–404.
  22. Pijnenborg JM, Kisters N, van Engeland M *et al.* APC, beta-catenin, and E-cadherin and the development of recurrent endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2004; **14**: 947–956.
  23. Pijnenborg JM, Wijnakker M, Hagelstein J *et al.* Hypoxia contributes to development of recurrent endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2007; **17**: 897–904.
  24. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004; **5**: 405–406.
  25. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Li G *et al.* Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene* 2007; **26**: 7508–7516.
  26. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; **25**: 280–288.
  27. Chen F, Castranova V, Shi X *et al.* New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* 2001; **59**: 387–397.
  28. Thome M., Schneider P. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; **386**: 517–521.
  29. Mawji IA, Simpson CD, Hurren R *et al.* Critical role for Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein in anoikis resistance and distant tumor formation. *J. Natl Cancer Inst.* 2007; **99**: 811–822.
  30. Luo A, Wang W, Sima N *et al.* Short hairpin RNA targeting c-FLIP sensitizes human cervical adenocarcinoma HeLa cells to chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Lett.* 2008; **271**: 323–332.
  31. Ahmed KM, Li JJ. NF-kB mediated adaptative resistance to ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; **44**: 1–13.
  32. Ahmed K, Li JJ. ATM-NF-kB connection as a target for tumor radiosensitization. *Curr. Cancer Drug Targets* 2007; **7**: 335–342.
  33. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Prat J *et al.* Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002; **21**: 7981–7990.
  34. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL *et al.* Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod. Pathol.* 2000; **13**: 1066–1071.
  35. Woodward WA, Chen MS, Behbod F *et al.* WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; **104**: 618–623.
  36. Katayama R, Ishioka T, Takada S *et al.* Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L. *J. Cell Sci.* 2010; **123**: 23–28.
  37. Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF *et al.* Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2007; **13**: 5070–5075.

### 3.2 Objectiu 1B

#### **Estudi del paper de les vies de senyalització que permeten al EC adaptar-se a la hipòxia**

*Andree Yeramian, Maria Santacana, Anabel Sorolla, et al. **The nuclear factor  $\kappa$ B2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF1 $\alpha$  independent manner.** Laboratory investigation 2011;91:859-871*

1. Les recidives post radioteràpia de EC presenten expressió nuclear de HIF-1 $\alpha$ , RelA (p65) i p52.
2. Les línies cel·lulars de EC sota condicions d'hipòxia presenten índexs de supervivència elevats.
3. La translocació nuclear de NF- $\kappa$ B i l'activitat transcripcional induïda per hipòxia requereix la presència tant de la cinasa IKK $\alpha$  com de IKK $\beta$ .
4. La hipòxia induïx l'activació de la via alternativa de NF- $\kappa$ B mitjançant una acumulació de p100 dependent de IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  i un processament de p52 dependent de IKK $\alpha$ .
5. RelA (p65) i p52 promouen la supervivència de la línia cel·lular de EC Ishikawa sota condicions d'hipòxia.
6. HIF-1 $\alpha$  controla l'activació de la via clàssica NF- $\kappa$ B sota condicions d'hipòxia en la línia cel·lular de EC Ishikawa i intervé en la supervivència cel·lular del EC sota tensions baixes d'oxigen.



# Nuclear factor- $\kappa$ B2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF-1 $\alpha$ independent manner

Andree Yeramian<sup>1,\*</sup>, Maria Santacana<sup>1,\*</sup>, Anabel Sorolla<sup>1</sup>, David Llobet<sup>1</sup>, Mario Encinas<sup>2</sup>, Ana Velasco<sup>1</sup>, Nuria Bahi<sup>1</sup>, Nuria Eritja<sup>1</sup>, Mónica Domingo<sup>1</sup>, Esther Oliva<sup>3</sup>, Xavier Dolcet<sup>1</sup> and Xavier Matias-Guiu<sup>1</sup>

Endometrial carcinoma (EC) is a common female cancer, treated mainly by surgery and adjuvant radiotherapy. Relapse following treatment is associated with increased risk of metastases. Hypoxia, a common microenvironment in solid tumors, correlates with malignant progression, rendering tumors resistant to ionizing therapy. Hence, we assessed here the immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and members of the NF- $\kappa$ B family in 82 primary EC and 10 post-radiation recurrences of EC. Post-radiation recurrences were highly hypoxic, with a higher expression of HIF-1 $\alpha$  and also RelA (p65) and p52 when compared with primary EC. We next investigated the effects of hypoxia on EC cell lines. We found that EC cell lines are highly resistant to hypoxia-induced apoptosis. We thus focused on the molecular mechanisms involved in conferring hypoxic cell death resistance. We show that in addition to the classical NF- $\kappa$ B, hypoxia activates the alternative NF- $\kappa$ B pathway. To characterize the upstream kinases involved in the activation of these pathways, we used lentiviral-mediated knockdown and mouse embryonic fibroblasts lacking IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases. Both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases are required for RelA (p65) and p100 accumulation, whereas p52 processing under hypoxia is IKK $\alpha$  dependent. Furthermore, Ishikawa endometrial cell line harboring either RelA (p65) or p52 short-hairpin RNA was sensitive to hypoxia-induced cell death, indicating that, in addition to the known prosurvival role of RelA (p65) under hypoxia, alternative NF- $\kappa$ B pathway also enhances hypoxic survival of EC cells. Interestingly, although HIF-1 $\alpha$  controlled classical NF- $\kappa$ B activation pathway and survival under hypoxia through RelA (p65) nuclear accumulation, the alternative pathway was HIF-1 $\alpha$  independent. These findings have important clinical implications for the improvement of EC prognosis before radiotherapy.

*Laboratory Investigation* (2011) 91, 859–871; doi:10.1038/labinvest.2011.58; published online 2 May 2011

**KEYWORDS:** apoptosis; hypoxia; IKK $\alpha$ ; IKK $\beta$ ; NF- $\kappa$ B

Cellular hypoxia occurs in most, if not all, solid tumors as a consequence of imbalance between oxygen supply and tumor growth. Clinical evidences link tumor hypoxia with cancer progression, metastasis formation and resistance to both radiotherapy and chemotherapy.<sup>1,2</sup> In endometrial carcinoma (EC), hypoxia has been associated with myometrial invasion and development of recurrences after radiotherapy. Hypoxic microenvironment, characterized by acidosis and low nutrient availability, induces both cellular and genomic adaptation mechanisms enabling cancer cells to adapt to stress, promoting thereby more aggressive tumor behavior and resistance to therapy.<sup>3</sup> Although genomic adaptation results in

genomic instability, allowing outgrowth of resistant cancer clones, cellular adaptation to low oxygen is a process achieved through a number of mechanisms such as angiogenesis and transition from oxidative phosphorylation to glycolysis, and is mainly controlled by hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor. Although multiple stimuli have been shown to induce HIF-1 activation, such as bacteria<sup>4</sup> or estrogens,<sup>5</sup> its accumulation is mainly regulated by hypoxia. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor consisting of two subunits HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . Although HIF-1 $\beta$  or ARNT is constitutively expressed, HIF-1 $\alpha$ 's protein stability is oxygen dependant. HIF-1 $\alpha$  protein level is maintained low

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics, Laboratori de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, University of Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain; <sup>2</sup>Department of Experimental Medicine, IRBLleida, Lleida, Spain and <sup>3</sup>Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA  
Correspondence: Dr A Yeramian, Department of Pathology and Molecular Genetics, Laboratori de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Univeristy of Lleida, IRBLleida, Av Rovira Roure 80, Lleida 25198, Spain.

E-mail: andree.yeramian@cmb.udl.es

\*These are the first authors.

Received 1 September 2010; revised 4 November 2010; accepted 4 November 2010



under aerobic conditions. Such control is exerted by a class of prolyl hydroxylases, which in the presence of oxygen hydroxylate HIF-1 $\alpha$  at two proline residues (Pro 402 and 564). Hydroxylation of proline residues is a requisite step for recognition and binding to Von Hippel–Lindau protein, which will target HIF-1 $\alpha$  for ubiquitination and proteasomal degradation.<sup>6</sup> Under hypoxia, HIF-1 $\alpha$  is no longer degraded by the proteasome, gets stabilized, shuttles to the nucleus, dimerizes with HIF-1 $\beta$  and initiates transcription of specific genes involved in glycolysis, angiogenesis and oxygen homeostasis.<sup>7</sup> HIF-1 induces the expression of glycolytic enzymes and glucose transporters, enabling thereby cancer cell survival by controlling sufficient ATP production. HIF-1 $\alpha$  also controls tumor's angiogenesis by inducing the transcription of VEGF,<sup>8</sup> thereby increasing oxygen availability. Although HIF-1 $\alpha$  appears as the master regulator of oxygen homeostasis under hypoxia, other transcription factors are activated under low oxygen tension such as NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B is a family of transcription factors activated by a broad variety of stimulus, such as cytokines, ionizing radiation, chemotherapeutic drugs<sup>9</sup> and that control different molecular events, such as stress responses, cell viability, angiogenesis and tumor progression.<sup>10</sup> The NF- $\kappa$ B family is composed of five structurally related subunits that belong to two classes: The first class consists of RelA (p65), RelB and c-Rel, synthesized as mature forms, whereas the second class consists of large precursors NF- $\kappa$ B1 (p105) and NF- $\kappa$ B2 (p100), which undergo processing through the ubiquitin proteasome pathway to generate the mature NF- $\kappa$ B subunits p50 and p52, respectively. The NF- $\kappa$ B canonical pathway proceeds through phosphorylation of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex composed of two catalytic subunits (IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ ) and the scaffold essential subunit (IKK $\gamma$ /NEMO), followed by the phosphorylation of I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B) at serine 32 and 36 residues, which will target I $\kappa$ B proteins for ubiquitin-dependent degradation, allowing freed NF- $\kappa$ B dimers composed of RelA, c-Rel and p50 to translocate to the nucleus.<sup>11</sup> Both cytokine-induced I $\kappa$ B degradation and RelA/p50 heterodimers translocation into the nucleus have been shown to depend predominately on IKK $\beta$ .<sup>12</sup> The non-canonical or alternative pathway involves NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK)-mediated activation of IKK $\alpha$  homodimers, which will proteolytically remove the I $\kappa$ B-like C-terminal domain of NF- $\kappa$ B2 (p100), allowing p52, which preferentially dimerizes with RelB, to shuttle to the nucleus.<sup>13</sup> The activation of both canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways is increased in a wide variety of tumors including EC.<sup>14</sup>

Elucidation of cell survival pathways under hypoxic conditions may provide insights into the causes of therapy resistance, and thereby open the way to new therapeutic approaches. In the present work, we found an increased expression of HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B family members RelA (p65) and p52 in post-radiation recurrences of EC. Moreover, we show that EC cell lines present a high degree of cell adaptation to hypoxia. By using knockout murine embryonic

fibroblasts (MEFs) and lentiviral-mediated knockdown, we show that hypoxia induces NF- $\kappa$ B activity and that this response requires both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases. Furthermore, although the classical NF- $\kappa$ B is the major pathway activated under hypoxia, we show for the first time that low oxygen tension induces the activation of the alternative pathway by promoting p100 accumulation, followed by p52 processing. Activation of both classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways confers apoptotic resistance to hypoxic cells. As a cross-talk between NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  activation pathways has been reported at different levels, and given the fact that HIF-1 $\alpha$  correlates with a subtype of EC aggressiveness,<sup>15</sup> we next checked for the importance of HIF-1 $\alpha$  in controlling cell survival. We show that HIF-1 $\alpha$  is necessary for EC cell survival under hypoxia. HIF-1 $\alpha$  controls NF- $\kappa$ B classical pathway signaling, whereas its presence is not required for the activation of the alternative pathway.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue Microarrays

Two tissue microarrays (TMAs) were constructed. The first one contained samples of 11 post-radiation recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium (EECs), which were obtained from the Departments of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Spain. The second TMA was constructed from paraffin-embedded blocks of 82 EECs, previously evaluated for microsatellite instability, alterations in PTEN, PIK3CA, K-RAS and  $\beta$ -catenin.<sup>16</sup> They were obtained from the Departments of Pathology of Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Spain, and none of them corresponded to the primary tumors of the same patients with the post-radiation recurrences. The tumors were collected during the period 1996–2007, and they were classified following the most recent World Health Organization criteria. They were surgically staged and graded according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging and grading systems.<sup>17</sup> They included 26 grade I EECs, 35 grade II and 21 grade III EECs. The study was approved by the local ethics committee, and a specific informed consent was used.

A Tissue arrayed device (Beecher Instrument, MD) was used to construct the TMA. Briefly, all the samples were histologically reviewed, and representative areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm as largest diameter) from two different areas were included in each case. Control normal tissues from the same EC specimens were also included.

### Immunohistochemical Study

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m, dried for 16 h at 56° before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series, and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat

treatment in a pressure cooker for 2 min in EDTA (pH: 8.9). Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (DAKO) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were also tested.

Immunohistochemical results were evaluated by two pathologists by following uniform pre-established criteria. As each TMA included two different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was done after examining both samples.

### Antibodies and Reagents

Antibodies to p65, RelB, FADD, Histone H1 and cyclin D1 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies to p100/52, caspase 9 and active caspase 3 were from Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-pan ERK antibodies were purchased from BD Biosciences. Anti-caspase 8, anti-IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  antibodies were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Monoclonal antibody to tubulin was from Sigma (St Louis, MO). Antibody against lactate dehydrogenase used as a specific marker of cytosolic fraction was obtained from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA.). Peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies were from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden).

### Cell Lines, Culture Conditions and Transfection

The Ishikawa 3-H-12 cell line (IK) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). KLE cells were a gift from Dr Palacios (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid). RL-95/2 and HEC-1-A cells were a gift from Dr Reventos (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona). Mouse embryonic fibroblasts were a gift from Dr M Karin. Hypoxia (0.2% O<sub>2</sub>, 94.8% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) was achieved using an *In Vivo* 2 hypoxic workstation (Ruskin Technologies). All cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Sigma) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 mM HEPES (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Sigma) and 1% of penicillin/streptomycin (Sigma) at 37°C with saturating humidity and 5% CO<sub>2</sub>. When indicated, transfection plasmid constructs were prepared by Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

### Lentiviral Production and Infection

Lentiviral-based vectors for RNA interference-mediated gene silencing (FSVsi) consisted on an U6 promoter for expression of short-hairpin RNAs (shRNAs) and the Venus variant of YFP under the control of an SV40 promoter for monitoring transduction efficiency. Oligonucleotides to produce plasmid-based shRNA were cloned into the FSVsi vector using *AgeI*-*Bam*HI restriction sites. Lentiviral particles were pro-

duced in 293T human embryonic kidney cells cotransfected by the calcium phosphate method with the above plasmid plus plasmids coding for the envelope and the packaging systems (VSV-G and  $\Delta$ 8.9, respectively).

The 293T cells were allowed to produce lentiviral particles during 3–4 days in the same culture medium of the cultured cells. Culture medium was collected, centrifuged for 10 min at 2500 r.p.m., filtered through a 0.45  $\mu$ m filter (Millipore, Bedford, MA) and then concentrated by centrifugation through a filter column of 100 kDa (VWR International LLC, West Chester, PE, USA) for 1 h at 4000 r.p.m. Cells were incubated overnight in the presence of medium containing lentiviral particles. After this period, medium was replaced by fresh medium and cells were incubated for two additional days to allow endogenous protein knockdown or protein overexpression.

### Sequences of shRNAs

Specific knockdown was achieved using the following sequences for generation of shRNAs:

IKK $\alpha$ : 5'-GCAGGCTCTTTCAGGGACA-3'  
 IKK $\beta$ : 5'-AAAGTGTCTCAGCTGTATCCT-3'  
 P65: 5'-ACACTGCCGAGCTCAAGATCT-3'  
 P100/52: 5'-AAGATGAAGATTGAGCGGCCT-3'  
 HIF-1 $\alpha$ : 5'-CCAGTTATGATTGTGAAGTTA-3'

### Plasmids

The luciferase construct containing five NF- $\kappa$ B sites (NF- $\kappa$ B-LUC) (Stratagene, AF 053315) was a gift from Dr Giles Hardingham. Plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase was a gift from Mari Carmen Ruiz. Lentiviral luciferase plasmid carrying five NF- $\kappa$ B sites in its promoter was constructed using the Gateway recombination technique. Briefly, attB1 and attB2 flanked primers were designed to amplify a construct containing 5 NF- $\kappa$ B response elements followed by a single luciferase gene from the original vector with the following sequences: attB1NF $\kappa$ BLuc:5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGTCTGGATCCAAGCTAGG-3' and attB2 NF $\kappa$ BLuc:5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACAATTTGGACTTTCCGCC-3'.

The attB PCR product obtained was purified, and a first recombination step of the PCR product with pDONR vector was performed. A second recombination step was used to transfer the construct to the lentiviral vector pDSL (ATCC). The presence of the attB PCR product in the lentiviral vector was verified by digestion restriction analysis.

### Assessment of Apoptosis

IK cells were plated on M4-well plates at 100  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well. Cells were left overnight to allow them to adhere, and then exposed to hypoxic environment for the indicated times. Alternatively in knockdown experiments, cells were plated at 20  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well and infected with the supernatant containing viruses carrying an shRNA. At 3 days after infection, cells were either maintained in normoxia or exposed to hypoxia for additional 24 h.

Hoechst staining was performed by adding Hoechst dye to final concentration of 0.5 mg/ml to each M24 well. Cells were counted under an epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### Western Blot Analysis

Endometrial adenocarcinoma cell lines were washed with cold PBS and lysed with lysis buffer (2% SDS and 125 mM Tris-HCL (pH 6.8)). Protein concentrations were determined with the Protein Assay Kit (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked in TBST (20 mM Tris-Hcl (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) plus 5% of non-fat milk for 1 h to avoid non-specific binding and then incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then incubated with peroxidase-coupled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies for 1 h, followed by chemiluminescent detection with ECL Advance (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK). Nuclear and cytoplasmic extracts were obtained using NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce).

### Cell Cycle Analysis

Analysis of cell cycle distribution was performed, as described.<sup>18</sup>

### 5-Bromodeoxyuridine Incorporation

5-Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay was performed, as described.<sup>18</sup> Nuclei were counterstained with 5 μg/ml Hoechst 33258, and cells were visualized under an epifluorescence microscope (Leica Microsystems).

### Luciferase Assay

Luciferase assay was performed, as described.<sup>9</sup>

## RESULTS

### Post-Radiation Recurrences of EC Express HIF-1α, RelA (p65) and p52

Hypoxic microenvironments are frequent in solid tumors, and tumor recurrence following irradiation has been associated with the presence of hypoxic cells. The nuclear expression of HIF-1α, and two members of the NF-κB family RelA (p65) and p52, was evaluated in a series of 82 ECs and

11 post-radiation recurrences of EC. There were statistically significant differences in the nuclear expression of HIF-1α, and the two members of the NF-κB family, RelA (p65) and p52, between primary EC and post-radiation recurrences ( $P = 0.004085$ ,  $P = 0.000026$  and  $P = 0.023049$ , respectively). Nuclear HIF-1α, RelA (p65) and p52 immunoreactivity was low in primary EC and high in post-radiation recurrences (Table 1). Post-radiation recurrences presented a strong nuclear staining for both HIF-1α and RelA (p65), whereas p52 staining was more moderate (Figure 1).

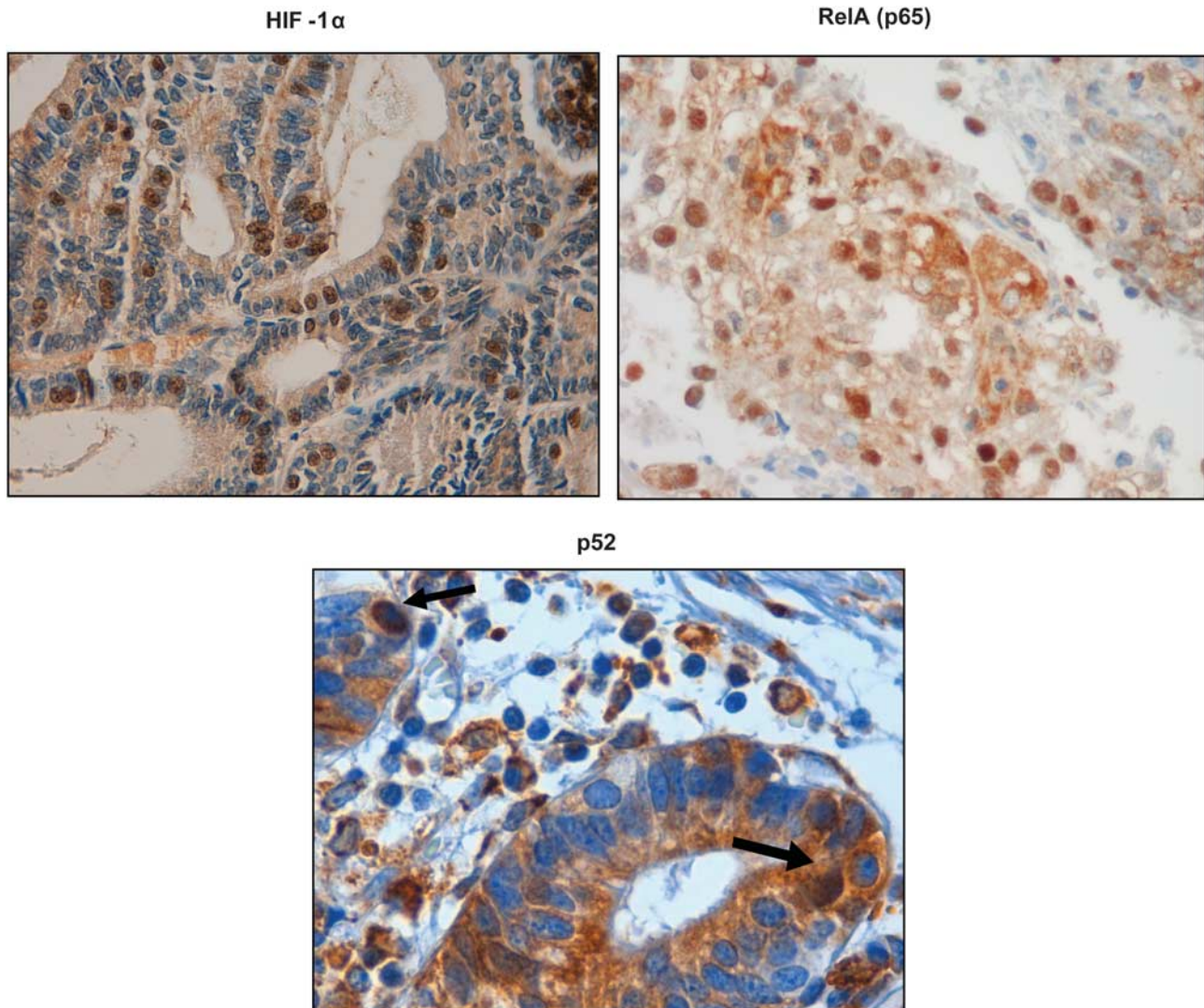
To check whether there was any association among HIF-1α, RelA and p52 with tumor grade or stage in primary EC, a statistical analysis was carried out in the 82 EECs. No significant association was found between HIF-1α expression and the tumor grade ( $P = 0.25$ ) or stage ( $P = 1$ ). Similar results were obtained with p65 with  $P$ -values of 0.22 and 0.42 for grade and stage, respectively. As for p52, its expression correlated with tumor grade ( $P = 0.0166$ ) but not with tumor stage ( $P = 1$ ).

### EC Cell Lines Present a High Survival Rate under Hypoxia

To understand the effect of hypoxia on EC cells, we first determined the cell cycle phenotype of four EC cell lines subjected to hypoxic conditions. As described in other cell lines,<sup>19</sup> a 24-h hypoxic treatment induced a net proliferative blockade of the four EC cell lines, IK, HEC-1A (HEC), RL-95 (RL) and KLE at the G0/G1 boundary (Supplementary Figure S1). Next, we focused our analysis on IK cell line. As shown in Figure 2a, hypoxic exposure induces HIF-1α accumulation, and leads to a diminution of cell proliferation rate, with a decrease of S-phase cells, of 41.73%, as measured by BrdU incorporation (Figure 2b). Moreover, hypoxic cells exhibited a considerable decrease in cyclin D1 levels compared with normoxic cells (Figure 2a). This is in accordance with the inhibition of G1-S transition known to be mediated mainly by cyclin D family proteins (D1, D2 and D3) and their associated partners, cyclin-dependant kinases.<sup>20</sup> Analysis of the sub-G1 content indicates that the four hypoxic endometrial cell lines adapt quite well to hypoxia as the sub-G1 hypoxic DNA content shows a slight increase that does not exceed 2.5% when compared with normoxic conditions (Supplementary Figure S1). Under hypoxic conditions, the number of IK cells displaying nuclear apoptotic morphology,

**Table 1 Immunohistochemical expression of HIF-1α, p52 and p65 in primary EC and post-radiation recurrences**

Protein	Primary EC			Post-radiation recurrences			P-value
	Positive	Negative	Non-assessable	Positive	Negative	Non-assessable	
HIF-1α	19	53	10	7	2	2	0.004085
P52	7	67	8	4	6	1	0.023049
P65	13	65	4	8	1	2	0.000026



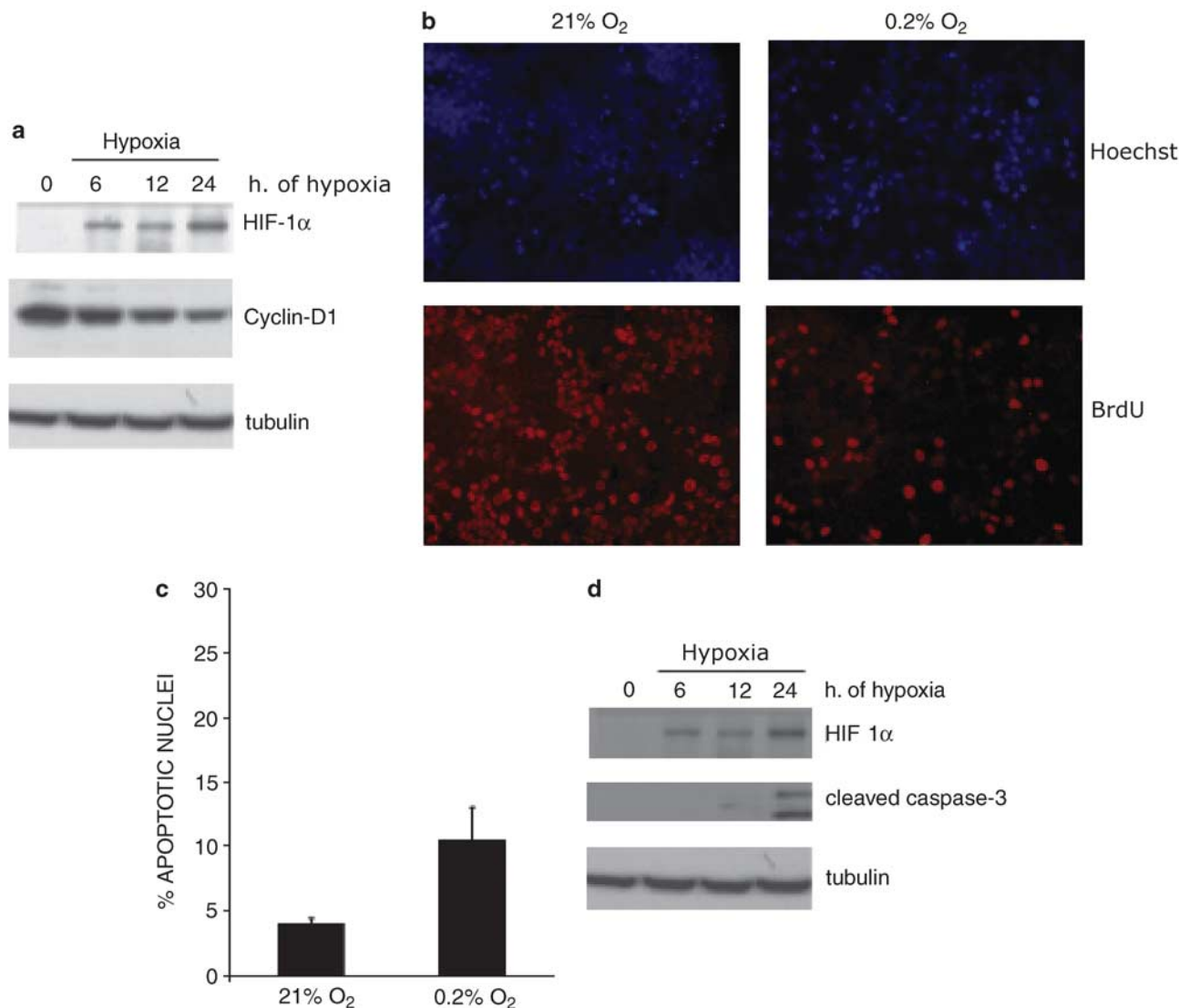
**Figure 1** Post-radiation recurrences of EC highly positive for HIF-1 $\alpha$  and RelA (p65) immunoexpression and moderately positive for p52 immunostaining.

as assessed by Hoechst staining, does not exceed 8% of the total (Figure 2c). Western blot analysis of IK cells exposed to 24 h of hypoxia confirms the apoptotic nature of this cell death, with the activation of executioner caspase 3 (Figure 2d). Overall, these results indicate that under hypoxia, a mere percentage of IK cells undergo apoptosis through the intrinsic pathway, whereas the vast majority of the IK cells, arrested at the G1/S boundary, adapt and survive under low oxygen conditions.

#### **Hypoxia-Induced NF- $\kappa$ B Nuclear Translocation and Transcriptional Activity Requires the Presence of Both IKK $\alpha$ and IKK $\beta$ Kinases**

Previous studies have shown that NF- $\kappa$ B pathway is activated under hypoxia.<sup>21</sup> However, the mechanisms involved are still controversial. Thus, we next checked for NF- $\kappa$ B activation in our model, and its possible involvement in conferring hypoxic cell death resistance. To address this point, we

carried out a NF- $\kappa$ B transcriptional activity assay. IK cells were transfected with NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter construct and exposed to hypoxic conditions for additional 24 h. TNF $\alpha$ -treated cells served as a positive control. Exposure of IK cells to hypoxia induced a marked increase in NF- $\kappa$ B activity compared with basal luciferase activity under normoxia (Figure 3a). In accordance with this result, immunoblotting of nuclear and cytoplasmic extracts revealed that hypoxia induces RelA (p65) nuclear accumulation in IK cells (Figure 3b). To gain further insight into the mechanisms of NF- $\kappa$ B activation under hypoxia, we explored the requirement of each of the upstream kinases IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . Lentiviral delivery of shRNA against IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  selectively blocked the expression of each protein (Figure 3c). As shown in Figure 3d, NF- $\kappa$ B activation by hypoxia is significantly reduced when either IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  kinase levels are downregulated, pointing to the requirement of both kinases in hypoxia-mediated NF- $\kappa$ B signaling. Furthermore,



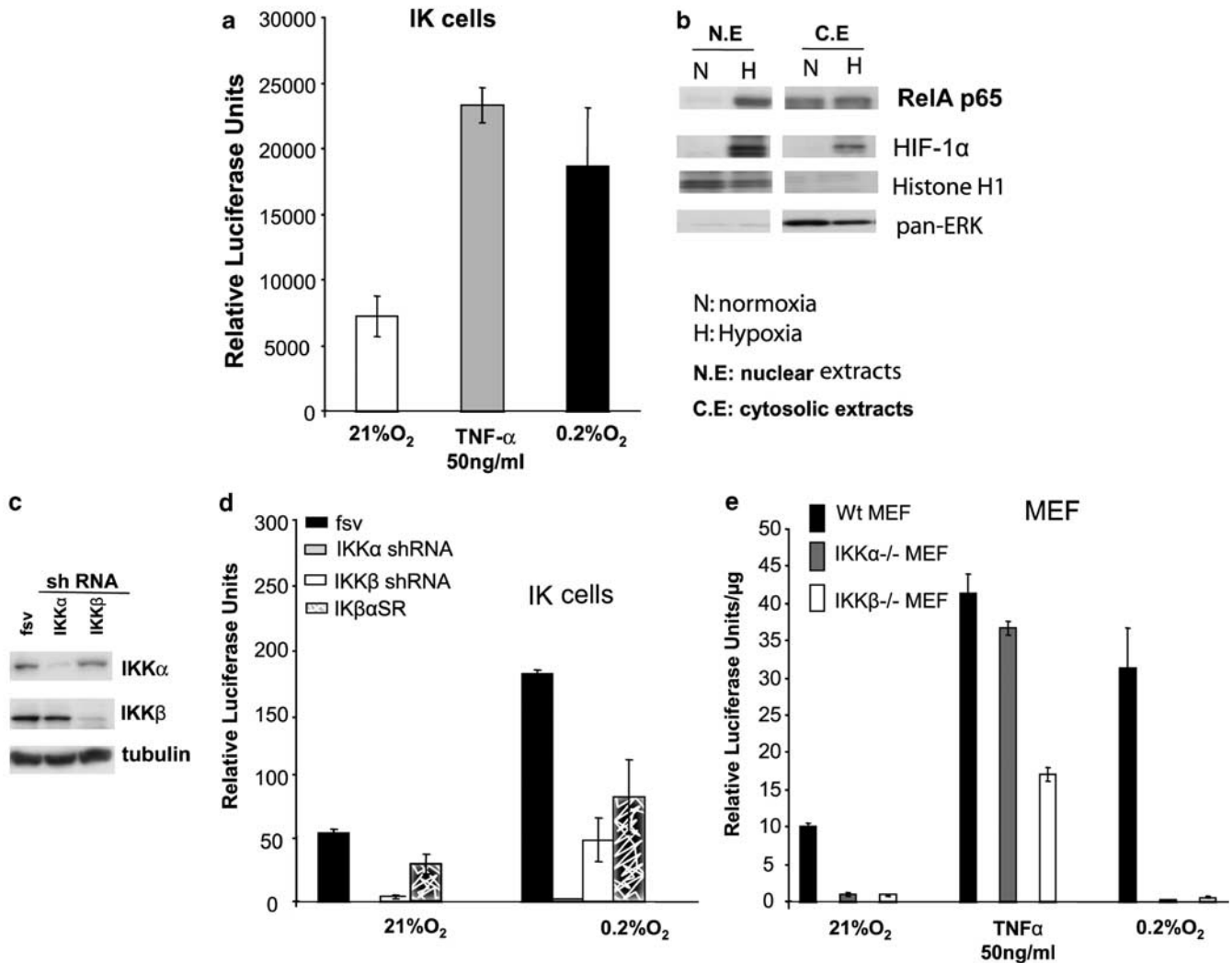
**Figure 2** Hypoxia decreases cell proliferation and induces a slight increase in apoptosis in EC cell lines. **(a)** Ishikawa (IK) cells were incubated for the indicated times under hypoxia, and cell lysates were analyzed by western blot with antibodies to HIF-1 $\alpha$ , cyclin D1 and tubulin (left graph). **(b)** IK cells were incubated for 24 h either under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or under hypoxia (0.2% O<sub>2</sub>). Pictures show 5-bromodeoxyuridine incorporation and Hoechst 33258 staining (right graph). **(c)** Quantification of apoptotic nuclei after 24 h of incubation either under normoxic (21% O<sub>2</sub>) or under hypoxic (0.2% O<sub>2</sub>) conditions. **(d)** IK cells were subjected to hypoxia for the indicated times, and cell lysates were analyzed with antibodies to HIF-1 $\alpha$ , active caspase 3 and tubulin (right graph).

overexpression of the mutated form of I $\kappa$ B $\alpha$ , carrying serine to alanine mutations at residues 32 and 36, named SR-I $\kappa$ B $\alpha$ , abrogated hypoxia-induced NF- $\kappa$ B activity (Figure 3d), supporting the notion that I $\kappa$ B $\alpha$  degradation mediates hypoxia-induced NF- $\kappa$ B activation. To check whether the requirement of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  is restricted to endometrial IK cell line, and to eliminate possible nonspecific effects due to the use of shRNA technique, we next studied NF- $\kappa$ B activation response in mouse embryonic fibroblasts derived from either Wt, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  knockout mice in response to hypoxia. To carry out NF- $\kappa$ B reporter activity experiment, and as MEF are hardly transfectable, Wt, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  knockout MEFs were infected with NF- $\kappa$ B luciferase lentiviral vector. At 3 days after infection, cells

were either subjected to hypoxia or treated with TNF $\alpha$  for additional 24 h. In this context, lack of IKK $\beta$  caused almost a complete abrogation of either hypoxia- or TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation (Figure 3e). However, although genetic ablation of IKK $\alpha$  resulted in a slight decrease of TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation, its absence completely abolished NF- $\kappa$ B activation under hypoxia (Figure 3e).

**Hypoxia Induces Alternative NF- $\kappa$ B Activation Through IKK $\alpha$ - and IKK $\beta$ -Dependent p100 Accumulation and IKK $\alpha$ -Dependent p52 Processing**

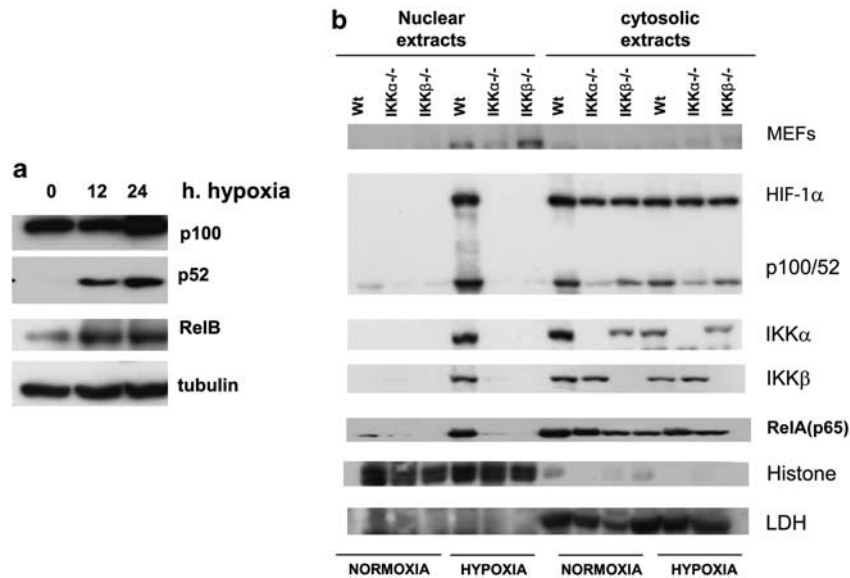
Having shown that IKK $\alpha$  controls hypoxia-mediated NF- $\kappa$ B activation, and based on the fact that IKK $\alpha$  is the main component of NF- $\kappa$ B alternative pathway, we sought to



**Figure 3** Hypoxia increases NF- $\kappa$ B transcriptional activity and its nuclear translocation through IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . (a) IK cells were transfected with the NF- $\kappa$ B luciferase reporter construct and treated with 50 ng/ml TNF $\alpha$  or exposed to hypoxia for 24 h, and cell lysates were assayed for luciferase activity. Results are expressed as relative luciferase units. (b) IK cells were either maintained under normoxia or subjected to hypoxia for 24 h, and nuclear and cytoplasmic lysates were analyzed with RelA (p65) and HIF-1 $\alpha$  antibodies. Membranes were also incubated with anti-histone H1 (marker of nuclear fraction) and anti-pan ERK (cytoplasmic fraction) antibodies (right graph). (c) Western blot analysis of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  expression in IK cells infected for 3 days with lentiviruses carrying shRNA targeting IKK $\alpha$  or IKK $\beta$ . (d) Bar chart showing NF- $\kappa$ B luciferase activity in IK cells infected with lentiviruses carrying shRNA against IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  or with the lentiviral vector carrying the I $\kappa$ B $\alpha$  superrepressor, which cannot be phosphorylated on serines 32 and 36 (SR-I $\kappa$ B $\alpha$ ). After 3 days, cells were transfected with the reporter NF- $\kappa$ B construct together with a plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase. After 24 h, cells were either maintained under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or subjected to hypoxia (0.2% O<sub>2</sub>), and luciferase activity was assayed 24 h later. Results are expressed in relative luciferase units normalized to galactosidase activity. (e) Murine embryonic fibroblasts (MEFs) from Wt, IKK $\alpha$ -/- and IKK $\beta$ -/- embryos were infected with NF- $\kappa$ B luciferase lentivirus carrying five  $\kappa$ B sites in its promoter. At 3 days after infection, cells were either maintained under normoxia, exposed to hypoxia (0.2% O<sub>2</sub>) or stimulated with TNF $\alpha$  (50 ng/ml) for additional 24 h before luciferase activity was measured. Results are expressed as relative luciferase units after normalization for protein content.

investigate the status of the alternative NF- $\kappa$ B pathway under hypoxia. Western blot analysis of total cell lysates of IK cells exposed to hypoxia shows an increase in the expression of p100 and its processed subunit p52, indicating the activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway under this condition (Figure 4a). A concomitant increase in RelB accumulation was observed in response to hypoxic exposure (Figure 4a). Of note, both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  subunits accumulate in the nucleus of the hypoxic cells (Figure 4b).

Next, we wanted to fully characterize the alternative NF- $\kappa$ B pathway induced under hypoxia. Analysis of cytosolic extracts shows that hypoxia stimulated the processing of p100 to p52 in both Wt and IKK $\beta$ -deficient MEFs but not in MEFs lacking IKK $\alpha$  (Figure 4b). Analysis of nuclear extracts showed that wild-type MEF exposed to hypoxia accumulated p100 and its processed fragment p52 in their nuclei. Surprisingly, p100 and p52 nuclear accumulation was completely abrogated in both IKK $\alpha$ - and IKK $\beta$ -deficient cells (Figure 4b).



**Figure 4** Hypoxia activates the alternative NF- $\kappa$ B pathway through IKK $\alpha$ - and IKK $\beta$ -dependent p100 accumulation and IKK $\alpha$ -dependent p52 processing. (a) IK cells were exposed to hypoxia for the indicated times, and cell extracts were tested for p100/52 and RelB proteins by western blot. (b) Murine embryonic fibroblasts (MEFs) from Wt, IKK $\alpha$ -/- and IKK $\beta$ -/- embryos were either maintained under normoxia or exposed to hypoxia for 24 h. Nuclear and cytoplasmic fractions were prepared and analyzed for HIF-1 $\alpha$  and p100/52 nuclear accumulation. Membranes were also incubated with anti-IKK $\alpha$ , anti-RelA (p65), anti-IKK $\beta$ , anti-histone H1 (marker of nuclear fraction) and anti-LDH (cytoplasmic fraction) antibodies.

Overall, these results suggest that although hypoxia-induced processing of p100 to p52 is controlled by IKK $\alpha$ , new synthesis of p100 under hypoxia and its nuclear accumulation together with p52 are controlled by the two kinases IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . Similar results were obtained in IK cells when IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  was silenced by shRNA-based lentiviral vectors (data not shown). Moreover, nuclear translocation of RelA (p65) is abrogated in MEFs lacking either IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  (Figure 4b), confirming the results obtained previously. Of note, both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  subunits accumulate in the nucleus of the hypoxic cells (Figure 4b).

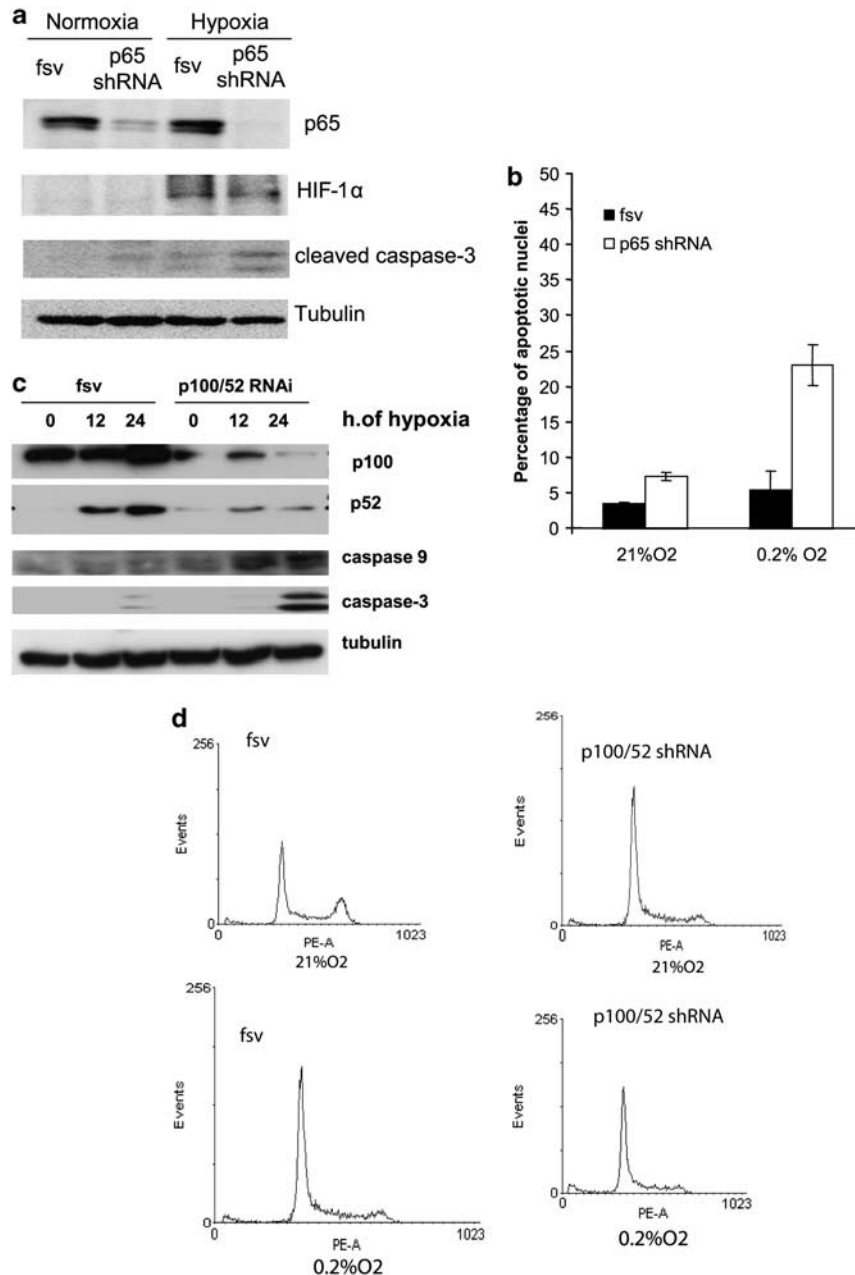
### RelA (p65) and p52 Promote IK Cellular Survival under Hypoxia

After the identification of both classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways activation under hypoxia, and given the central role of NF- $\kappa$ B pathway in regulating cell survival, we next examined the effect of downregulation of both RelA (p65) and p100/52 subunits on IK cell survival under hypoxia. Lentiviral-mediated delivery of shRNA to RelA (p65) subunit achieved an effective depletion of this protein and sensitized IK cells to hypoxic cell death. As shown in Figure 5b, RelA (p65)-deficient hypoxic IK cells displayed a significant increase in the number of cells with apoptotic morphology, assessed by Hoechst staining, together with an increase of caspase 3 processing (Figure 5a). On the other hand, lentiviral delivery of shRNA against p100/52 increased processing of both caspase 9 and 3 in p100/52-deficient IK hypoxic cells compared with their control counterparts (Figure 5c). Cell cycle analysis shows an increase of 4% of the sub-G1 cell

fraction in p100/52-deficient IK hypoxic cells compared with the control cells (Figure 5d). Altogether, these results indicate that simultaneous activation of both canonical and alternative NF- $\kappa$ B pathways under hypoxia contribute probably to a better adaptation and survival of endometrial IK cells.

### HIF-1 $\alpha$ Controls Hypoxia-mediated NF- $\kappa$ B Activation in IK Cells and Mediates EC Cell Survival under Low Oxygen Tension

HIF-1 $\alpha$  transcription factor is known to regulate many of the biological responses under hypoxia, and to promote the expression of a number of survival proteins.<sup>22</sup> Having shown that RelA (p65) and p100/52 NF- $\kappa$ B subunits promote cell survival under hypoxia, and given the fact that many studies have demonstrated an interplay between NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  pathways at different levels,<sup>4,23</sup> it was reasonable to test whether HIF-1 $\alpha$  regulates NF- $\kappa$ B activity induced under hypoxia in EC cells. To test this hypothesis, we infected IK cells for 3 days with lentiviruses carrying HIF-1 $\alpha$  shRNA and subsequently transfected them with the NF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid. As shown in Figure 6a, cells infected with lentiviruses carrying HIF-1 $\alpha$  shRNA and exposed to hypoxia significantly reduced the expression of HIF-1 $\alpha$  protein. HIF-1 $\alpha$  knockdown reduced NF- $\kappa$ B activity in IK hypoxic cells compared with their control counterparts infected with a lentivirus carrying an empty vector. TNF $\alpha$ -stimulated cells served as a positive control for NF- $\kappa$ B activity (Figure 6b). Furthermore, analysis of nuclear extracts shows that RelA nuclear accumulation is partially impaired in IK cells where HIF-1 $\alpha$  expression is downregulated (Figure 6a). In contrast,



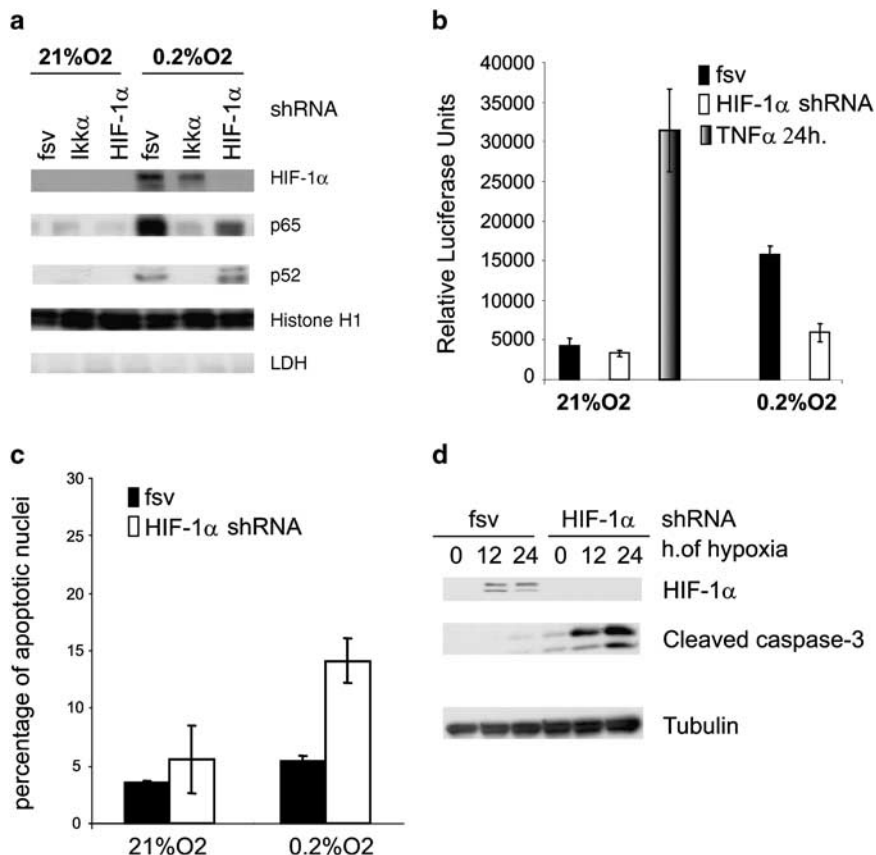
**Figure 5** RelA (p65) and p52 promote IK cellular survival under hypoxia. (a) IK cells were infected with lentiviruses carrying shRNA against p65 (RelA) for 3 days and then exposed to 24 h of hypoxia. Cell lysates were subjected to western blot with antibodies to active caspase 3 and HIF-1 $\alpha$ . (b) IK cells were infected with lentivirus carrying shRNA to RelA (p65) for 3 days, and then either maintained under normoxia or exposed to 24 h of hypoxia. Then, a quantification of Hoechst-stained apoptotic nuclei was assessed. (c) IK cells were infected with a lentivirus carrying shRNA to p100/52 for 3 days to allow protein knockdown. Whole-cell protein extracts were subjected to western blot analysis to monitor the expression of p100/52 and processed caspase 9 and 3. The blots were subsequently reprobbed with anti-tubulin. (d) Flow cytometry analysis and cell cycle distribution. IK cells were infected either with a lentivirus carrying shRNA to p100/52 or with a lentivirus carrying an empty vector for 3 days to allow protein knockdown and then subjected to 24 h of hypoxia or normoxia, after which cell cycle distribution was analyzed.

p52 nuclear accumulation under hypoxic conditions was not altered in the absence of HIF-1 $\alpha$  (Figure 6a).

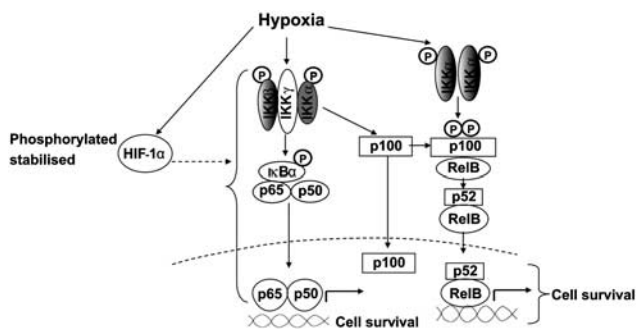
As HIF-1 $\alpha$  regulates both NF- $\kappa$ B transcriptional activity and RelA nuclear accumulation in IK cells, we next checked whether HIF-1 $\alpha$  pathway controls IK cell survival under low oxygen tension. To silence HIF-1 $\alpha$ , IK cells were infected with

lentiviruses carrying shRNA targeting HIF-1 $\alpha$ . At 3 days after infection, cells were subjected to hypoxia or maintained under normoxia for additional 24 h. Interestingly, death resistance of IK endometrial hypoxic cells is completely reversed when HIF-1 $\alpha$  expression is silenced. In fact, HIF-1 $\alpha$  knockdown caused a significant increase in the number of





**Figure 6** HIF-1 $\alpha$  controls hypoxia-mediated NF- $\kappa$ B activation and cell survival under low oxygen tension. (a) IK cells were infected with lentiviruses carrying shRNA to either IKK $\alpha$  or HIF-1 $\alpha$  for 3 days, then were either maintained under normoxia or exposed to 24 h of hypoxia. Nuclear fractions were prepared and analyzed by western blot using anti-HIF-1 $\alpha$ , anti-p65 and anti-p52 antibodies. Histone H1 was used as a nuclear marker. (b) Bar chart showing NF- $\kappa$ B luciferase activity in IK cells infected with lentiviruses carrying shRNA against HIF-1 $\alpha$ . After 3 days, cells were cells transfected with the reporter NF- $\kappa$ B construct together with a plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase. At 24 h after transfection, cells were either maintained under normoxia (21% O $_2$ ) or subjected to hypoxia (0.2% O $_2$ ) or stimulated with TNF $\alpha$  (50 ng/ml), and luciferase activity was assayed 24 h later. Results are expressed in relative luciferase units normalized to galactosidase activity. (c) Quantification of apoptotic nuclei after 24 h of hypoxic exposure. Previously, cells were either infected with an empty lentiviral vector or with a lentiviral vector carrying shRNA to HIF-1 $\alpha$  for 3 days. (d) IK cells were either infected with an empty lentiviral vector or with lentiviruses carrying shRNA to HIF-1 $\alpha$  for 3 days, and then exposed for the indicated times to hypoxia. Whole-cell lysates were analyzed by western blot with anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-active caspase 3 antibodies.



**Figure 7** Model for the activation of both canonical and alternative NF- $\kappa$ B under hypoxia. Under low oxygen conditions, stabilized HIF-1 $\alpha$  controls canonical NF- $\kappa$ B signaling: Both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases are necessary for RelA/p65 nuclear translocation. Hypoxia also mediates the p52-RelB translocation into the nucleus in a HIF-1 $\alpha$ -independent manner. Nuclear accumulation of both p100 and p52 requires priming by the canonical pathway through IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases, whereas p52 processing is IKK $\alpha$  dependent.

hypoxic cells displaying apoptotic morphology compared with control cells infected with lentiviruses carrying an empty vector (Figure 6c), and an increase in caspase 3 processing (Figure 6d). This result, together with the reduction of RelA (p65) nuclear accumulation when HIF-1 $\alpha$  is silenced, suggests that HIF-1 $\alpha$  is a critical upstream regulator of classical NF- $\kappa$ B pathway and cell survival (Figure 7).

**DISCUSSION**

Cellular hypoxia is considered a major therapeutic challenge, as it decreases radiosensitivity of tumor cells. In the present study, we show that post-radiotherapy recurrences are hypoxic and present higher nuclear expression of RelA (p65) and p52 than primary EC.

Cell survival threshold under hypoxic conditions is cell specific. Hence, although hypoxia triggers cell death in some cell types,<sup>24</sup> it promotes cell survival in others.<sup>21</sup> We have found that hypoxia decreases cyclin D1 expression and

induces G0–G1 phase arrest. The decrease in cyclin D1 expression has been recently attributed to HIF-1 $\alpha$ , as HIF-1 $\alpha$  has been shown to interact with cyclin D1 promoter.<sup>25</sup> Cell cycle arrest may explain the resistance of hypoxic cells to chemotherapeutic drugs that target DNA synthesis in S phase. Thus, a G0/G1 cell cycle arrest may thereby represent a general survival strategy of hypoxic cells, even under chemotherapeutic attacks.<sup>25</sup> We show that only a small percentage of EC cells undergo apoptosis under hypoxia. Given the previously reported finding of NF- $\kappa$ B activation under hypoxia,<sup>4,21</sup> our next aim was to investigate the contribution of NF- $\kappa$ B survival pathway in conferring apoptotic cell resistance under hypoxia.

Our results show that hypoxia induced both RelA nuclear accumulation and NF- $\kappa$ B transcriptional activity. However, the upstream pathway leading to NF- $\kappa$ B activation under hypoxia is still under debate. A recent report has attributed to c-Src the capacity to activate NF- $\kappa$ B at tyrosine residues,<sup>26</sup> whereas others<sup>4</sup> have shown that NF- $\kappa$ B activation under hypoxia is under IKK $\beta$  control. By the use of lentiviral-mediated downregulation of IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  and the mouse embryonic fibroblasts, deficient in either IKK $\alpha$  or IKK $\beta$ , we demonstrate that both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  subunits of the IKK kinase (IKK) complex are necessary for NF- $\kappa$ B activation under hypoxia. Despite the fact that both kinases have similar primary structure and share 65% identity in their kinase domains,<sup>27</sup> it has been shown that IKK $\alpha$  knockout fibroblasts exhibit normal IKK activation and p65/RelA nuclear translocation in response to proinflammatory stimuli, such as LPS, TNF $\alpha$  and IL-1, and a decrease of 50% in total NF- $\kappa$ B DNA-binding activity.<sup>12,28</sup> Recent work of Walmsley *et al*<sup>21</sup> showed an increase of IKK $\alpha$  expression and NF- $\kappa$ B activation under hypoxia, but the interplay linking IKK $\alpha$  to NF- $\kappa$ B was not elucidated.

The fact that IKK $\alpha$  deficiency abrogated completely hypoxia-induced NF- $\kappa$ B activity led us to examine the subcellular distribution of RelA in IKK $\alpha$ -deficient IK cells and MEF knockouts for IKK $\alpha$ . Our results show that IKK $\alpha$  deficiency, like IKK $\beta$  deficiency, impairs p65 nuclear translocation under hypoxia. This result indicates that, contrary to proinflammatory cytokine-induced signal, IKK $\alpha$  has a critical role in controlling RelA cellular distribution under hypoxia, and thereby canonical NF- $\kappa$ B pathway. Recent reports have also referred to the requirement of IKK $\alpha$  in some canonical NF- $\kappa$ B signaling pathways.<sup>29,30</sup>

As IKK $\alpha$  is known to mediate the alternative NF- $\kappa$ B pathway, we next checked for p52 processing under hypoxia. We show that hypoxia induces p100 accumulation, followed by its processing to p52 in both EC cells and MEFs. This is in accordance with the results published by Mordmuller *et al*,<sup>31</sup> who describe that only newly synthesized p100 undergoes processing generating nuclear p52. Furthermore, p100 processing is a tightly controlled event, mediated by the NIK. NIK functions at the same time as a docking protein, recruiting IKK $\alpha$  to p100,<sup>32</sup> and as an IKK $\alpha$ -activating kinase.

Activated IKK $\alpha$  in turn phosphorylates p100, promoting its ubiquitination and its processing to p52.<sup>33</sup> P100 processing to p52 is activated by a subset of stimuli such as lymphotoxin $\beta$ ,<sup>34</sup> CD40 ligand<sup>35</sup> and B-cell-activating factor.<sup>36</sup> Furthermore, recent publications have shown that both active Stat3<sup>37</sup> and active Akt<sup>38</sup> induce p100 processing to p52. Both Akt<sup>39</sup> and Stat 3<sup>40</sup> have been shown to be activated under hypoxia. It is thus plausible that either of these pathways serves as an upstream signal for p100 processing to p52 under low oxygen tension. Furthermore, we demonstrate that under hypoxia, IKK $\alpha$  is responsible of p100 processing to p52. This is in agreement with the published role of IKK $\alpha$  in generating p52, activating thereby the alternative pathway.<sup>13</sup> However, our results indicate that both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases are needed for p100 accumulation. As our data point to the involvement of both kinases in activating the canonical NF- $\kappa$ B pathway, this new result suggests that the activation of the alternative pathway requires previous NF- $\kappa$ B activation through the canonical pathway. Requirement of canonical NF- $\kappa$ B pathway has been reported for LPS-induced alternative NF- $\kappa$ B pathway activation.<sup>31</sup> Both p100 accumulation and p52 generation induced by LPS were lost in cells where the canonical pathway was blocked.<sup>31</sup> Another evidence demonstrating the cross-talk between both alternative and classical NF- $\kappa$ B pathways is the data obtained by Sun *et al*<sup>41</sup>, who describe that transactivation of p65 stimulates p100 mRNA and protein expression, increasing thereby the pool of p100 available for processing to p52. We propose that hypoxia-mediated alternative NF- $\kappa$ B activity is based on p100 accumulation, a phenomena that is under the control of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases. The p100 nuclear accumulation has been described in other cellular models, where it may regulate NF- $\kappa$ B activity by sequestering NF- $\kappa$ B subunits.<sup>42</sup> We further investigated the role of p52 and p65 NF- $\kappa$ B subunits in promoting cell survival under hypoxia. Silencing either RelA (p65) or p52 rendered IK cells exposed to hypoxic stress more sensitive to apoptotic cell death, highlighting the prosurvival role of both canonical and alternative NF- $\kappa$ B pathways.

Of note, under hypoxia, we observe that IKK $\alpha$ , and to a lesser degree IKK $\beta$ , gets accumulated in the nucleus of hypoxic cells. Nuclear accumulation of IKK $\alpha$  has been described after cytokine exposure and has been shown to regulate NF- $\kappa$ B-dependant gene expression through histone phosphorylation.<sup>43</sup> IKK $\alpha$  nuclear accumulation has been shown to control prostate cancer metastasis.<sup>44</sup> Additional studies should be performed to elucidate the function of IKK $\alpha$  nuclear accumulation under hypoxic conditions.

As HIF-1 $\alpha$  has been shown to contribute to NF- $\kappa$ B activation in murine neutrophils,<sup>21</sup> we next checked for the contribution of HIF-1 $\alpha$  in activating both classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways. Although p65 nuclear accumulation and NF- $\kappa$ B transcriptional activity were reduced when HIF-1 $\alpha$  was silenced, p52 nuclear accumulation remained unchanged. HIF-1 $\alpha$  silencing increased apoptotic cell

death under hypoxia, confirming its prosurvival role under hypoxia.

In summary, we have found that hypoxic stress induces the activation of both canonical and alternative NF- $\kappa$ B pathways, with concomitant nuclear accumulation of both p65/RelA and p52 subunits. To our knowledge, our work is the first to present evidence of the activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway under hypoxia. Our data demonstrate that although activation of the canonical pathway is HIF-1 $\alpha$  dependent, processing of p52 through the alternative pathway is HIF-1 $\alpha$  independent. Activation of these pathways represents probably a strategy used by cancer cells to survive and escape therapies. HIF-1 $\alpha$ , RelA (p65) and p52 may thus be considered as potential therapeutic targets for EC.

Supplementary Information accompanies the paper on the Laboratory Investigation website (<http://www.laboratoryinvestigation.org>)

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Concepció Soler and Jordi Torres for critical reading of the manuscript. We thank Dr Michael Karin for providing IKK $\alpha$ -/- and IKK $\beta$ -/- MEFs. This work was supported by grants from RD 06/00/20/134, 2009 SGR 174, Fis PI070276, Ministerio de Educación y Ciencia (Juan de la Cierva Postdoctoral fellowship to AY), the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (Postdoctoral fellowship CP05/00028 to XD and Predoctoral fellowships FI05/00191 to DL and FI08/0012 to NE), Fundación Científica AECC, Catalunya contra el Cancer, Lleida (fellowship to AS). Tumor samples were obtained with the support of Xarxa Catalana de Bancs de Tumors, The Tumor Banc Platform of RTICC and RD09/0076/000S9. This work is dedicated to Daniel, Alfonso and Irene.

#### DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

- Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38–47.
- Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996;41:31–39.
- Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 2001;28(2 Suppl 8):29–35.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, *et al*. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 2008;453:807–811.
- Kazi AA, Koos RD. Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* 2007;148:2363–2374.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, *et al*. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468–472.
- Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000;59:47–53.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, *et al*. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843–845.
- Dolcet X, Llobet D, Encinas M, *et al*. Proteasome inhibitors induce death but activate NF- $\kappa$ B on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem* 2006;281:22118–22130.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225–260.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–663.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, *et al*. The IKK $\beta$  subunit of I $\kappa$ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor  $\kappa$ B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 1999;189:1839–1845.
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, *et al*. Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science* 2001;293:1495–1499.
- Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, *et al*. Abnormalities in the NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204:569–577.
- Pansare V, Munkarah AR, Schimp V, *et al*. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in type I and type II endometrial carcinomas. *Mod Pathol* 2007;20:35–43.
- Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, *et al*. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998;29:1160–1164.
- Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;105:109.
- Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, *et al*. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol* 2008;158:496–504.
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23:359–369.
- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 2004;5:27–36.
- Walmsley SR, Print C, Farahi N, *et al*. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF- $\kappa$ B activity. *J Exp Med* 2005;201:105–115.
- Liu XH, Yu EZ, Li YY, *et al*. HIF-1 $\alpha$  has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via *Mcl-1* gene expression. *J Cell Biochem* 2006;97:755–765.
- Scortegagna M, Cattaillon C, Martin RJ, *et al*. HIF-1 $\alpha$  regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF $\kappa$ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* 2008;111:3343–3354.
- Rosenbaum DM, Michaelson M, Batter DK, *et al*. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. *Ann Neurol* 1994;36:864–870.
- Wen W, Ding J, Sun W, *et al*. Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res* 2010;70:2010–2019.
- Lluis JM, Buricchi F, Chiarugi P, *et al*. Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- $\kappa$ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* 2007;67:7368–7377.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, *et al*. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1997;91:243–252.
- Hu Y, Baud V, Delhase M, *et al*. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase. *Science* 1999;284:316–320.
- Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, *et al*. TAK1 is critical for I $\kappa$ B kinase-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Mol Biol* 2003;326:105–115.
- Solt LA, Madge LA, Orange JS, *et al*. Interleukin-1-induced NF- $\kappa$ B activation is NEMO-dependent but does not require IKK $\beta$ . *J Biol Chem* 2007;282:8724–8733.
- Mordmuller B, Krappmann D, Esen M, *et al*. Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- $\kappa$ B-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep* 2003;4:82–87.
- Xiao G, Fong A, Sun SC. Induction of p100 processing by NF- $\kappa$ B-inducing kinase involves docking I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) to p100 and IKK $\alpha$ -mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:30099–30105.
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100. *Mol Cell* 2001;7:401–409.
- Dejardin E, Droin NM, Delhase M, *et al*. The lymphotoxin- $\beta$  receptor induces different patterns of gene expression via two NF- $\kappa$ B pathways. *Immunity* 2002;17:525–535.
- Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, *et al*. CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO J* 2002;21:5375–5385.

36. Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, *et al*. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* 1998;187:185–196.
37. Nadiminty N, Lou W, Lee SO, *et al*. Stat3 activation of NF-[kappa]B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7264–7269.
38. Gustin JA, Korgaonkar CK, Pincheira R, *et al*. Akt regulates basal and induced processing of NF-kappaB2 (p100) to p52. *J Biol Chem* 2006;281:16473–16481.
39. Lee SM, Lee CT, Kim YW, *et al*. Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer Lett* 2006;242:231–238.
40. Noman MZ, Buart S, Van Pelt J, *et al*. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol* 2009;182:3510–3521.
41. Sun SC, Ganchi PA, Beraud C, *et al*. Autoregulation of the NF-kappa B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1346–1350.
42. Lessard L, Saad F, Le Page C, *et al*. NF-kappaB2 processing and p52 nuclear accumulation after androgenic stimulation of LNCaP prostate cancer cells. *Cell Signal* 2007;19:1093–1100.
43. Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, *et al*. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 2003;423:659–663.
44. Luo JL, Tan W, Ricono JM, *et al*. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 2007;446:690–694.



### 3.3 Objectiu 1C

#### Estudi del valor d'ANXA2 com a marcador predictiu de EC recurrent

Lorena Alonso-Alconada, Maria Santacana, Pablo García-Sanz, et al. **Annexin A2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cancer**. *Int J Cancer*. 2014  
[Epub ahead of print]

1. Les recidives post radioteràpia de EC presenten un augment en l'expressió d'Annexina 2 respecte els tumors primaris.
2. La línia cel·lular de EC IK amb expressió d'ANXA2 no presenta diferències estadísticament significatives en quant a la formació de colònies després de la radiació o del tractament quimioterapèutic respecte la línia cel·lular de EC Ishikawa sense expressió d'ANXA2.
3. La línia cel·lular de EC IK presenta una capacitat reduïda de migració i de generació de colònies en absència d'ANXA2, a més d'una transició mesenquimal-epitelial.

Els animals injectats amb cèl·lules IK deficients en ANXA2 presenten menys càrrega metastàtica i la disseminació hematògena en els ratolins es va veure disminuïda en absència d'expressió d'ANXA2.

L'expressió d'ANXA2 en cèl·lules tumorals circulants (CTC, Circulating Tumor Cells) augmenta de forma gradual en pacients amb EC recurrent respecte pacients sans passant per pacients sense malaltia recurrent.

4. NEEC (SCE i CCC) presenten una expressió un 17% més elevada d'ANXA2 en comparació amb els EEC.

Els EEC estadi I, i estadi I, II que van recidivar tenen uns valors d'expressió d'ANXA2 majors (18.29%, 25.22%, respectivament) en comparació amb els que no van recidivar.

El risc de presentar malaltia recurrent és d'un 73.98% en aquells casos amb un *histoscore* >190.



# Annexin-A2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cancer

Lorena Alonso-Alconada<sup>1\*</sup>, Maria Santacana<sup>2\*</sup>, Pablo Garcia-Sanz<sup>3</sup>, Laura Muinelo-Romay<sup>1</sup>, Eva Colas<sup>4</sup>, Cristina Mirantes<sup>2</sup>, Marta Monge<sup>4</sup>, Juan Cueva<sup>1</sup>, Esther Oliva<sup>5</sup>, Robert A Soslow<sup>6</sup>, Maria Angeles Lopez<sup>7</sup>, Jose Palacios<sup>7</sup>, Jaime Prat<sup>8</sup>, Joan Valls<sup>2</sup>, Camilla Krakstad<sup>9,10</sup>, Helga Salvesen<sup>9,10</sup>, Antonio Gil-Moreno<sup>4</sup>, Rafael Lopez-Lopez<sup>1</sup>, Xavier Dolcet<sup>2</sup>, Gema Moreno-Bueno<sup>3,11</sup>, Jaume Reventos<sup>4,12,13\*</sup>, Xavier Matias-Guiu<sup>2\*</sup> and Miguel Abal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Translational Medical Oncology, Health Research Institute of Santiago (IDIS), Fundacion Ramon Dominguez, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics and Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, Irbllleida, Lleida, Spain

<sup>3</sup>Foundation MD Anderson Cancer Centre Madrid, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Research Unit in Biomedicine, Vall d'Hebron Research Institute and Hospital and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA

<sup>6</sup>Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY

<sup>7</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>8</sup>Department of Pathology, Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

<sup>10</sup>Department of Clinical Science, Centre for Cancer Biomarkers, University of Bergen, Norway

<sup>11</sup>Departament de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigaciones Biológicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), IdiPAZ, Madrid, Spain

<sup>12</sup>Departament de Ciències Bàsiques, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>13</sup>Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

Endometrial carcinomas, the most common malignant tumour of the female genital tract, are usually diagnosed at an early stage with uterine-confined disease and an overall favourable prognosis. However, up to 20% of endometrial carcinomas will end up in recurrent disease, associated with a drop in survival and representing the major clinical challenge. Management of this group of risk patients relies on robust biomarkers that may predict which endometrial carcinomas will relapse. For this, we performed a proteomic analysis comparing primary lesions with recurrences and identified ANXA2 as a potential biomarker associated with recurrent disease that we further validated in an independent series of samples by immunohistochemistry. We demonstrated *in vitro* a role for ANXA2 in the promotion of metastasis rather than interfering with sensitivity to radio/chemotherapy. In addition, ANXA2 silencing resulted in a reduced metastatic pattern in a mice model of endometrial cancer dissemination, with a limited presence of circulating tumor cells. Finally, a retrospective study in a cohort of 93 patients showed that ANXA2 effectively predicted those endometrioid endometrial carcinomas that finally recurred. Importantly, ANXA2 demonstrated a predictive value also among low risk Stage I endometrioid endometrial carcinomas, highlighting the clinical utility of ANXA2 biomarker as predictor of recurrent disease in endometrial cancer. Retrospective and prospective studies are ongoing to validate ANXA2 as a potential tool for optimal stratification of patients susceptible to receive radical surgery and radio/chemotherapy.

Endometrial carcinoma is the most common tumor of the female genital tract, with an increasing incidence. Although usually diagnosed at an early stage with uterine-confined dis-

ease and an overall favorable prognosis, up to 20% of endometrial carcinomas are at substantial risk of recurrence and death. In addition and although spread to regional lymph

**Key words:** endometrial cancer, recurrent disease, metastasis, ANXA2, biomarker

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

\*L.A.-A., M.S., J.R., X.M.-G. and M.A. equally contributed to this work

**Grant sponsor:** Innovation in Nanomedicine (InveNNta); **Grant number:** ISCIII PI11/00873; **Grant sponsors:** Operational Program for Cross-border Cooperation: Spain-Portugal (POCTEP), European Regional Development Fund (ERDF), Fundacion Asociacion Española Contra el Cancer (AECC), Grupos Estables 2011 and Basque Government (Spain)

**DOI:** 10.1002/ijc.29213

**History:** Received 25 Apr 2014; Accepted 4 Aug 2014; Online 13 Sep 2014

**Correspondence to:** Xavier Matias-Guiu and Miguel Abal, Translational Medical Oncology, Health Research Institute of Santiago (IDIS), Fundacion Ramon Dominguez, SERGAS, Trav. Choupana s/n 15706 Santiago de Compostela, Spain, Tel.: +34-981955073, E-mail: miguel.abal.posada@sergas.es or fjmatiasguil@lleida.ics@gencat.cat



**What's new?**

Endometrial carcinoma is usually diagnosed early, with a favorable prognosis. However, even in these early cases, the relapse rate can be as high as 20%. Thus it would be helpful to have a biomarker that could predict which tumors are likely to recur, and which patients might benefit from more aggressive treatment. In this clinical study, the authors found that a protein called annexin A2 (ANXA2) may provide just such a biomarker. Interestingly, they also found that ANXA2 is involved in the ability of endometrial carcinomas to metastasize.

nodes is the most important prognostic factor, the role of lymphadenectomy for women with early stage endometrial tumors remains controversial.<sup>1</sup> No survival benefit in either overall or recurrence-free survival has been recorded in large randomized trials.<sup>2,3</sup> Likewise, no study of adjuvant treatment has convincingly shown survival benefit in stage I/stage II tumors considered at an intermediate risk. Overall, the endometrial carcinoma clinical scenario depicts a confident outcome while patients are detected at low risk, but a necessity of reliable biomarkers allowing for the identification of patients susceptible to relapse in the future, thus candidates to receive radical surgery and radiotherapy/chemotherapy.

Recently, the increasing availability of proteomics technologies has led to the identification and development of new clinically relevant tools. Regarding diseases of the female reproductive tract, ascitic fluid that bathes ovarian tumors has been used in biomarker studies of ovarian cancer,<sup>4</sup> or uterine and peritoneal fluids have been investigated in several studies of endometriosis and infertility.<sup>5</sup> Likewise, a number of biomarkers have been described in endometrial cancer,<sup>6–8</sup> that could be of considerable clinical benefit for presurgical staging and prognostic evaluation. Serum HE4, recently described as a prognostic biomarker in endometrial cancer,<sup>9</sup> or L1CAM as prognostic factor in FIGO stage I, type I endometrial cancers,<sup>10</sup> are two excellent examples of current efforts to identify high-risk patients within low-grade endometrioid endometrial cancer patients who might benefit from adjuvant treatment. Nevertheless, the increasing use of proteomics technologies has not yet provided widely applicable clinical tools for the identification of those 20% of patients diagnosed with early stage endometrial cancer that will relapse despite the apparent absence of locally advanced or metastatic disease at the time of treatment.<sup>11,12</sup>

In this work, we attempted to identify proteins associated with recurrent disease in endometrial cancer by 2D-DIGE technology applied to human primary carcinomas and recurrences. An independent validation among selected candidates identified ANXA2 as potential biomarker discriminating between primary endometrial carcinomas and recurrent disease. Concordantly, functional *in vitro* and *in vivo* experiments indicated a role of ANXA2 in the ability of endometrial carcinomas to metastasize. Finally, ANXA2 efficiently predicted in a retrospective analysis those primary endometrial carcinomas that resulted in a recurrent disease. All these results demonstrated an active role for ANXA2 in the metastatic potential of endometrial tumor cells, and its

value as a reliable biomarker and predictor of endometrial cancer recurrences.

**Material and Methods****Patients and samples**

Patients participating in the study were recruited in Arnau de Vilanova Hospital (Lleida, Spain), University Hospital of Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spain), Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain), MD-Anderson Cancer Center Madrid (Madrid, Spain), Fundacion Dexeus (Barcelona, Spain), Virgen del Rocio Hospital (Sevilla, Spain), Massachusetts General Hospital (Boston), Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York) and Haukeland University Hospital (Bergen, Norway). Informed consent approved by the relevant ethical committee was signed by all patients (CEIC 2011/070). Several groups of patients were included in the study.

First group was composed of 12 tumor samples, corresponding to patients with matched primary tumors and recurrences. Fresh frozen tumor tissue was available from each of the patients. Clinical and pathologic characteristics are shown in Supporting Information Table 1.

Second group was composed of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples from 140 patients with endometrial carcinoma (115 primary tumors and 25 post-radiation recurrences). Clinical and pathologic characteristics are shown in Supporting Information Table 2.

Third group was composed of FFPE tumor tissue samples from 131 patients with primary endometrial carcinoma; 93 EEC and 38 NEEC (including serous and clear cell carcinomas) recruited from the above-mentioned centers in the setting of a multicentric study. Clinical and pathologic characteristics are shown in Supporting Information Table 3. The subgroup formed by the 93 patients with primary EEC (50 recurrent, 43 non-recurrent) was used to assess the association of ANXA2 with relation to the risk of recurrence, particularly for those cases with low stage (I or II) (Supporting Information Table 4).

Fourth group was composed of 7.5 ml of peripheral blood samples from 34 endometrial cancer patients, including high-risk endometrial carcinomas ranging from Grade 3 Stage IB carcinomas to metastatic Stage IV carcinomas and recurrences. Clinical and pathologic characteristics are shown in Supporting Information Table 5. A control group included a set of 27 healthy women with absence of a previous cancer episode and with an age range similar to patients.

## 2D-DIGE Proteomic analysis

Proteomic comparison of primary endometrial carcinomas *versus* endometrial cancer recurrences was carried out in 12 samples (Supporting Information Table 1), presenting similar percentages of epithelial tumor glands. Samples were processed as described.<sup>13</sup> Briefly, DIGE lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5) was used for protein extraction and was labeled with Cy3 and Cy5 cyanine dyes. A pool consisting of equal amount of each sample was used as internal standard and was labeled with Cy2 dye. Samples were combined according to the experimental design, at 50 µg of protein per Cy dye per gel, and diluted twofold with IEF sample buffer (7 M urea, 2M thiourea, 4% wt/vol CHAPS, 2% dithiothreitol, 2% pharmalytes pH 3–10 and 0.002% bromophenol blue). Two-dimensional electrophoresis was performed using GE Healthcare reagents and equipment. Fluorescence images of the gels were acquired on a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Cy2, Cy3 and Cy5 images were scanned at 488/520, 532/580 and 633/670 nm excitation/emission wavelengths, respectively, at a 100 µm resolution. Image analysis and statistical quantification of relative protein abundances were performed using Progenesis SameSpots v3.2 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). Differentially expressed proteins between primary tumors and recurrences fulfilled the restrictive selection criteria of fold  $-1.5 \geq x \geq 1.5$  and Anova  $p < 0.05$  were selected.

## ANXA2 immunostaining in patient's samples

Five Tissue microarrays (TMA) were constructed using the manual arrayer from Beecher Instruments<sup>TM</sup>. Three TMA contained formalin-fixed paraffin embedded tissues from 115 primary EEC and 25 post radiation recurrences from patients who underwent surgery for endometrial carcinoma. The fourth TMA contained 38 NEEC (including SC and CCC). Finally, the last TMA was composed of 50 primary EC that progressed to recurrent disease.

Tissue cylinders with a diameter of 0.6 mm were punched from two different tumor areas of each "donor" tissue block and brought into a recipient paraffin block. TMA blocks were sectioned at a thickness of 3 µm, dried for 1 h at 65° before pre-treatment procedure of deparaffinization, rehydration and epitope retrieval in the Pre-Treatment Module, PT-LINK (DAKO, Denmark) at 95°C for 20 min in 50× Tris/EDTA Buffer, high pH. Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. The antibody used was against ANXA2 (polyclonal, diluted 1:100; Abcam, Cambridge, UK). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision FLEX Detection Kit (DAKO, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin. Autostainer Link 48 instrument was used (DAKO, Denmark). Appropriate negative controls including no primary antibody were also included.

Cytoplasmic and heterogeneous immunohistochemical staining was semi-quantitatively graded based on the percent-

age and on the intensity of the labelling. Histological scores (derived from the mean between two cylinders) ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity) by applying the formula: Histoscore = 1× (% light staining) + 2× (% moderate staining) + 3× (% strong staining).

## Silencing of ANXA2 expression by shRNA and luciferase expression in Ishikawa cells

The human endometrial carcinoma cell line Ishikawa (HPA Culture Collections) was infected with lentiviral particles containing the empty vector (pLKO.1-puro; Sigma, MO) to obtain IK-pLKO cells or with ANXA2 shRNA vector (5'-CCGGCTGCTTTCAACTGAATTGTTCTCGAGAACAATTCA GTTGAAAGCAGGTTTTTG-3'; Sigma Mission NM\_001002857, Sigma, MO, USA) to stably silence ANXA2 expression, as described.<sup>14</sup> Previously, Ishikawa cells were infected with luciferase expressing pLenti CMV V5-LUC Blast (w567-1) (Addgene, Cambridge, MA) vector according to the same protocol. Stable infected cells were maintained in DMEM F-12 (1:1) Medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and selected with Puromycin (1 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO) and Blastidine S HCl (3 µg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The efficacy of infection was assessed by RT-q-PCR and Western blotting.

## RNA extraction and quantitative real-time PCR (RT-q-PCR)

Total RNA was isolated from IK-pLKO and IK-shANXA2 cells using High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Applied Science, Indianapolis, IN), according to the manufacturer, and cDNA synthesis was carried out using MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA) following manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed using TaqMan assays (ANXA2#Hs01561520\_m1; Applied Biosystem, Foster City, CA) in a 7500 Real-Time PCR Machine using the default conditions: 95° for 20 min; 40 cycles (95° for 1 min and 60° for 20 min). Data were analyzed with StepOne Software v.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH#Hs99999905\_m1; Applied Biosystem, Foster City, CA) was used as an internal normalization control. The results were represented as the fold change in gene expression relative to GAPDH gene expression (2-ΔΔCt). TaqMan® Assays have been designed on a template sequence that is common for all of the alternative splicing variants, for detection of the maximum number of transcripts without detecting homolog gene products.

## Western blotting and immunofluorescence

Total cellular protein was extracted using lysis buffer [0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.5% DOC, 1% NP-40, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 4mM NaF, 1× PIC]. Fifty micrograms of protein was separated using SDS-polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane (Amersham Bioscience, UK). After blocking with TBS, 5% milk and 0.05% Tween 20 for 1 h, the membrane was incubated overnight with anti-ANXA2 (1:500 dilution; Abcam, Cambridge, UK),

anti-Vimentin (1:1,000 dilution; Dako, Sant Just Desvern, Barcelona) antibodies, followed by horseradish peroxidase conjugated secondary antibody added for 1h at room temperature. Tubulin (1:1000 dilution, Abcam, Cambridge, UK) and Actin (1:1,000, Abcam, Cambridge, UK) were used as internal control. The signal was detected using Immobilon Western Blotting Kit (Millipore, Billerica, MA).

For immunofluorescence staining cells were seeded onto glass coverslips, fixed with methanol for 10 at  $-20^{\circ}\text{C}$  and incubated with anti-E-cadherin (1:500 dilution; Abcam, Cambridge, UK), followed by secondary antibody conjugated with Texas Red (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) for 1 h at RT in dark. Coverslips were mounted using the Aqua/Poly Mount medium (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany). Fluorescence images were captured with DM-IRBE inverted fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

#### Radiosensitivity assay

The effect of ANXA2 on the sensitivity to radiotherapy was examined using clonogenic assay. Briefly,  $1 \times 10^3$  IK-pLKO or IK-shANXA2 cells were seeded in six-well plates and irradiated with different doses (0 Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy). After incubation for 15 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ , the MTT (3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SIGMA-M-2128, Saint Louis, MO) assay was performed according to manufacturer's recommendation and the number of colonies was observed.

#### Migration assay

Migration assays were performed using 24-well transwell plate (8.0  $\mu\text{m}$  pore size polycarbonate membrane; Corning, NY, USA). Briefly,  $5 \times 10^4$  cells were suspended in 200  $\mu\text{l}$  of serum-free DMEM F-12 medium and seeded on the upper side of the boyden chamber. The lower side of the chamber was filled with DMEM F-12 supplemented with 10% FBS and 60 ng/ml of EGF (Sigma, Saint Louis, MO) as a chemotactic agent. After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h, non-migrating cells were removed with a cotton swab and cells that migrated through the chamber were trypsinized, collected, stained with 4  $\mu\text{M/l}$  calcein acetoxymethyl ester (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol, and visualized at 485 nm using a fluorimeter. Three independent experiments were performed with triplicate treatment. Results were presented as relative percentage with the number of cells migrated in the IK-pLKO wells defined as 100%.

#### Soft agarose colony formation assay

The effect of ANXA2 on the anchorage independent growth of Ishikawa cell line was examined using soft agarose colony formation assays. Briefly, 50  $\mu\text{l}$  of 0.6% low melting point agarose (Promega, Madison) solution containing 10% FBS was used to overlaid the bottom of 96-well plates. Hundred microliters of 0.3% agarose solution containing 10% FBS and  $4 \times 10^3$  IK-pLKO or IK-shANXA2 cells were added per well

and incubated with 50  $\mu\text{l}$  of DMEM F-12 culture medium containing 10% FBS. After 5 days of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  colonies were stained with Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer, and the fluorescence was measured at 590 nm. Three independent experiments were performed and the average results were presented as relative percentage with the number of IK-pLKO colonies defined as 100%.

#### Mice model of endometrial dissemination and distant metastasis

**Bioluminescent imaging.** For experimental metastasis assays, 10 female nu/nu mice (Charles River) aged 7 weeks were divided in two groups and inoculated with either IK-pLKO or IK-shANXA2 cells stably expressing luciferase protein ( $5 \times 10^5$  in 0.1 ml of sterile PBS) into the left ventricle of the heart under 2% isoflurane/air anesthesia. Only mice with evidence of a satisfactory intracardiac injection, indicated on day 0 by systemic bioluminescence distributed throughout the animal, continued in the experiment. After 4 weeks and before sacrifice tumor metastases were detected by bioluminescent imaging with a Xenogen IVIS (IVISR Lumina II) system coupled to Living Imaging software 4.2 (Xenogen Corporation). Luciferin (150 mg/kg in PBS; Firefly Luciferin, Caliper Lifescience Corp, Hopkinton, MA) was injected intraperitoneally as the substrate for the luciferase. Mice were housed and maintained under specific pathogen-free conditions and used in accordance with institutional guidelines and approved by the Use Committee for Animal Care from the Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

**Histology examination.** Four weeks after cells injection, animals were sacrificed and tissue was collected, fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Haematoxylin-Eosin staining was performed to determine the presence of metastasis.

**CTC Identification.** To further explore distant dissemination, a 50  $\mu\text{l}$  of peripheral blood sample was extracted before mice sacrifice and tested for CTC with the CellCapture<sup>TM</sup> CTC Mouse Kit (Veridex LLC, Janssen Diagnostics, NJ). Briefly, mice blood was mixed with 25  $\mu\text{l}$  of Anti-EpCAM ferrofluids and incubated for 15 min. After immunomagnetic capture and enrichment, CTC were immunofluorescent staining using Anti-Cytokeratins 8, 18 and 19 and DAPI. Analysis and enumeration of CTC was performed using the CellTracks Analyzer II<sup>®</sup> (Veridex LLC, Janssen Diagnostics, NJ).

#### Anxa2 expression in CTC from endometrial cancer patients

ANXA2 expression was determined by RT-q-PCR upon EpCAM based immunoisolation of CTC, using the CELLlection<sup>TM</sup> Epithelial Enrich kit (Invitrogen, Dynal, Oslo, Norway) as described.<sup>15</sup> Total RNA from CTC was extracted with the QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) and cDNA was synthesized using SuperScriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's protocol. To further

optimize the sensibility of detection, a preamplification step was performed using TaqMan PreAmp Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) with 14 reaction cycles. ANXA2 expression level was determined by RT-q-PCR with TaqManH PreAmp Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and a 7.500 quantitative Real-time PCR Machine. Data were analyzed with StepOne Software v.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and normalized to protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC, CD45), as a marker of non-specific isolation. Data were represented as  $(40 - \Delta Ct)$ , whereby  $\Delta Ct = \text{duplicate mean} (Ct_{ANXA2} - Ct_{CD45})$ .

### Statistical analysis

Mann-Whitney tests were used to evaluate differential ANXA2 immunoexpression in EEC and NEEC samples. To define a threshold for the ANXA2 level to predict recurrences, Gini criterion was used and a logistic regression model was fitted to estimate odds ratios (OR) and assess statistical significance. A sensitivity and specificity analysis was conducted to assess the reliability of the predictions. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to further prove the ability of ANXA2 to predict recurrences, using for this the predicted probabilities in a logistic regression model. Cox proportional hazard regression model was used to assess the time from the surgery until a relapse (relapse-free survival time) and to evaluate the association with the intervals defined for ANXA2 immunoexpression levels. Hazard ratios and their corresponding 95% confidence intervals and *p* values were computed from this model. Kaplan-Meier curves were computed to obtain relapse-free survival rates at 1, 2 and 5 years with the corresponding 95% confidence intervals. Log-rank test was computed to assess the differences. The Student's *t*-test was used to determine statistical significance between control and treatment groups. Kruskal-Wallis non-parametric test with Dunn's post-test was used to determine the differences in ANXA2 expression level from CTC. All analyses were made using R software. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### ANXA2 as biomarker of recurrent disease in endometrial cancer

We initially performed a 2D-DIGE proteomic comparison with macroscopically dissected endometrial primary lesions and matched endometrial recurrences ( $n = 12$ ; Supporting Information Table 1 for clinicopathology characteristics), presenting similar percentages of epithelial tumor glands (representative example of 2D-DIGE in Fig. 1a). Samples were processed as described,<sup>13</sup> and differentially expressed proteins between primary tumors and recurrences fulfilled the restrictive selection criteria of  $\text{fold } -1.5 \geq x \geq 1.5$  and Anova  $p \leq 0.05$  (Fig. 1b). Candidate proteins to be involved in the promotion of metastasis in endometrial cancer, highly overexpressed in endometrial cancer recurrences compared to

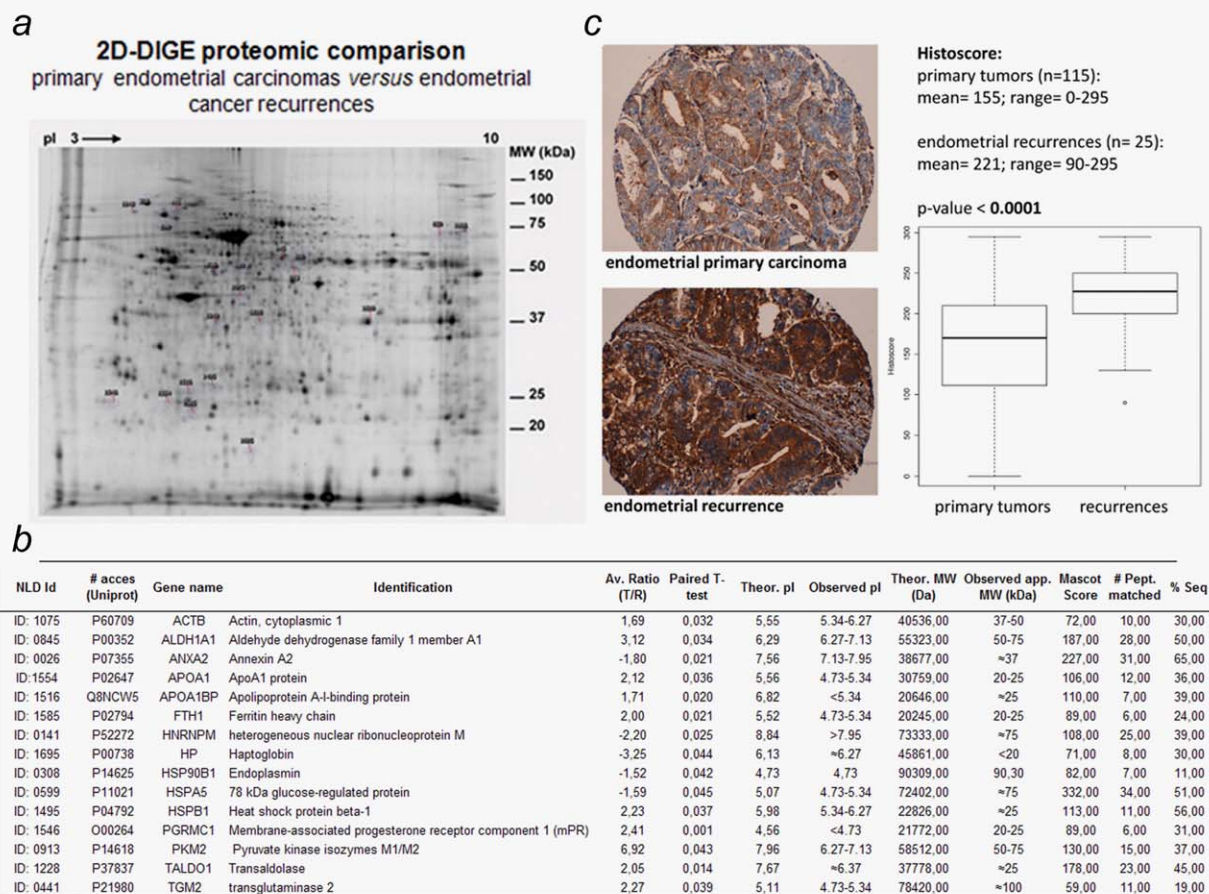
primary carcinomas, included ANXA2, HNRNPM, HP, HSP90B1 and HSPA5 (Fig. 1b).

ANXA2 was further evaluated by immunohistochemistry in tissue microarrays including 115 primary endometrioid carcinomas of endometrium and 25 post radiation recurrences (Supporting Information Table 2). Two different tumor cylinders per case were evaluated and immunohistochemical staining was semi-quantitatively graded based on the percentage and on the intensity of the labelling. Histological scores ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity) by applying the formula:  $\text{Histoscore} = 1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate staining}) + 3 \times (\% \text{ strong staining})$ . Representative examples of ANXA2 staining are presented in Figure 1c. ANXA2 overexpression in postradiation recurrences (mean Histoscore 221.6; range 90–295) was found to be statistically significant compared to primary carcinomas (mean Histoscore 155.4; range 0–295) ( $p < 0.0001$ ; Fig. 1c). Although a number of biomarkers have been described with a predictive value for recurrent disease in endometrial cancer, this is to our knowledge the first approach leading to the identification of ANXA2 as a potential biomarker of recurrences through the direct proteomic comparison of primary and recurrent endometrial cancer lesions.

### Silencing of ANXA2 expression reverts the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and in vitro migratory and clonogenic abilities

We next functionally assessed the involvement of ANXA2 during the process of endometrial cancer dissemination and metastasis. First, we explored whether ANXA2 regulation represented a benefit for endometrial tumor cells to overcome radiation and chemotherapy sensitivity, and consequently progress into recurrent disease. For this, we used shRNA lentiviral particles to silence the expression of ANXA2 in the human endometrial cancer cell line Ishikawa (Fig. 2a). As shown in Figure 2b, Ishikawa cells expressing (IK-pLKO) or not ANXA2 (IK-shANXA2) did not present significant differences in colony formation upon increased radiation. Similar results were obtained with Ishikawa cells exposed to zoledronic acid and docetaxel cytotoxic concentrations, showing no significant difference in chemotherapy sensitivity in the presence or not of ANXA2 expression (Supporting Information Fig. S1). These results suggested that ANXA2 does not seem to play a role in the promotion of endometrial carcinomas into recurrent disease by interfering with sensitivity to radio/chemotherapy.

We then explored whether ANXA2 was directly involved in the acquisition of cellular capabilities related to the promotion of metastasis, by analyzing *in vitro* the role of this biomarker in cell migration and the promotion of metastasis implants. As shown in Figure 2c, down-regulation of ANXA2 lead to a reversion of the mesenchymal-like phenotype of Ishikawa cells into a more epithelial phenotype, as evidenced both by morphological features and Vimentin and E-Cadherin expression levels as hallmarks of EMT. Concordantly, ANXA2



**Figure 1.** Proteomic identification of potential biomarkers of endometrial cancer recurrences. (a) Representative 2D-DIGE proteomic comparison of primary endometrial carcinomas versus endometrial cancer recurrences. (b) List of proteins identified in the 2D-DIGE experiments comparing primary tumor tissues and recurrences. (c) Representative examples of ANXA2 staining in endometrial primary carcinomas and recurrences, and statistical evaluation of ANXA2 as biomarker of recurrences in endometrial cancer. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

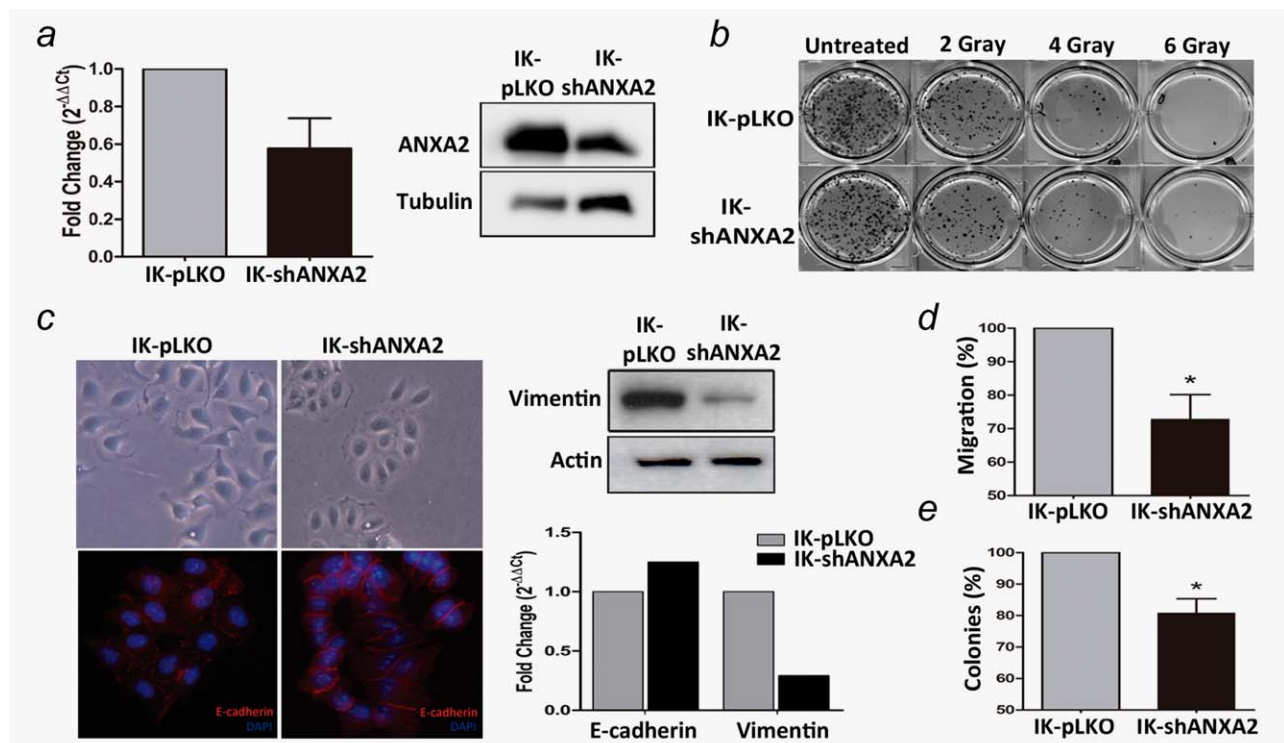
silencing resulted in a decreased capability of Ishikawa cells to migrate through the porous membrane of a boyden chamber in the presence of EGF as a chemotactic agent (Fig. 2d). These results suggested a role for ANXA2 in the acquisition of an aggressive phenotype of endometrial cancer cells during the initial steps of tumor infiltration and dissemination. We finally evaluated *in vitro* the ability of IK-pLKO and IK-shANXA2 cells in colony formation in the absence of a solid substrate, referring to the potential of tumor cells to generate metastasis. Ishikawa cells embedded in a semisolid agarose medium presented a reduced capability to generate implants in a clonogenic assay in the absence of ANXA2 expression (Fig. 2e). All these *in vitro* results suggested that ANXA2 may play a role in the promotion of metastasis in endometrial cancer.

#### Silencing of ANXA2 prevents hematogenous dissemination and metastasis in an *in vivo* model

We next translated these *in vitro* results into an *in vivo* model mimicking distant dissemination and metastasis. For this, we performed intracardiac injection of the Ishikawa cells in the

presence or not of ANXA2 expression and evaluated the extent of metastatic disease by luminescent imaging. As shown in Figure 3a, global luciferase signal as reporter gene evidenced a reduced metastatic burden in those animals injected with ANXA2 deficient Ishikawa cells. Histopathology analysis showed that mice injected with IK-pLKO or with IK-shANXA2 cells presented a similar pattern of dissemination, mainly metastasizing to adrenal glands and ovaries (Fig. 3c). Of note, ovarian metastases denoted a particular pattern of endometrial cancer dissemination closely related to the clinics, probably associated with a common mesenteric origin. More importantly, ANXA2 knock down resulted in a complete absence of lung and hematogenous metastasis (Figs. 3b and 3c).

We further explored distant dissemination by enumeration of Circulating Tumor Cells (CTC) with the CellSearch System (Veridex LLC, Janssen Diagnostics, NJ) that combines immunoenrichment and immunofluorescence. Hematogenous dissemination assessed both by immunohistochemistry and by enumeration of CTC in mice, was impaired in the absence of ANXA2 expression (Figs. 3c and 3d). All these data



**Figure 2.** *In vitro* evaluation of ANXA2 silencing in the Ishikawa endometrial cancer cell line. (a) Decrease in ANXA2 RNA expression by RT-qPCR (left panel) and protein levels by western blot (right panel) upon stable shRNA silencing in the Ishikawa cell line. (b) Silencing of ANXA2 in the Ishikawa cell line did not result in an increased sensitivity to radiation. On the contrary, silencing of ANXA2 resulted in: (c) reversion of the mesenchymal into an epithelial phenotype by silencing of ANXA2 evidenced by RNA and protein reduced levels of Vimentin and increased levels of E-cadherin; (d) reduced capacity of Ishikawa cells to migrate in a boyden chamber migration assays (Student's *t*-test, \**p* < 0.05); and (e) diminished efficiency in the generation of colonies in semisolid culture conditions (Student's *t*-test, \**p* < 0.05). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

confirmed *in vivo* a role for ANXA2 in the promotion of metastasis in endometrial cancer.

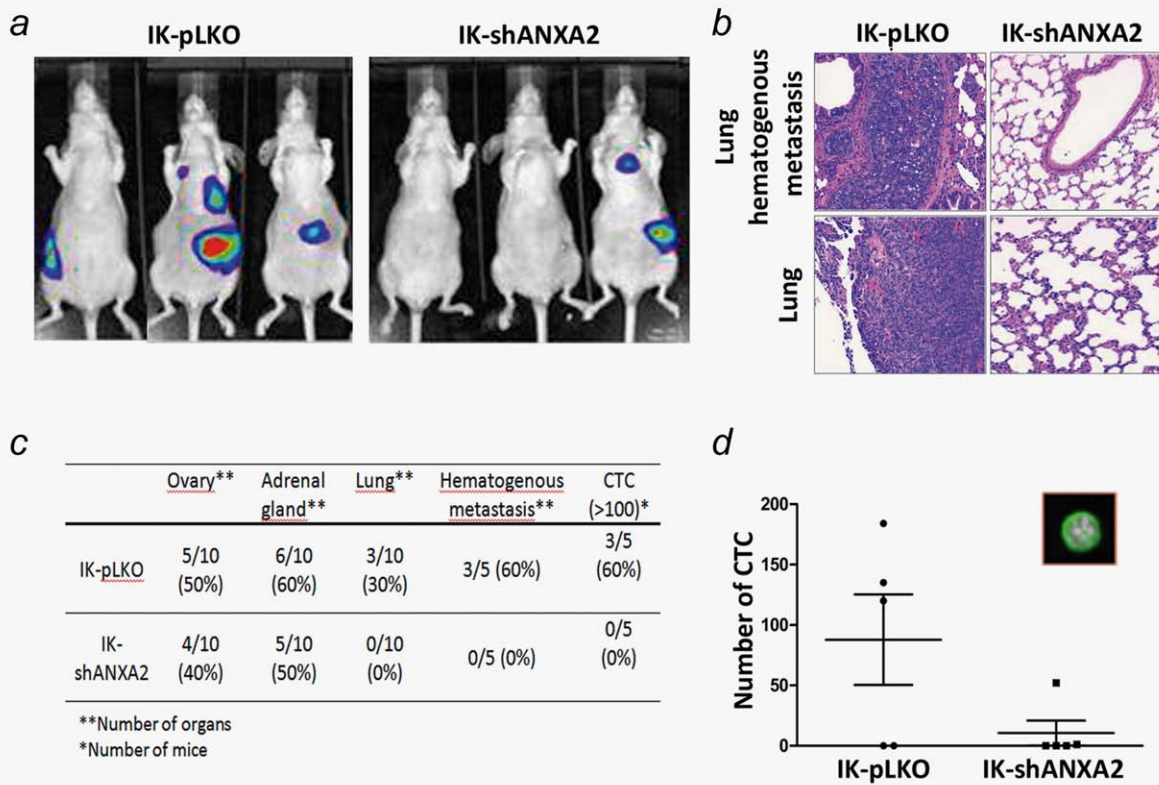
We further complemented these *in vivo* results by exploring ANXA2 expression in CTC isolated from 34 high-risk endometrial cancer patients, ranging from Grade 3 Stage IB to Stage IV carcinomas and recurrences, and 27 healthy controls. Samples were subjected to EpCAM-based immunoisolation using CELLction™ Epithelial Enrich kit (Invitrogen, DYNAL, Oslo, Norway) followed by quantitative Real-Time PCR analysis as previously described.<sup>15</sup> We could confirm a gradual increase from healthy controls to patients with no recurrent disease, and a further increase in patients presenting recurrent disease (Fig. 4a). These data translate into clinically relevant samples the proposed role of ANXA2 during metastatic dissemination, and suggest its potential as surrogate marker of disseminated CTC for the management of high-risk endometrial cancer patients.

#### ANXA2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cancer

Once demonstrated that (i) ANXA2 expression was up-regulated in recurrent disease compared to primary lesions (2D-DIGE proteomics with subsequent validation by immunohistochemistry), and (ii) ANXA2 actively promoted

metastasis dissemination both in *in vitro* and *in vivo* model systems, we assessed the clinical utility of ANXA2 as a predictor of endometrial cancer recurrences. First, we checked differences in ANXA2 expression between endometrioid endometrial carcinomas (EEC; 93 cases; Supporting Information Table 3) and non-endometrioid endometrial carcinomas (NEEC; 38 cases; Supporting Information Table 3). NEEC (including serous and clear cell carcinomas) presented a 17% elevated ANXA2 expression compared to EEC (*p* = 0.005; mean 231.35 vs. 197.42 histoscore, respectively; data not shown). Afterwards, we checked the influence of histological grade in EEC. Interestingly, no statistical differences were observed among the EEC samples in the mean immunoprotein expression values for ANXA2 depending on histological grade (means 205.54, 193.06, and 183.71 for grades 1, 2, and 3 respectively, *p* = 0.48; data not shown).

The increased expression of ANXA2 in NEEC in comparison with EEC raised the possibility that the elevated expression of ANXA2 in recurrent tumors could be due to the more frequent presence of NEEC among recurrent tumors, since NEEC is associated with aneuploidy<sup>16,17</sup> and increase of recurrence. To rule out this possibility, we decided to evaluate the association of ANXA2 immunoprotein expression with the risk of recurrences, exclusively in EEC samples. We recruited

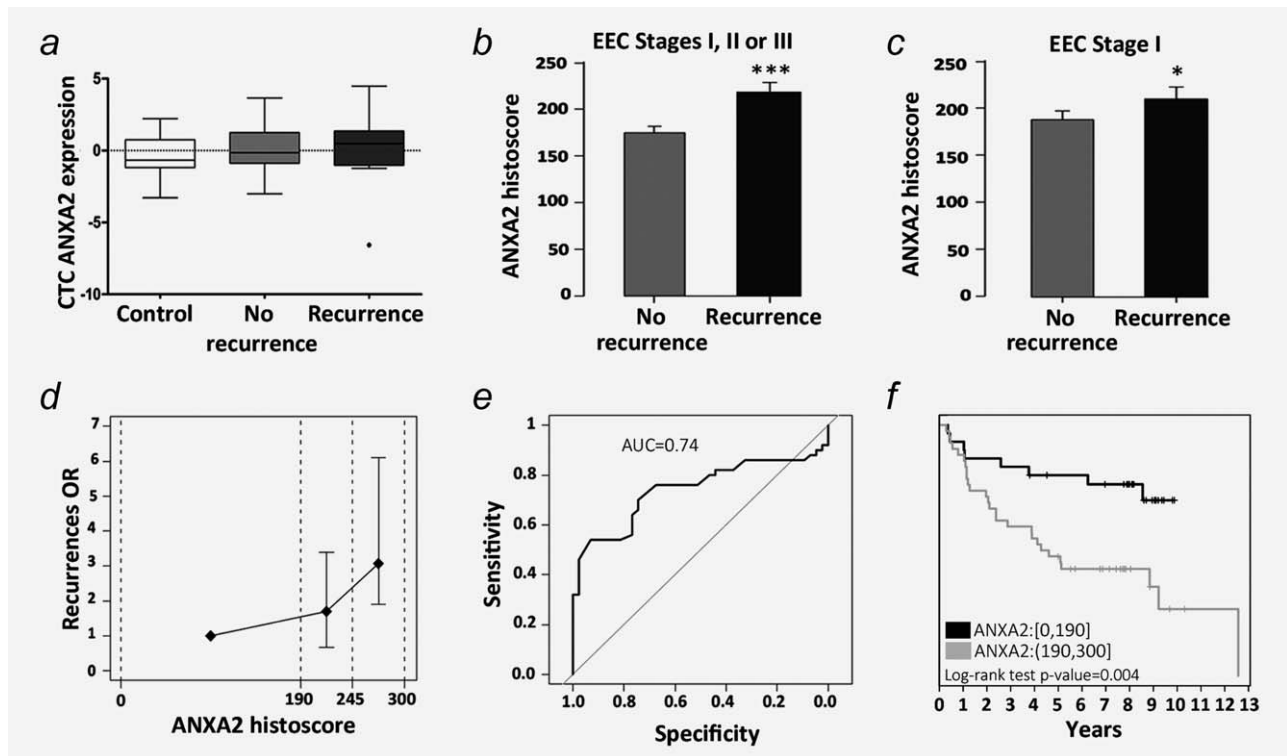


**Figure 3.** *In vivo* evaluation of ANXA2 silencing in a mouse model of endometrial cancer metastasis. (a) Representative examples of the pattern of metastasis upon intracardiac injection of IK-pLKO (left panels) and IK-shANXA2 (right panels) cells. Silencing of ANXA2 expression resulted in a reduced metastasis burden as demonstrated by luciferase reporter bioluminescence. (b) Representative H&E images illustrating the absence of hematogenous and lung metastasis in mice injected with IK-shANXA2 cells compared to control IK-pLKO cells. (c) Distribution of metastasis in the Ishikawa model in the presence/absence of ANXA2 expression. (d) Circulating Tumor Cells (CTC) enumeration by CellSearch technology in peripheral blood samples from mice injected with IK-pLKO or IK-shANXA2 cells (representative example of a CTC positive for CK expression). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

samples of primary EEC from 93 patients including 43 primary carcinomas that did not relapse and 50 primary carcinomas that progressed to recurrent disease (Supporting Information Table 4). ANXA2 expression was found to be a 24.76% superior in EEC that ended up in recurrent disease compared to those that did not recur ( $p < 0.0001$ ; mean 217.87 vs. 174.62 histoscore, respectively, Fig. 4b), evidencing the potential of ANXA2 as biomarker in intermediate-risk endometrial carcinomas. The value of ANXA2 as biomarker of recurrent disease was further demonstrated in initial EEC stages I and II as they represent the subset of endometrial carcinomas less prone to develop recurrences and so elusive to identify. From a total of 63 stage I tumors (31 associated with recurrences, and 32 not associated with recurrences; see Supporting Information Table 4), those tumors that end up in recurrent disease presented 18.29% higher ANXA2 levels in comparison to those that did not recur ( $p = 0.01$ , mean 210.37 vs. 177.85 histoscore, respectively; Fig. 4c). This was further improved when we evaluated stage I and stage II EEC together (78 cases; 38 associated with recurrence and 40 not associated with recurrence); tumors that recurred presented 25.22% higher ANXA2 levels in comparison with those that

did not recur ( $p = 0.0002$ , mean 220.51 vs. 176.09 histoscore, respectively; data not shown). A retrospective comparison of primary carcinomas and matched recurrences is ongoing to evaluate whether ANXA2 increased expression impacts early in the process of metastasis.

To confirm the clinical significance of ANXA2 in the prediction of recurrences in endometrial cancer, we generated optimal thresholds in ANXA2 histoscore scale among EEC cases with stages I, II or III (Table 1). This demonstrated a 73.98% of recurrences in cases with ANXA2 histoscore higher than 190 compared to 29.27% of recurrence in those cases under this threshold, with a 2.5 increased risk of recurrence (OR = 2.5,  $p < 0.0001$ ). The sensitivity and specificity in the prediction of recurrences with an ANXA2 histoscore threshold of 190 were 76% (62–87% 95% CI) and 67% (51–81% 95% CI), respectively. In addition, a more detailed analysis revealed an increasing trend in the risk of recurrence depending on ANXA2 expression, with OR 1.70 and 3.07 for ANXA2 histoscore intervals of 190 to 245 and 246 to 300, respectively (Table 1, Fig. 4d). More importantly, similar results were obtained when we specifically analysed stages I or II EEC cases, showing a 2.59 higher risk of recurrence for



**Figure 4.** Impact of ANXA2 biomarker in clinically relevant endometrial cancer patients. (a) ANXA2 expression by RT-q-PCR upon EpCAM-based CTC immunoisolation, from 34 high-risk endometrial cancer patients including recurrent and no-recurrent disease, and 27 healthy controls (Kruskal-Wallis non-parametric test with Dunn's post-test). (b) ANXA2 differential expression in recurrences respect to no recurrences in EEC stage I to III cases (Mann-Whitney test,  $***p < 0.001$ ). (c) ANXA2 differential expression in recurrences respect to no recurrences in EEC stage I cases (Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ ). Mean (and standard error of the mean) shown in bars (b and c). (d) Odds-ratios for the probability of recurrence in EEC I, II and III cases depending on the ANXA2 immunoprediction in intervals. (e) Receiver Operation Characteristic curve to evaluate the predictability of ANXA2 immunoprediction levels in a logistic regression model, area under the curve (AUC) shown. (f) Kaplan-Meier curves for assessing relapse-free survival time depending on the groups defined by the ANXA2 immunoprediction threshold.  $p$  Value from the log-rank test is shown.

**Table 1.** Definition of a threshold in ANXA2 immunostaining levels to predict recurrences in stage I, II or III EEC samples

ANXA2 histoscore	Recurrences (%)	No recurrences (%)	Total (%)	OR (CI 95%)	$p$
(0–190)	12 (29.27)	29 (70.73)	41 (100)	1	
(190–245)	11 (50)	11 (50)	22 (100)	1.70 (0.91–3.22)	0.16
(246–300)	27 (90)	3 (10)	30 (100)	3.07 (1.88–5.02)	<0.0001
(190–300)	38 (73.98)	14 (26.92)	52 (100)	2.50 (1.51–4.13)	<0.0001
	50 (53.76)	43 (46.24)	93 (100)		

Number (and percentage) of recurrences and non-recurrences for each interval in the histoscore scale. Odds ratio (OR) with respect to the low interval and  $p$  value for each OR.

those samples with ANXA2 histoscore above 190 (OR = 2.59,  $p = 0.0005$ , Supporting Information Table 6). The probabilities obtained in a logistic model containing ANXA2 as predictor obtained an area under the curve of 0.74 in a ROC analysis (Fig. 4e), further reinforcing the significance of ANXA2 in the prediction of recurrences in endometrial carcinomas. Finally, the analysis of the relapse-free survival time clearly indicated that time to recurrence was much lower in patients with ANXA2 histoscore above 190 (HR = 2.99,  $p$  value = 0.004, Table 2), also suggesting an increasing trend in

the intervals 190 to 245 and 246 to 300 (HR = 1.71 and 4.69, respectively; Table 2) with respect to interval 0 to 190. In addition, Kaplan-Meier relapse-free curve was lower for patients with ANXA2 histoscore in the interval 190 to 300 than for patients with ANXA2 histoscore in the interval 0 to 190 (Fig. 4f), achieving statistical significance ( $p = 0.004$ , Fig. 4f). Kaplan-Meier specific relapse-free survival rates were 86%, 69% and 45% at 1, 2 and 5 years respectively for patients with ANXA2 histoscore in the interval 190 to 300 and 90%, 83% and 76% at 1, 2 and 5 years, respectively for



**Table 2.** Relapse-free survival time analysis of patients depending on the ANXA2 histoscore intervals

ANXA2 histoscore	HR (95% CI)	p	Kaplan-Meier survival rates (95% CI)		
			1 yr	2 yrs	5 yrs
(0–190)	1		90% (80–100%)	83% (71–98%)	76% (62–93%)
(190–245)	1.71 (0.64–4.57)	0.28	79% (63–99%)	74% (56–96%)	68% (50–93%)
(246–300)	4.69 (2.00–11.03)	0.0004	87% (74–99%)	61% (44–84%)	22% (10–47%)
(190–300)	2.99 (1.35–6.64)	0.004	86% (76–97%)	69% (56–84%)	45% (32–63%)

Hazard ratios (HR), and their corresponding 95% confidence intervals (CI) and *p* values from a Cox proportional hazards regression model. Kaplan-Meier survival rates at 1, 2 and 5 years with their 95% CI.

patients with ANXA2 histoscore at the interval 0 to 190 (Table 2).

### Discussion

We here present a proteomic analysis aiming to identify biomarkers of recurrent disease in endometrial cancer, the main clinical challenge nowadays for the most common tumor of the female genital tract. Among identified candidates we could find usual suspects like Haptoglobin (HP), associated with recurrent disease in different types of cancer,<sup>18</sup> although its value as a predictor of recurrence free survival is still on debate.<sup>19</sup> Acute phase proteins represent an interesting group of potential biomarkers in gynecological malignancies.<sup>20,21</sup> More interestingly, Annexins represent a superfamily of closely related calcium and membrane binding proteins with a wide variety of cellular functions including vesicle trafficking, cell division, apoptosis, calcium signaling, and growth regulation. Changes in the expression of individual annexins are associated with particular types of tumour and hence the annexins may also be useful biomarkers in the clinic. Likewise, individual annexins have a variety of roles in tumour development and progression, including involvement in cell signaling pathways, cell motility, tumour invasion and metastasis, angiogenesis, apoptosis and drug resistance.<sup>22</sup> Cell surface ANXA2 is a receptor/binding protein for both proteases (cathepsin B, plasminogen and tissue plasminogen activator) and extracellular matrix proteins (type 1 collagen and tenascin C) involved in tumour invasion and metastasis. Expression levels of ANXA2 were reported to correlate with the occurrence, invasion and metastasis of malignant tumors.<sup>23</sup> In addition, an overexpression of this protein has been described in stage I endometrial cancer compared to normal endometrium,<sup>24</sup> and also correlated with markers of EMT and dysmenorrhea severity of adenomyosis patients.<sup>25</sup> Moreover, ANXA2 inhibition significantly diminished embryo adhesiveness, being involved in endometrial epithelial cell migration and trophoblast outgrowth.<sup>26</sup> Interestingly, ANXA2 has been linked to cell-cell crosstalk through multivesicular signaling.<sup>27,28</sup>

We further demonstrated in *in vitro* and *in vivo* model systems that the expression of ANXA2 is associated with an improved ability to generate metastasis, although the intracardiac injection *in vivo* model might be evaluating the

impact of ANXA2 only in late events of CTC extravasation and colonization. Consistent with the observations of ANXA2 in adenomyosis,<sup>25</sup> silencing of ANXA2 in an endometrial cancer cell line resulted in a reversion of its aggressive mesenchymal and migratory phenotype. EMT is a dynamic process whereby epithelial cells lose polarity and cell-cell contacts, undergo dramatic remodeling of the cytoskeleton, acquire a migratory phenotype and a mesenchymal-like gene expression program. Both invasion and metastasis may be critically dependent on the acquisition by the incipient cancer cell of EMT features.<sup>29,30</sup> Consequently, hematogenous metastasis were reduced in the absence of ANXA2, evaluated by histology examination and CTC enumeration in a mice model of intracardiac injection as reliable model to assess the impact of specific molecular alterations in the whole process of tumor dissemination and metastasis in endometrial cancer. The spread of cancer relies on the detachment of aggressive malignant cells from the primary tumor into the bloodstream as a principal source of the further metastasis.<sup>31</sup> It is widely accepted that CTC own or acquire the ability to evade the host immune system and to reach a distant organ where they establish a secondary tumor growth site in a highly inefficient but dramatic process.<sup>32</sup> Concordantly, the presence of CTC in peripheral blood has been associated with poor prognosis in different types of cancer.<sup>33–35</sup>

We finally analysed in a retrospective study including 131 patients the significance of ANXA2 as biomarker of recurrences. The entire results highlight the clinical interest of ANXA2 expression assessment in primary endometrial carcinomas as a predictor of recurrent disease, and as a potential tool for optimal stratification of patients susceptible to receive radical surgery and radio/chemotherapy. This study remarkably demonstrated the validity of ANXA2 to discriminate between early stage endometrial carcinomas on risk or not to recur. A retrospective multicenter study in the framework of the European Network for Individualized Treatment of Endometrial Cancer (ENITEC) is currently being performed in FFPE tissues from primary endometrial carcinomas to validate this hypothesis. In addition, a prospective study of ANXA2 expression in paired primary carcinomas and matched uterine curettages is being conducted to assess the potential of ANXA2 in minimally invasive screening; a proof of concept in 10 cases demonstrated a statistically significant

correlation between endometrial aspirates and tumor tissue from the hysterectomy specimen (0.88 Spearman correlation;  $p = 0.0008$ ).

In conclusion, we presented a proteomic approach leading to the identification of ANXA2 as a marker of recurrent disease in endometrial cancer. We validated by immunohistochemistry an increased ANXA2 expression in endometrial cancer recurrences. We further established a role for ANXA2 in the promotion of metastasis *in vitro* and *in vivo*, reinforcing

at the functional level its validity as biomarker of recurrences in endometrial cancer. We finally demonstrated the clinical utility of ANXA2 biomarker as predictor of recurrent disease in endometrial cancer. The multicentric confirmation will definitely implement ANXA2 at the clinical setting.

### Acknowledgements

L. Alonso-Alconada is recipient of fellowship from the Basque Government (Spain).

### References

- Wright JD, Barrena Medel NI, Schouli J, et al. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet* 2012;379:1352–60.
- Benedetti Panici P, Basile S, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1707–16.
- Kitchener H, Swart AM, Qian Q, et al. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet* 2009;373:125–36.
- Faca VM, Ventura AP, Fitzgibbon MP, et al. Proteomic analysis of ovarian cancer cells reveals dynamic processes of protein secretion and shedding of extra-cellular domains. *PLoS One* 2008;3:e2425.
- Salamonsen LA, Edgell T, Rombauts LJ, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril* 2013;99:1086–92.
- Casado-Vela J, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, et al. Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res* 2009;8:4622–32.
- DeSouza LV, Taylor AM, Li W, et al. Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *J Proteome Res* 2008;7:3525–34.
- Farias-Eisner G, Su F, Robbins T, et al. Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:73 e1–5.
- Brennan DJ, Hackethal A, Metcalf AM, et al. Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer - a population based study. *Gynecol Oncol* 2014;132:159–65.
- Zeimet AG, Reimer D, Huszar M, et al. LICAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1142–50.
- Meehan KL, Rainczuk A, Salamonsen LA, et al. Proteomics and the search for biomarkers of female reproductive diseases. *Reproduction* 2010;140:505–19.
- Van Gorp T, Cadron I, Vergote I. The utility of proteomics in gynecologic cancers. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23:3–7.
- Monge M, Doll A, Colas E, et al. Subtractive proteomic approach to the endometrial carcinoma invasion front. *J Proteome Res* 2009;8:4676–84.
- Sorolla A, Yeramian A, Valls J, et al. Blockade of NFkappaB activity by Sunitinib increases cell death in bortezomib-treated endometrial carcinoma cells. *Mol Oncol* 2012;6:530–41.
- Alonso-Alconada L, Muinelo-Romay L, Madissoon K, et al. Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. *Molecular Cancer*, in press.
- Gemoll T, Habermann JK, Lahmann J, et al. Protein profiling of genomic instability in endometrial cancer. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:325–33.
- Habermann JK, Bundgen NK, Gemoll T, et al. Genomic instability influences the transcriptome and proteome in endometrial cancer subtypes. *Mol Cancer* 2011;10:132.
- Kuhajda FP, Piantadosi S, Pasternack GR. Haptoglobin-related protein (Hpr) epitopes in breast cancer as a predictor of recurrence of the disease. *N Engl J Med* 1989;321:636–41.
- Gast MC, van Tinteren H, Bontenbal M, et al. Haptoglobin phenotype is not a predictor of recurrence free survival in high-risk primary breast cancer patients. *BMC Cancer* 2008;8:389.
- Paternoster D, Cartei G, Campagnutta E, et al. Acute reactive stage proteins in gynaecologic cancers. *Eur J Gynaecol Oncol* 1980;1:94–8.
- Suh DH, Kim HS, Chung HH, et al. Pre-operative systemic inflammatory response markers in predicting lymph node metastasis in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;162:206–10.
- Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol* 2008;216:131–40.
- Zhang X, Liu S, Guo C, et al. The association of annexin A2 and cancers. *Clin Transl Oncol* 2012;14:634–40.
- Maxwell GL, Hood BL, Day R, et al. Proteomic analysis of stage I endometrial cancer tissue: identification of proteins associated with oxidative processes and inflammation. *Gynecol Oncol* 2011;121:586–94.
- Zhou S, Yi T, Liu R, et al. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:M112 017988.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quinonero A, et al. Annexin A2 is critical for embryo adhesiveness to the human endometrium by RhoA activation through F-actin regulation. *FASEB J* 2012;26:3715–27.
- Valapala M, Vishwanatha JK. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *J Biol Chem* 2011;286:30911–25.
- Vedeler A, Hollas H, Grindheim AK, et al. Multiple roles of annexin A2 in post-transcriptional regulation of gene expression. *Curr Protein Pept Sci* 2012;13:401–12.
- Colas E, Pedrola N, Devis L, et al. The EMT signaling pathways in endometrial carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2012;14:715–20.
- Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 2012;22:361–8.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: a review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem* 2006;108:327–34.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213–21.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781–91.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302–9.



### 3.4 Objectiu 2

**Determinació d'una firma molecular de diversos marcadors immunohistoquímics que permeti identificar correctament els EEC grau I, II, III, els SCE i els mixtes EEC-SCE per tal que millori l'acord interobservador.**

*Maria Santacana, Óscar Maiques, Joan Valls, et al. A 9-protein biomarker molecular signature for predicting histological type in endometrial carcinoma by immunohistochemistry. Hum Pathol. 2014 Aug 23*

1. L'anàlisi diferencial d'expressió ha permès identificar 13 biomarcadors associats individualment amb el tipus histològic.
2. S'han identificat 9 biomarcadors utilitzant per a cada un un valor llindar en l'escala *histoscore* per predir SCE contra EEC 1-2 (p53 $\geq$ 20, IMP2 $\geq$ 115, IMP3 $\geq$ 2, Ciclina E1 $\geq$ 220, HMGA2 $\geq$ 20, FolR1 $\geq$ 50, p16 $\geq$ 170, PTEN nuclear $\geq$ 2 i ER $\leq$ 50). Hem establert una regla discriminatòria que considera els casos que compleixen 0-5 condicions (predits com a EEC) respecte aquells que compleixen 6-9 condicions (predits com a SCE).
3. La regla discriminatòria prediu correctament tots els EEC G1-2 i 18 SCE, però 3 SCE s'han predit de forma incorrecta com a EEC. A més, prediu correctament tots els EEC G3 com a EEC, però només identifica correctament els components EEC i SCE en 4 de 9 EEC-SCEs mixtes.
4. La firma molecular avaluada en una sèrie independent identifica correctament 24 de 29 EEC G1-2 i 24 de 28 EEC G3 com a EEC i tots els SCE com a SCE.
5. Dels 12 casos discrepants, en 3 casos l'anàlisi mutacional no és específic ni de EEC ni de SCE. 6 casos presenten mutacions típiques d'EEC (PIK3CA, PTEN, FGFR2) i un cas presenta una mutació de p53 i dues mutacions de PTEN, per tant els classifiquem com EEC d'acord amb el diagnòstic patològic. Un cas predit com a SCE mitjançant la firma de biomarcadors presenta mutacions de p53 i per tant, molecularment, el classifiquem com a SCE. Finalment, un cas que microscòpicament era un SCE però que es va predir de EEC, l'anàlisi mutacional va confirmar un SCE.



**Original contribution**

# A 9-protein biomarker molecular signature for predicting histologic type in endometrial carcinoma by immunohistochemistry<sup>☆,☆☆</sup>



Maria Santacana BSc<sup>a</sup>, Oscar Maiques BSc<sup>a</sup>, Joan Valls PhD<sup>a</sup>, Sònia Gatius MD<sup>a</sup>, Ana Isabel Abó MD<sup>a</sup>, María Ángeles López-García MD<sup>b</sup>, Alba Mota BSc<sup>c</sup>, Jaume Reventós MD, PhD<sup>d</sup>, Gema Moreno-Bueno PhD<sup>c</sup>, Jose Palacios MD, PhD<sup>b,e</sup>, Carla Bartosch MD<sup>f</sup>, Xavier Dolcet PhD<sup>a</sup>, Xavier Matias-Guiu MD, PhD<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

<sup>b</sup>Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>c</sup>Foundation MD Anderson Cancer Centre Madrid and Departament of Biochemistry, Universidad Autonoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), IdiPAZ, Madrid, Spain

<sup>d</sup>Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain

<sup>f</sup>Portuguese Oncology Institute–Porto, Research Center of Portuguese Oncology Institute–Porto, Centro Hospitalar São João, Porto, Portugal

Received 13 May 2014; revised 25 June 2014; accepted 28 June 2014

**Keywords:**

Endometrial carcinoma;  
Histologic type;  
Endometrioid/serous;  
Biomarker;  
Immunohistochemistry

**Summary** Histologic typing may be difficult in a subset of endometrial carcinoma (EC) cases. In these cases, interobserver agreement improves when immunohistochemistry (IHC) is used. A series of endometrioid type (EEC) grades 1, 2, and 3 and serous type (SC) were immunostained for p53, p16, estrogen receptor, PTEN, IMP2, IMP3, HER2, cyclin B2 and E1, HMGA2, FolR1, MSLN, Claudins 3 and 4, and NRF2. Nine biomarkers showed significant differences with thresholds in IHC value scale between both types (p53  $\geq$  20, IMP2  $\geq$  115, IMP3  $\geq$  2, cyclin E1  $\geq$  220, HMGA2  $\geq$  30, FolR1  $\geq$  50, p16  $\geq$  170, nuclear PTEN  $\geq$  2 and estrogen receptor  $\leq$  50;  $P < .005$ ). This combination led to increased discrimination when considering cases satisfying 0 to 5 conditions predicted as EEC and those satisfying 6 to 9 conditions predicted as SC. This signature correctly predicted all 48 EEC grade 1-2 cases and 18 SC cases, but 3 SC cases were wrongly predicted as EEC. Sensitivity was 86% (95% confidence interval [CI], 64%-97%), and specificity was 100% (95% CI, 89%-100%). The classifier correctly predicted all 28 EEC grade 3 cases but only identified the EEC and SC components in 4 of 9 mixed EEC-SC. An independent validation series (29 EEC grades 1-2, 28 EEC grade 3, and 31 SC) showed 100% sensitivity (95% CI, 84%-100%) and 83% specificity (95% CI, 64%-94%). We propose

<sup>☆</sup> Competing interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

<sup>☆☆</sup> The research team was supported by grants: FIS PI100922, Fundación Mutua Madrileña AP75732010, 2009SGR794, RD12/0036/0013, Fundación Asociación Española contra el Cancer, programa de intensificación de la investigación, and Instituto Carlos III.

\* Corresponding author. Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Av Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain.

E-mail address: [fjmatiasguiu.lleida.ics@gencat.cat](mailto:fjmatiasguiu.lleida.ics@gencat.cat) (X. Matias-Guiu).

an internally and externally validated 9-protein biomarker signature to predict the histologic type of EC (EEC or SC) by IHC. The results also suggest that mixed EEC-SC is molecularly ambiguous.  
© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

There are 2 main clinicopathological variants of endometrial carcinomas (ECs): endometrioid carcinomas (EEC; type I), and nonendometrioid carcinomas (NEEC; type II). Histologic typing is a strong prognostic indicator in EC [1,2]. EECs are estrogen-related carcinomas that usually develop in perimenopausal women. Most EECs are low-grade tumors (grades 1 and 2; EEC 1-2). Grade 3 EEC (EEC 3) is an aggressive tumor, with increased frequency of lymph node metastasis. NEECs are very aggressive, unrelated to estrogen stimulation that mainly occurs in older women; NEEC includes serous (SC) and clear cell carcinoma.

Classification of EC according to histologic type is easy in most cases but may be difficult in some high-grade tumors [3,4]. There is poor interobserver agreement in assessing histologic type in this subset of tumors [5]. The Cancer Genome Atlas Research Network has recently performed an integrated genomic characterization of EC [6]. Exome sequence analysis revealed 4 groups of tumors. The study has shown that there are tumors that are morphologically EEC but molecularly similar to SC, and also tumors that are microscopically SC but molecularly similar to EEC. These ambiguous tumors show discordant microscopic/molecular features. However, in agreement with the recent World Health Organization (WHO) classification of tumors of the female genital tract [7], EC should be classified according to microscopic appearance, until a consensus is reached regarding incorporation of molecular data into histologic typing.

The aim of the study was to obtain a panel of antibodies to design a diagnostic predictor of histologic typing (EEC versus SC). Several proteins, previously shown to be differentially expressed in EEC and SC by complementary DNA (cDNA) and protein analysis were tested individually and collectively, and results were validated in an independent series of cases. In this study, microscopic appearance was taken as criterion standard, based on recommendations by the recent WHO classification [7]. However, discordant cases were subjected to mutation analysis by last-generation sequencing to rule out the possibility that they were ambiguous tumors with discordant genetic/microscopic features.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Case selection

Three tissue microarrays (TMAs) were constructed from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue corresponding to

EEC 1-2 (52 cases), EEC grade 3 (28 cases), and SC (23 cases). Nine cases of mixed EEC-SC (both components) were also included. Very strict criteria were used for diagnosing these mixed tumors, with particular care to exclude EEC with peculiar surface changes. The mixed nature of these tumors was confirmed by mutational analysis (*CTNNB1*, *KRAS*, *PTEN*, *PIK3CA*, *TP53*) of both components separately. Moreover, follow-up data of these patients showed intermediate survival between EEC and SC patients (data not shown).

All tumor samples were obtained from Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, and Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. The tumors were classified following the most recent WHO criteria [7]. They were surgically staged and graded according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging and grading systems. The study was approved by the local ethical committee, and a specific informed consent was used. A tissue arrayer device (Beecher Instrument, Silver Spring, MD) was used to construct the TMA. Two selected cylinders (1 mm in diameter) from 2 different areas were included in each case. Control normal tissues from the same EC specimens were also included.

### 2.2. Case selection for validation

We used an independent external series consisting of 88 cases from Portuguese Oncology Institute, Porto, Portugal. The series included 29 EEC 1-2, 28 EEC 3, and 31 SC cases. A TMA was constructed with identical methodology to the initial series of cases.

### 2.3. Immunohistochemistry study

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m and dried for 1 hour at 65°C before pretreatment procedure of deparaffinization, rehydration, and epitope retrieval in the Pre-Treatment Module, PT-LINK (Dako, Glostrup, Denmark) at 95°C for 20 minutes in 50 $\times$  Tris/EDTA buffer, pH 9. Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. Samples were subjected to IHC for several proteins, previously found to be differentially expressed between EEC and SC by cDNA and protein analysis (Table 1). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision FLEX Detection Kit (Dako, Glostrup, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Appropriate negative controls were also tested.

IHC staining was graded semiquantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histologic score ( $H_s$ ) was obtained from each sample, and values ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following

**Table 1** Antibodies used in this study

Antibody	Staining pattern	Clone	Dilution	Source
p53	Nuclear	DO-7	Ready to use	Dako (Glostrup, Denmark)
p16	Nuclear	CINtec Histology	Ready to use	Roche (Basel, Switzerland)
PTEN	Nuclear and cytoplasmic	6H2.1	1:100	Dako (Glostrup, Denmark)
ER	Nuclear	EP1	Ready to use	Dako (Glostrup, Denmark)
IMP2	Cytoplasmic	EPR6741(B)	1:100	Abcam (Cambridge, MA)
IMP3	Cytoplasmic	69.1	1:100	Dako (Glostrup, Denmark)
HER2	Membranous	HercepTest	Ready to use	Dako (Glostrup, Denmark)
Cyclin B2	Nuclear	X29.2	1:300	Abcam (Cambridge, MA)
Cyclin E1	Nuclear	Polyclonal	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
HMGA2	Nuclear	Polyclonal	1:100	LifeSpan BioSciences (Seattle, WA)
FolR1	Membranous	Polyclonal	1:100	Abcam (Cambridge, MA)
MSLN	Cytoplasmic	Polyclonal	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Claudin 3	Membranous	Polyclonal	1:100	Thermo Scientific (Waltham, MA)
Claudin 4	Membranous	Polyclonal	1:100	Thermo Scientific (Waltham, MA)
NRF2	Cytoplasmic	EP1808Y	1:100	Abcam (Cambridge, MA)

formula,  $H_s = 1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate staining}) + 3 \times (\% \text{ strong staining})$ . Scoring was independently performed by 2 of the authors (M. S. and O. M.). Interobserver agreement between these 2 authors was assessed by Cohen  $\kappa$  concordance measure, considering all the intervals in  $H_s$  range (0-300) at each 10 units, and with Pearson linear correlation.

## 2.4. Sequencing

Cases in which there was discordance between the original pathologic diagnosis and biomarker prediction were subjected to mutation analysis (Ion Torrent, Life Technologies; Waltham, MA) for hotspot regions of 50 oncogenes and tumor suppressor genes, by the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel, from formalin-fixed, paraffin-embedded

tissue. The panel includes genes frequently mutated in EEC and SC, such as *PTEN*, *KRAS*, *FGFR2*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *FBXW7*, and *TP53*.

## 2.5. Statistical analysis

For the statistical analysis, first, fold change was calculated to report relative differences between low-grade EEC and SC, and significance was evaluated by a Mann-Whitney test. Second, for each significant protein, a threshold in the IHC value scale was determined to discriminate between both types, using the Gini index as criterion for the binary partitioning. Significance of each threshold was assessed by means of a logistic regression model. Third, we selected those significant proteins in the

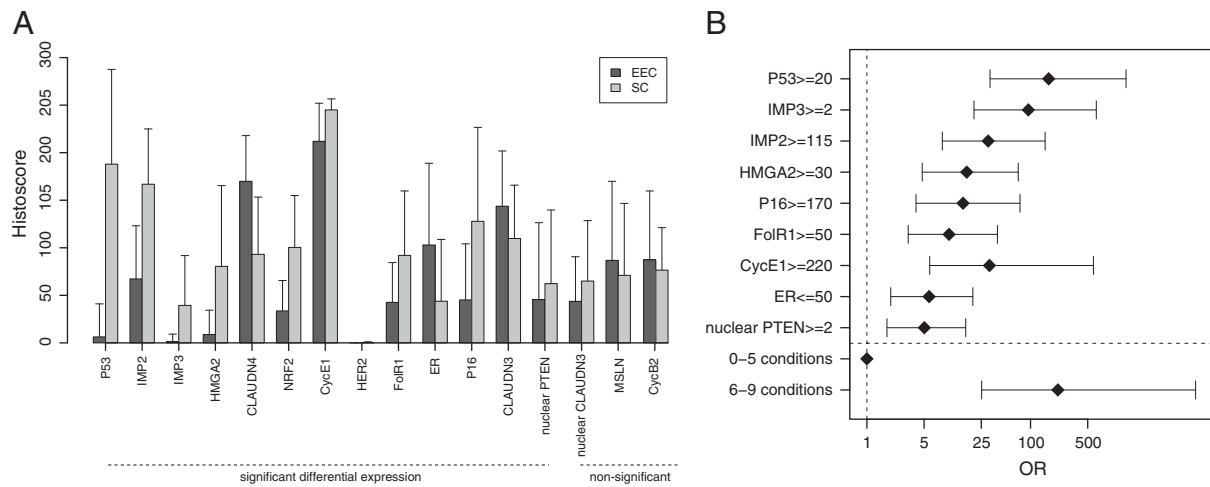
**Table 2** Differential immunoexpression analysis between EEC 1-2 and SC

Biomarkers	EEC grades 1-2					SC					Fold change		P
	n	Min	Max	Mean	SD	n	Min	Max	Mean	SD	EEC vs SC	SC vs EEC	
p53	52	0	250	6.3	34.74	23	0	290	187.93	99.67	0.03	29.84	<.00001 <sup>a</sup>
IMP2	50	0	210	67.25	55.86	23	2.5	250	166.85	58.15	0.4	2.48	<.00001 <sup>a</sup>
IMP3	50	0	55	1.35	7.84	21	0	180	39.4	52.39	0.03	29.19	<.00001 <sup>a</sup>
HMGA2	50	0	150	8.75	25.59	22	0	245	80.45	84.89	0.11	9.19	.00001 <sup>a</sup>
Claudin 4	51	30	270	169.9	48.05	21	10	230	93.1	60.2	1.83	0.55	.00001 <sup>a</sup>
NRF2	49	0	150	34.79	31.78	23	0	255	93.69	77.89	0.37	2.69	.002 <sup>a</sup>
Cyclin E1	50	110	300	212	40.01	22	210	250	245	11.55	0.87	1.16	.00006 <sup>a</sup>
HER2	50	0	0	0	0	23	0	3	0.35	0.74	0	–	.0002 <sup>a</sup>
FolR1	50	0	210	42.6	41.85	23	0	250	91.96	59.94	0.46	2.16	.0004 <sup>a</sup>
ER	52	0	275	102.93	85.92	23	0	260	43.8	64.96	2.35	0.43	.003 <sup>a</sup>
p16	52	0	215	45.19	58.94	23	0	250	127.83	98.79	0.35	2.83	.004 <sup>a</sup>
Claudin 3	50	0	300	143.7	58.08	22	0	210	109.77	56.05	1.31	0.76	.01 <sup>a</sup>
Nuclear PTEN	50	0	250	45.6	80.78	23	0	250	62.28	77.44	0.73	1.37	.03 <sup>a</sup>
Nuclear claudin 3	49	0	180	43.67	46.89	22	0	220	65	63.55	0.67	1.49	.13
MSLN	50	0	300	86.75	83.15	23	0	270	70.98	75.72	1.22	0.82	.51
Cyclin B2	50	0	275	87.4	72.36	23	20	155	76.52	44.68	1.14	0.88	.98

Abbreviations: EEC, endometrioid endometrial carcinoma; SC, serous carcinoma.

<sup>a</sup> Statistically significant.





**Fig. 1** A, Differential immunoprotein expression analysis between EEC and SC. For each biomarker, mean and SD are represented with a bar and segment, respectively. B, ORs for each biomarker and for the 9-biomarker signature. Segments represent 95% CIs. Horizontal axis is represented in a logarithmic scale.

models to define a signature based on the number of satisfied conditions, that is, thresholds obtained from the binary partitions. A convenient minimum number of conditions were established to predict the sample type, and sensitivity and specificity analysis was performed to assess prediction error. The usefulness of this classifier was checked in 1 TMA composed of EEC grade 3 (28 cases) and mixed EEC-SC (both components) (9 cases). An independent series of 88 cases (29 EEC grades 1-2, 28 EEC grade 3, and 31 SC) was used to externally validate the signature and to externally estimate sensitivity and specificity to detect a serous tumor. All analyses were obtained using R statistical software version 3.01 (R Foundation, Vienna, Austria), and statistical significance was set at .05.

### 3. Results

To globally assess the differential immunoprotein profile of EEC against SC, 52 EEC 1-2, and 23 SC cases were included. Some missing values arose due to technical problems (no representative tumor sample left in the cylinders, cylinders detached or missed in the construction of the array). Interobserver Cohen weighted  $\kappa$  was 0.9 (95% confidence interval [CI], 0.88-0.91), and Pearson correlation was 0.91, with  $R^2 = 81.52\%$  (95% CI, 79.37%-83.48%), showing a good agreement between both observers.

The differential immunoprotein analysis led to the identification of 13 significant biomarkers (Table 2 and Fig. 1A) that emerged as individually associated with histologic type. The logistic regression models identified a set of 9 biomarkers with an optimal joint predictive value, each having a conditional threshold in IHC value for predicting SC against EEC 1-2 ( $p53 \geq 20$ ,  $IMP2 \geq 115$ ,  $IMP3 \geq 2$ , cyclin E1  $\geq 220$ ,  $HMGA2 \geq 30$ ,  $FolR1 \geq 50$ ,  $p16 \geq 170$ , nuclear PTEN  $\geq 2$  and estrogen receptor (ER)  $\leq 50$ ). The odds ratio (OR) to predict SC was larger than 5 for all of them and reached a high statistical significance ( $P < .005$ ; Table 3 and Fig. 1B). All 9 conditions were then combined, and for each case, the number of satisfied conditions was computed (the series was reduced to 48 EEC 1-2 and 21 SC cases, all of them with valid  $H$  values for all 9 biomarkers).

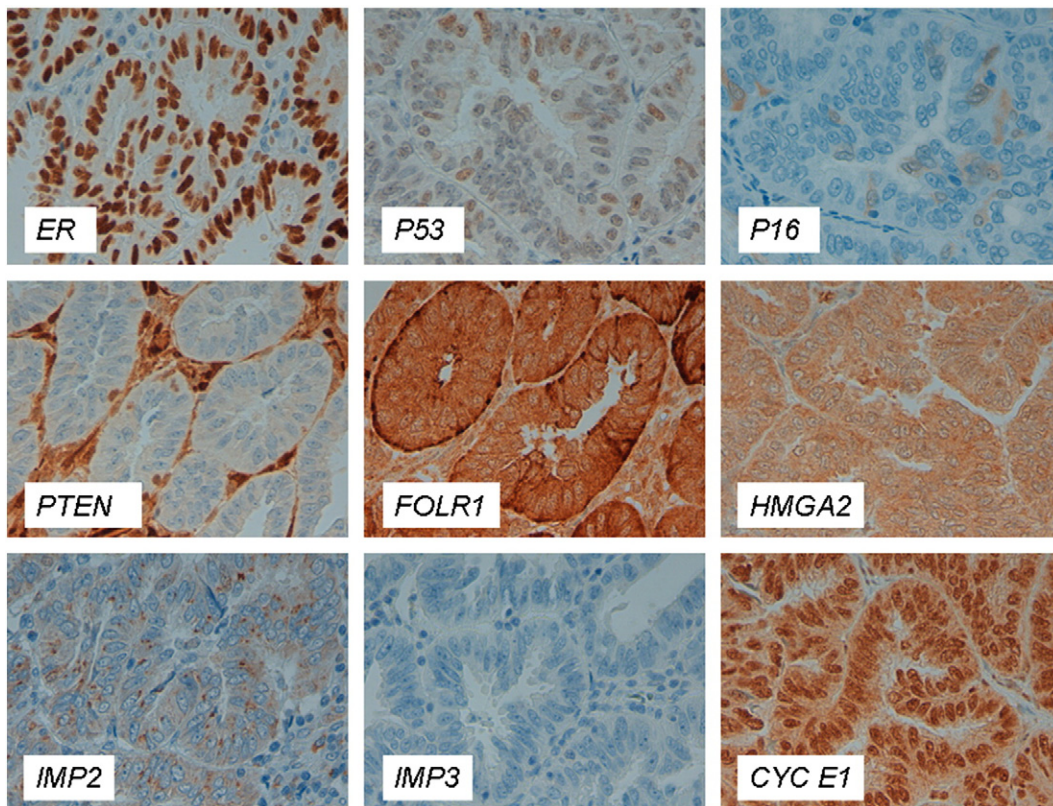
We considered those cases satisfying 0 to 5 conditions (predicted as EEC; Fig. 2) with respect to those satisfying 6 to 9 conditions (predicted as SC; Fig. 3), estimating for these cases a 216-fold increased risk of SC against EEC (OR, 216;  $P < .00001$ ; Table 3 and Fig. 1B). This discriminating rule correctly predicted all EEC 1-2 cases and 18 SC cases, but 3 SC cases were wrongly predicted as EEC (Fig. 4A). Sensitivity to detect SC was 86% (95% CI, 64%-97%), and specificity was 100% (95% CI, 89%-100%). In addition, this

**Table 3** Conditional thresholds in the  $H_s$  range of values for predicting SC vs EEC 1-2

	OR	95% CI	<i>P</i>
Individual biomarkers			
$p53 \geq 20$	166.67	31.97-1470.05	<.00001
$IMP3 \geq 2$	94.00	20.36-636.22	<.00001
$IMP2 \geq 115$	30.37	8.35-150.66	<.00001
$HMGA2 \geq 30$	16.61	4.74-70.77	.00003
$p16 \geq 170$	14.97	3.98-74.36	.0002
$FolR1 \geq 50$	10.09	3.19-39.38	.0002
Cyclin E1 $\geq 220$	31.50	5.85-587.22	.001
$ER \leq 50$	5.76	1.95-19.72	.003
Nuclear PTEN $\geq 2$	5.04	1.75-16.13	.003
9-Biomarker signature			
0-5 conditions	1		
6-9 conditions	216	25.24-10414	<.00001

NOTE. Combination of all biomarkers in a 9-protein signature, considering more than 5 conditions satisfied to predict SC vs EEC 1-2. OR, 95% CI, and *P* obtained from a logistic regression model for each biomarker and signature.

Abbreviations: SC, serous carcinoma; EEC, endometrioid endometrial carcinoma; OR, odds ratio; CI, confidence interval.



**Fig. 2** Representative pictures of the 9-biomarker signature in a case of EEC grade 2 predicted as EEC ( $\times 600$ ).

prediction rule correctly predicted all 28 EEC grade 3 cases as EEC (Fig. 4B) but identified correctly the EEC and SC components in only 4 of 9 mixed EEC-SCs (Table 4).

The evaluation of this 9-protein biomarker signature in an independent series correctly identified as EEC 24 of 29 EEC 1-2 cases and as SC all 31 SC cases, leading to an externally validated sensitivity to detect SC of 100% (95% CI, 84%-100%) and specificity of 83% (95% CI, 64%-94%; Fig. 4C). Regarding EEC grade 3 cases, 24 of 28 were correctly predicted as EEC (Fig. 4D).

All cases in which prediction did not correspond to the pathologic diagnosis were evaluated to rule out histologic misdiagnosis. Regarding p53, a total of 9 SC from the 2 series had negative staining, which corresponds to the “nothing” p53 staining from literature.

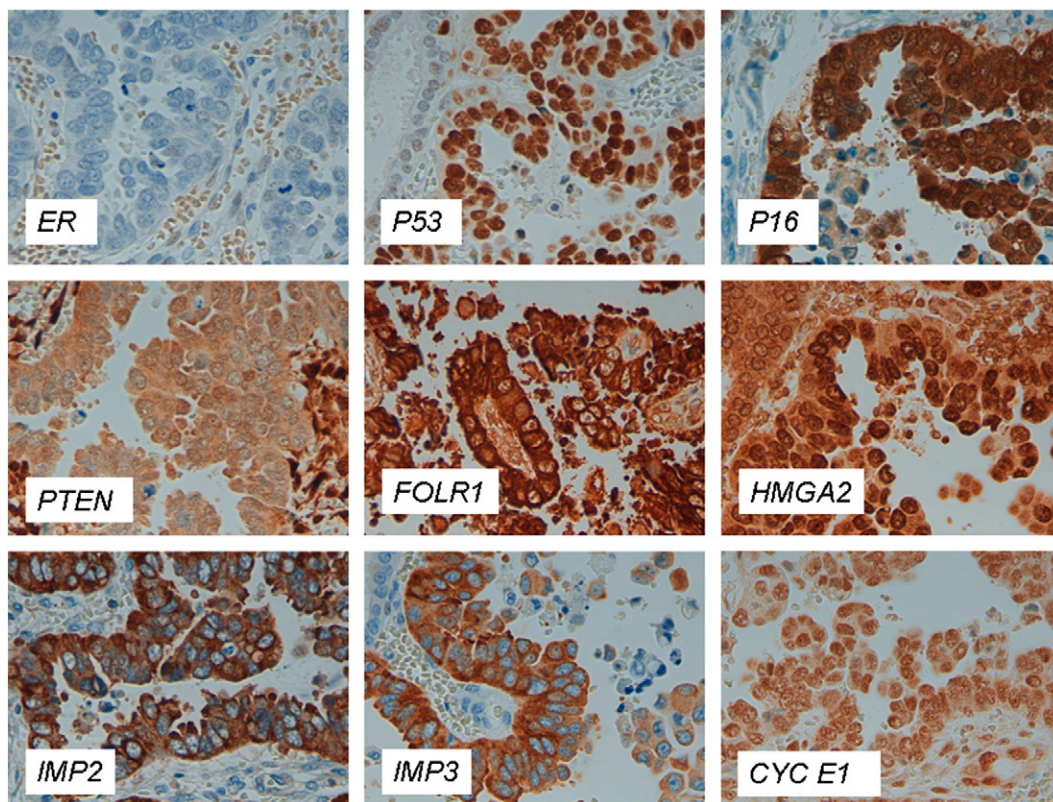
The 12 cases (3 from the original series and 9 from the validation series) with discrepancies between the original diagnosis and the biomarker prediction were subjected to mutation analysis by last-generation sequencing to rule out the possibility that these discordant cases were in fact ambiguous tumors with discordant genetic/microscopic features. Molecular diagnosis was based on the presence or absence of the typical mutations of EEC and SC (*PTEN*, *CTNNB1*, *KRAS*, *FGFR2*, *TP53*). Table 5 shows a summary of the results. In 3 cases (nos. 1, 2, and 6), mutation analysis was not specific for either EEC or SC. One case (no. 12) was microscopically EEC 3 but showed only *TP53* mutation in the absence of any

mutation typical of EEC; this case was interpreted molecularly as SC and, in fact, was predicted as SC by the biomarker signature. However, mutation analysis confirmed the pathologic diagnosis in the remaining 8 cases. All but one (no. 3) were pathologically diagnosed as EEC but predicted as SC. Each of them showed typical mutations of EEC (*PTEN*, *KRAS*, *FGFR2*), and only one of them showed *TP53* mutations. The case that showed *TP53* mutation (no. 9) also had 2 different *PTEN* mutations. Finally, case 3 was microscopically diagnosed as SC but predicted as EEC, and mutation analysis (*TP53* mutation) confirmed the pathologic diagnosis.

Finally, we analyzed the data by forcing to obtain the best 5-biomarker signature, that is,  $p53 \geq 20$ ,  $IMP2 \geq 115$ ,  $IMP3 \geq 2$ ,  $HMGA2 \geq 30$  and  $p16 \geq 170$ , in an attempt to reduce the number of biomarkers. This induced analysis provided a significant and unacceptable decrease in the internal sensitivity and specificity to 82% and 85% and in the external sensitivity and specificity down to 87% and 75%, respectively, which supports the use of the 9 suggested biomarkers.

#### 4. Discussion

Histologic type has consistently been demonstrated as an important biologic predictor in EC [1,2]. Even more, assessment of histologic type determines the extent of the



**Fig. 3** Representative pictures of the 9-biomarker signature in a case of SC predicted as SC ( $\times 600$ ).

initial surgical procedure and subsequent use of adjuvant therapy. Although there is moderate to excellent (0.62-0.87) reproducibility in histologic typing, interobserver agreement is worse in high-grade tumors.

EEC 1-2 is usually composed of cells arranged in a glandular pattern of growth, whereas EEC 3 has a predominantly solid arrangement, and SC has a complex architectural pattern with papillae and cellular budding. However, SC with a prominent glandular pattern is frequently mistaken as EEC 1-2, and on the other hand, EEC with papillary pattern is sometimes interpreted as SC [3,4]. There is some controversy regarding whether EEC 3 should be considered a type I or a type II tumor, based on epidemiology and prognosis [8,9]. This is probably influenced by the fact that some tumors classified as EEC 3 are those neoplasms that may exhibit more overlap with SC [10].

When an EC has an admixture of EEC and NEEC, with the minor component representing at least 10% of the neoplasm, the tumor should be classified as a mixed carcinoma. Several series of cases have been reported indicating that patients with mixed carcinoma show worse prognosis in comparison with pure EEC [11], which emphasizes the importance of identifying the minor SC component in a predominant EEC.

The molecular alterations involved in the development of EEC are different from those of SC [12]. EEC shows microsatellite instability, as well as mutations in *PTEN*, *KRAS*, and *CTNNB1*, whereas SC exhibits alterations of

*TP53*, chromosomal instability, and other molecular alterations (*STK15*, *CDKN2A* [p16], *CHD1* [E-cadherin], and *C-erbB2*). cDNA array studies have demonstrated that the expression profiling of EEC is different from that of NEEC [13,14].

Several IHC markers have been shown to be differentially expressed in EEC, including EEC 3, as opposed to SC. Several of them were previously found to be differentially expressed by cDNA analysis. For example, several studies have shown decreased expression of ER in SC [15], and also a lower frequency of PTEN alterations in SC in comparison with EEC [16]. Additional proteins that are differentially expressed in EEC and SC and that were used in this study are HER2 [17], Claudin 3 and 4 [18], Nrf2 [19], p53 [20,21], p16 [22], FOLR-1 [23], HMGA-2 [24,25], cyclin E [26], IMP2 [27], and IMP3 [28].

Some of the markers that were chosen in this study (HER2, p53, p16, cyclin E, PTEN) are used in tumor pathology in different settings. Some other markers are less frequently used. Claudins are a family of membrane proteins that play a major role in tight junction formation. Nrf2 is a transcription factor that functions as the key controller of the redox homeostatic gene regulatory network. FOLR-1 is a membrane-bound receptor involved in the transport of folate and other regulatory cellular processes. HMGA-2 is a nonhistone DNA binding factor that interacts with AT-rich sequences in the minor groove of the DNA helix. IMP2 and IMP3 are members of the human IGFII messenger RNA-binding protein family,



**Table 4** Immunohistochemical results obtained in the 9 mixed EEC-SC cases

Case	Endometrioid component		Serous component	
	Predicted as EEC	Predicted as SC	Predicted as EEC	Predicted as SC
1	X		X	
2		X		X
3	X			X
4	X			X
5	X			X
6	X		X	
7	X			X
8		X	X	
9	X		X	

Abbreviations: EEC, endometrioid endometrial carcinoma; SC, serous carcinoma.

because of the use of different antibodies and protocols, as well as the influence of preanalytical variables. Our group has recently proposed an optimal protocol for PTEN IHC [16], which has been used in this study.

Several authors have attempted the use of panels of antibodies to help in diagnosis and prognosis. Alkushi et al [29] examined the IHC expression profile of 12 markers in 200 EC (including 156 EEC and 13 SC) using TMA. The cluster group designation was performed based on 8 markers (p53, ER, Bcl-2, HER2, p27, E2F1, PTEN, and p21), and correlated with tumor grade, stage, and cell type. Inter-laboratory reproducibility was verified. Reid-Nicholson et al [30] examined 126 EC cases (including 42 EEC 1-2, 40 EEC 3, and 24 SC cases) by using an IHC profile of 5 markers. Substantial immunophenotypic diversity was observed. Only 70% of EEC 1-2 and 26% of EEC 3 cases exhibited the typical phenotype of EEC (p16<sup>-</sup>, ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, mCEA<sup>-</sup>, vimentin<sup>+</sup>). Alkushi et al [31] also assessed the usefulness of

a panel of 6 antibodies in a series of 180 EC cases. A subgroup of 58 high-grade EC cases (34 EEC 3, and 15 SC) was also studied. They found that p16, PTEN, and IMP3 were statistically significantly more frequently expressed in SC in comparison with EEC 3, whereas ER and p53 approached but did not reach significance. A combination of p16 and PTEN predicted EEC 3 versus SC, with a sensitivity of 90.0% and specificity of 96.8%. Han and coworkers [32] assessed the interobserver agreement on histologic type in high-grade EC by morphology, but also by using IHC marker combinations with 6 routine and 6 experimental markers. Consensus about histologic type based on morphology reached 72% but increased to 100% when IHC markers were used. A 3-marker panel composed of p53, ER, and p16 was recommended. Wei et al [33] reviewed 358 biopsies of EC and assessed the usefulness of IHC in 41 cases with differing interpretation regarding EEC and NEEC between the referring pathologist and second reviewer. Of the 41 cases, 10 were classified as EEC and 18 as SC, and diagnosis remained indeterminate in 5 cases. In a different study by Darvishian et al [10], the combination of lack of p53 protein expression, positive PR expression, and loss of PTEN expression best distinguished between EEC and SC. Recently, McConechy et al [34] performed target-enrichment sequencing on 393 EC (*ARID1A*, *PPP2R1A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, *CTNNB1*, *TP53*, *BRAF*, and *PPP2R5C*) and suggested that the 9-gene panel may be useful as an adjunct to morphologic classification of EC.

In this study, we have used IHC for several proteins, previously shown to be differentially expressed in EEC and SC by cDNA and protein analysis, in a series of EEC 1-2 (n = 51), EEC 3 (n = 28), and SC (n = 23). We first checked statistically significant differences between EEC 1-2 and SC, and then selected those significant proteins in the models to define a signature based on the number of satisfied conditions, that is, thresholds in the *H* scale. As a result, we identified 9 conditions that allowed prediction of

**Table 5** Summary of the results obtained from the 12 discrepant cases from the original and validation series

Case	Pathologic diagnosis	Signature prediction	Mutation analysis	Molecular diagnosis	Series
1	SC	EEC	<i>EGFR</i> G724S	?	Original
2	SC	EEC	Noninformative	?	Original
3	SC	EEC	<i>TP53</i> T102I	SC	Original
4	EEC 1-2	SC	<i>KRAS</i> G13D	EEC	Validation
5	EEC 1-2	SC	<i>PTEN</i> R233	EEC	Validation
6	EEC 1-2	SC	<i>EGFR</i> R297C; <i>FGFR3</i> A261T; <i>NOTCH1</i> P2448L	?	Validation
7	EEC 1-2	SC	<i>FGFR2</i> C385Y; <i>PIK3CA</i> E545K; <i>PTEN</i> Y68C, R173H, R233	EEC	Validation
8	EEC 1-2	SC	<i>NRAS</i> Q61L	EEC	Validation
9	EEC 3	SC	<i>APC</i> E1494; <i>FBXW7</i> R505H; <i>RB1</i> R556; <i>PTEN</i> E299, K6T; <i>PIK3CA</i> R88Q, E81K; <i>TP53</i> R213, S241Y	EEC	Validation
10	EEC 3	SC	<i>PIK3CA</i> R88Q; <i>FBXW7</i> R505C	EEC	Validation
11	EEC 3	SC	<i>PTEN</i> R130Q; <i>ERBB4</i> S341L	EEC	Validation
12	EEC 3	SC	<i>TP53</i> C135F	SC	Validation

NOTE. Molecular diagnosis is based on the presence or absence of the typical mutations of EEC and SC (*PTEN*, *CTNNB1*, *KRAS*, *FGFR2*, *TP53*). Abbreviations: EEC, endometrioid endometrial carcinoma; SC, serous carcinoma.

SC (IMP3  $\geq$  2, IMP2  $\geq$  115, p53  $\geq$  20, HMGA2  $\geq$  30, FolR1  $\geq$  50, p16  $\geq$  170, cyclin E1  $\geq$  220, nuclear PTEN  $\geq$  2, and ER  $\leq$  50). The performance of this signature was remarkably solid, with good interobserver agreement. It predicted correctly all 52 EEC 1-2 and 18 SC cases, while 3 SC cases were erroneously predicted as EEC. The sections corresponding to these 3 cases were reviewed retrospectively, and all of them showed typical pathologic and immunohistochemical features of SC. Sensitivity and specificity for diagnosing SC were 85.71% (63%-96%) and 100% (89%-100%), respectively. Afterward, we checked the usefulness of the panel in 28 EEC 3 cases, and the signature correctly predicted all of them as EEC.

Interestingly, this diagnostic signature was able to predict pathologic diagnosis of the different components in mixed EEC-SC in a few cases (4 of 9 cases), suggesting that mixed EEC-SCs are really ambiguous tumors. The results fit with previous results of the group (manuscript in preparation) showing that the 2 components of mixed tumors also show overlap in molecular alterations. In other words, results suggest that the EEC and SC components of mixed tumors show mixed molecular and immunohistochemical features, regardless of the morphologic appearance of each of them.

To confirm the reliability of this approach, we have used a validation series composed of 88 EC, diagnosed by a different team of pathologists. Once again, the diagnostic signature was able to predict EEC in 24 of 29 EEC 1-2 cases and 24 of 28 EEC 3 cases, whereas all 31 SC cases were correctly predicted as SC. Sensitivity and specificity to detect SC in this validation series were 100% (95% CI, 83%-100%) and 83% (95% CI, 64%-94%), respectively. Again, the sections corresponding to the tumors that were wrongly classified by this IHC approach were reviewed, and the initial pathologic type was confirmed.

Overall, the signature was able to predict the correct histologic type in 173 cases from a total of 185 tumors (from the initial and the validation series), after having excluded the 9 mixed tumors. Prediction was wrong in only 12 of these 185 tumors. Mutation analysis by last-generation sequencing was applied to the 12 discrepant cases (3 from the original series and 9 from the validation series) to rule out the possibility that they were ambiguous tumors with discordant genetic/microscopic features. Molecular diagnosis confirmed the pathologic diagnosis in all but one of the tumors that were informative. However, one case (no. 12) was microscopically EEC 3 but showed only *TP53* mutation in the absence of any mutation typical of EEC; this case was reinterpreted molecularly as SC and, in fact, was predicted as SC by the biomarker signature. We may suggest that in this case, our predictive rule was superior to microscopic features in identifying the tumor as SC.

In summary, we have shown that a 9-protein biomarker IHC signature may be helpful in accurate prediction of histologic type in EC. The 9-protein biomarker approach can be useful in the subgroup of tumors in which histologic typing is more difficult such as high-grade EC or high-stage, low-grade EC with significant nuclear atypia.

## Acknowledgments

X.M., J.R., and X.D. designed the research study. M.S. and O.M. performed and interpreted immunohistochemical techniques. J.V. performed statistical analysis. S.G., A.I.A., M.A.L., J.P., and C.B. provided materials from patients and reviewed the pathologic data. A.M. and G.M. performed last-generation sequencing. M.S., J.V., and X.M. wrote the manuscript.

Tumor samples were obtained with the support of Xarxa Catalana de Bancs de Tumors, and Plataforma de Biobancos ISCIII (PT13/0010/0014). We thank Lidia Parra for technical support.

## References

- [1] Matias-Guiu X, Davidson B. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2014;464:315-31.
- [2] Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol* 2012;13:353-61.
- [3] Bartosch C, Manuel Lopes J, Oliva E. Endometrial carcinomas: a review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. *Adv Anat Pathol* 2011;18:415-37.
- [4] Garg K, Soslow RA. Strategies for distinguishing low-grade endometrioid and serous carcinomas of endometrium. *Adv Anat Pathol* 2012;19:1-10.
- [5] Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2013;37:874-81.
- [6] Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Cancer Genome Atlas Research Network integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67-73.
- [7] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs. WHO Classification of Tumours, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2014.
- [8] Voss MA, Ganesan R, Ludeman L, et al. Should grade 3 endometrioid endometrial carcinoma be considered a type 2 cancer—a clinical and pathological evaluation. *Gynecol Oncol* 2012;124:15-20.
- [9] Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E. Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? *Am J Surg Pathol* 2012;36:753-61.
- [10] Darvishian F, Hummer AJ, Thaler HT, et al. Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1568-78.
- [11] Qaddus MR, Sung CJ, Zhang C, Lawrence WD. Minor serous and clear cell components adversely affect prognosis in “mixed-type” endometrial carcinomas: a clinicopathologic study of 36 stage-I cases. *Reprod Sci* 2010;17:673-8.
- [12] Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* 2013;32:403-13.
- [13] Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697-702.
- [14] Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, et al. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003;63:6-11.
- [15] Wik E, Raeder MB, Krakstad C, et al. Lack of estrogen receptor-alpha is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:1094-105.

- [16] Maiques O, Santacana M, Valls J, et al. Optimal protocol for PTEN immunostaining: role of analytical and pre-analytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast and prostatic tissues. *HUM PATHOL* 2013;45:522-32.
- [17] Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2376-85.
- [18] Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109:263-9.
- [19] Chen N, Yi X, Abushahin N, et al. Nrf2 expression in endometrial serous carcinomas and its precancers. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;4:85-96.
- [20] Alkushi A, Lim P, Coldman A, Huntsman D, Miller D, Gilks CB. Interpretation of p53 immunoreactivity in endometrial carcinoma: establishing a clinically relevant cut-off level. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:129-37.
- [21] McCluggage WG, Soslow RA, Gilks CB. Patterns of p53 immunoreactivity in endometrial carcinomas: 'all or nothing' staining is of importance. *Histopathology* 2011;59:786-8.
- [22] Yemelyanova A, Ji H, Shih I, Wang TL, Wu LS, Ronnett BM. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1504-14.
- [23] Dainty LA, Risinger JI, Morrison C, et al. Overexpression of folate binding protein and mesothelin are associated with uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;105:563-70.
- [24] McCluggage WG, Connolly LE, McBride HA, Kallinger S, Gilks CB. HMGA2 is commonly expressed in uterine serous carcinomas and is a useful adjunct to diagnosis. *Histopathology* 2012;60:547-53.
- [25] Romero-Pérez L, Castilla MÁ, López-García MÁ, et al. Molecular events in endometrial carcinosarcomas and the role of high mobility group AT-hook 2 in endometrial carcinogenesis. *HUM PATHOL* 2013;44:244-54.
- [26] Cassia R, Moreno-Bueno G, Rodríguez-Perales S, Hardisson D, Cigudosa JC, Palacios J. Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2013;201:589-95.
- [27] Zhang L, Liu Y, Hao S, Woda BA, Lu D. IMP2 expression distinguishes endometrioid from serous endometrial adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:868-72.
- [28] Zheng W, Yi X, Fadare O, et al. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2008;32:304-15.
- [29] Alkushi A, Clarke BA, Akbari M, et al. Identification of prognostically relevant and reproducible subsets of endometrial adenocarcinoma based on clustering analysis of immunostaining data. *Mod Pathol* 2007;20:1156-65.
- [30] Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Soslow RA. Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod Pathol* 2006;19:1091-100.
- [31] Alkushi A, Kobel M, Kallinger SE, Gilks CB. High-grade endometrial carcinoma: serous and grade 3 endometrioid carcinomas have different immunophenotypes and outcomes. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:343-50.
- [32] Han G, Sidhu D, Duggan MA, et al. Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2013;26:1594-604.
- [33] Wei JJ, Paintal A, Keh P. Histologic and immunohistochemical analyses of endometrial carcinomas: experiences from endometrial biopsies in 358 consultation cases. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1574-83.
- [34] McConechy MK, Ding J, Cheang MC, et al. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol* 2012;228:20-30.

**Discussió**

---





## 4 DISCUSSIÓ

### 4.1 Diverses proteïnes estan implicades en la resistència a la radiació en el càncer d'endometri

En la primera part d'aquest treball de tesi doctoral ens hem centrat en l'estudi de gens relacionats amb la resistència a la radioteràpia i la hipòxia.

Els raigs X, que van ser descoberts per Wilhelm Conrad Röntgen el 1895, van obrir les portes a les teràpies per radiació per al tractament del càncer. Gràcies a la col·laboració entre científics bàsics i clínics aquestes han millorat amb el pas dels anys. Malauradament, sovint el tractament fracassa, les cèl·lules tumorals sobreviuen i apareix la malaltia recurrent i les metàstasis.

La teràpia per radiació ha demostrat ser eficaç en determinats supòsits. Varis estudis clínics han demostrat que millora el control local regional del EC amb estadis primaris i que redueix el risc de recidiva pèlvica local [174]. A més, alguns estudis suggereixen que la radiació s'associa a una millora de la supervivència en pacients amb estadis inicials de EC [175]. La radiació també és una bona opció per les dones que presenten recidiva vaginal després de la cirurgia i com a conseqüència, el pronòstic millora [176, 177]. Alguns pacients amb recurrències pèlviques també poden ser candidates a rebre radioteràpia. Tot i això, degut a la controvèrsia que existeix pel que fa a les indicacions òptimes de la teràpia de radiació del EC, els investigadors intenten identificar el subgrup de pacients que té més possibilitats de beneficiar-se del tractament.

La teràpia de radiació pèlvica, tant la braquiteràpia de la cavitat vaginal sola o combinada, s'ha utilitzat durant anys com a teràpia adjuvant en dones amb característiques concretes, com són: dones no estadiades, amb tumors de risc intermedi-alt i també en pacients estadiades amb metàstasi als ganglis limfàtics i en pacients estadiades amb ganglis limfàtics negatius però amb altres factors de risc.

Malauradament, després de la radiació un 20 % dels càncers d'endometri recidiven. Els mecanismes que confereixen resistència a la radiació ionitzant es desconeixen. El fet de conèixer les vies moleculars alterades permetria tractar les pacients mitjançant tractaments o combinació de tractaments més adients.



sèrie de tumors primaris. Hem donat importància a les proteïnes relacionades amb la diferenciació cel·lular (ER i PR), proliferació cel·lular (Ki67), resistència a l'apoptosi (FLIP i NF- $\kappa$ B) i hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ) i gens implicats en el desenvolupament o progressió del EC (gens que codifiquen per  $\beta$ -catenina, p53, E-cadherina, MLH1, MSH2). S'han construït 2 TMA, el primer conté mostres parafinades de 24 recidives post radioteràpia i en el segon s'han inclòs 82 EEC primaris no recidivats. Es va realitzar la tinció immunohistoquímica pel receptor d'estrògens (ER), el receptor de progesterona (PR), p53, E-cadherina, Ki67,  $\beta$ -catenina, MLH-1, MSH-2, NF- $\kappa$ B, i HIF-1 $\alpha$ . Hem observat que les recidives post radioteràpia presenten un grau histològic més elevat i un índex de proliferació (Ki67) augmentat ( $p=0.0012$ ). Les cèl·lules tumorals resistents a la radioteràpia compten amb estratègies similars a les de les cèl·lules normals per reparar el dany al DNA i aplicar mecanismes de reparació, evitant així les diferents formes de mort induïdes per la RT. S'ha valorat el paper dels gens involucrats en la reparació del DNA, com MLH1 o MSH2, suggerint que es pot produir inactivació "de novo" de MLH-1 durant la radiació; defectes en el sistema de reparació del DNA s'han associat a un risc més elevat de recaiguda. En un estudi [180], la metilació del promotor de MLH-1 i la baixa expressió de MLH-1/MSH-2 no van ser predictius de recidiva en EC estadi I però la metilació *de-novo* del promotor de MLH-1 es va detectar de manera ocasional durant la progressió de la malaltia en pacients al llarg del tractament amb radioteràpia. Nosaltres no hem trobat una relació pel que fa a l'expressió dels gens reparadors entre els tumors primaris i les recidives de EC.

També hem observat expressió disminuïda del PR en les recidives en comparació amb els EC primaris, tot i que les diferències no són estadísticament significatives. Sembla que l'expressió de progesterona i polimorfismes en el gen que codifica pel seu receptor juguen un paper important. S'ha vist que la baixa expressió de PR sembla estar associada a malaltia recurrent en pacients amb EEC en estadis inicials [181] i l'expressió de PR en pacients portadors d'un polimorfisme (PROGINS al·lel) era predictiu de recidiva en un estudi de Pijnenborg JM i col·laboradors [182]. També s'ha identificat un mecanisme d'inhibició de NF- $\kappa$ B per part de la progesterona a través del seu receptor en cèl·lules poc diferenciades de EC [183]. Finalment s'ha descrit un efecte inhibidor de la via Wnt per part de la progesterona mitjançant l'activació de DKK1 i FOXO1. La progesterona ajudaria a mantenir l'homeòstasi endometrial i en el seu defecte contribuiria a l'aparició del tumor i progressió [184].

## Discussió

TP53 és un dels gens supressors tumorals més importants. Alteracions de p53 impliquen una pèrdua de la seva funció supressora i en última instància contribueixen a l'acumulació de mutacions i a l'expansió de níus neoplàsics. Les cèl·lules amb alteracions de p53 no poden mantenir l'arrest del cicle cel·lular en fase G1 i depenen dels punts de control en fase S/G2 per reparar el dany i promoure la supervivència [13].

Els nostres resultats indiquen que l'expressió de p53 és estadísticament més elevada en les recidives. En un estudi es van determinar les alteracions en aquest gen supressor de tumors en EC que presentaven/ no presentaven recidiva. La sobreexpressió de p53 va ser predictiva de recidiva i es correlacionava amb les mutacions del seu gen [185].

NF-κB engloba un conjunt de membres d'una família de factors de transcripció que regulen gens que codifiquen per citocines, receptors de citocines i molècules d'adhesió cel·lular [186]. La desregulació de NF-κB juga un paper destacat en la carcinogènesi mitjançant la translocació nuclear i conseqüent activació de la transcripció de gens implicats en l'apoptosi, el cicle cel·lular, la diferenciació i la migració cel·lular. El EC, tant EEC com NEEC, presenta translocació nuclear dels diferents membres de NF-κB (p50, 20%; p65, 16.5–21.9%; p52, 9.3%; c-Rel, 48.9%; RelB, 15.7%) [105]. Nosaltres hem vist de manera freqüent translocació nuclear dels membres de NF-κB (p50, c-Rel, RelB) en les recidives. Per altra banda, una proteïna responsable de la resistència a la via extrínseca de l'apoptosi (activada per FasL i TRAIL) és FLIP. FLIP comparteix un alt grau d'homologia amb caspasa-8 però li manca la capacitat proteolítica. Es troba freqüentment expressat en els EC (EEC i NEEC) i està regulat per CK2, una cinasa serina/treonina que també ha estat implicada en proliferació, diferenciació, creixement cel·lular i apoptosi i s'ha vist que està desregulada en alguns tumors [15, 101]. Els nivells alts de FLIP competeixen amb caspasa-8, fet que resulta en una inhibició de l'apoptosi. En un estudi previ del nostre grup hem demostrat que la inhibició de FLIP sensibilitzava les cèl·lules IK a l'apoptosi induïda per TRAIL [15]. En aquest estudi hem vist que les recidives expressen més FLIP al citoplasma que els tumors primaris de forma estadísticament significativa. A més també hem observat una expressió nuclear de FLIP en les recidives tot i que no va arribar a ser estadísticament significativa. Aquestes proteïnes (FLIP i els membres de la família de NF-κB) també s'han relacionat amb resistència a la quimioteràpia i la radiació en altres tumors, per exemple la inhibició *in vitro* de FLIP sensibilitza les cèl·lules Hela de cèrvix a la radioteràpia [187] i hi ha evidències que NF-κB i ATM modulen el desenvolupament de radioresistència en cèl·lules tumorals irradiades [188].

$\beta$ -catenina, codificada pel gen *CTNNB1*, és un component de la unitat cadherina-catenina el qual és molt important en la diferenciació cel·lular i en el manteniment de l'arquitectura tissular i també és important per a la transducció de senyals. En el EC, mutacions en l'exó 3 de *CTNNB1* donen lloc a una estabilització de la proteïna, una acumulació citoplasmàtica i nuclear i la participació en la transducció de senyals i l'activació transcripcional a través de la formació de complexos amb les proteïnes d'unió al DNA [189]. L'augment dels nivells citoplasmàtics i nuclears de  $\beta$ -catenina produeix l'activació transcripcional de varis gens (ciclina D1, c-Myc i altres) a través de la via LEF/TCP. APC *downregula* els nivells de  $\beta$ -catenina cooperant amb la GSK-3 $\beta$  induint fosforilació dels residus serina/treonina codificats en l'exó 3 del gen *CTNNB1*, i la degradació de  $\beta$ -catenina a través de la via ubiquitina/proteasoma. La mutació de l'exó 3 de *CTNNB1* amb acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina es dona en un 10-44% dels EC [46, 47, 189]. A la bibliografia hi ha resultats controvertits pel que fa al valor pronòstic de les mutacions de  $\beta$ -catenina en el EC, tot i que, generalment, s'havia associat a un bon pronòstic. No obstant, en un treball recent les mutacions de l'exó 3 de *CTNNB1* s'han associat a un grup agressiu de EEC de baix grau i estadis inicials [190]. Pel que fa a les proteïnes implicades en la via de senyalització Wnt, nosaltres hem vist un augment de la translocació nuclear de  $\beta$ -catenina i una disminució de E-cadherina en les recidives post radioteràpia en comparació amb els tumors primaris. En un estudi de Pijnenborg, J.M i col·laboradors es van avaluar tres components de la via Wnt ( $\beta$ -catenina, E-cadherina i APC) en EC estadi I respecte el desenvolupament o no de recidiva. L'absència d'expressió de E-cadherina va ser predictiva de metàstasis a distància però no de recidiva local i la localització nuclear de  $\beta$ -catenina no va ser predictiva de malaltia recurrent [191]. En la nostra sèrie, la localització nuclear de  $\beta$ -catenina l'hem vist en un 13% dels EC, i les mutacions de *CTNNB1* en un 20% dels casos. En canvi, la majoria de recidives (66.7%) mostraven translocació nuclear de  $\beta$ -catenina sense que estigués associada a mutacions de *CTNNB1*. Això pot ser degut a alteracions en altres membres de la via Wnt, com per exemple Wnt10b [192], el qual juga un paper important en el desenvolupament del EC a través de l'activació de  $\beta$ -catenina i c-Myc. Nosaltres hem demostrat per primera vegada que  $\beta$ -catenina es transloca al nucli i activa la via Wnt sota condicions d'hipòxia. Un estudi recent de Yoshida i col·laboradors [121] suggereix que associacions transcripcionals de HIF1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B i el complex  $\beta$ -catenina/p300 poden contribuir a la modulació dels canvis en la cinètica tumoral en el EC. Hi ha estudis experimentals previs que suggereixen un paper de la via Wnt

## Discussió

en la resistència a la radiació, com per exemple a les cèl·lules mamàries [193]. Finalment, un treball relaciona la translocació de  $\beta$ -catenina com a conseqüència de la localització nuclear de FLIP [194]. L'expressió nuclear de FLIP també s'ha detectat en altres tipus de càncers mitjançant immunohistoquímica i TMA's [195].

Per tant, dianes terapèutiques contra aquestes proteïnes poden ser útils com a teràpia adjuvant per augmentar l'eficàcia de la radiació en el EC.

## **4.2 La hipòxia juga un paper important en la resistència a la radioteràpia**

Per una banda la hipòxia afavoreix la mort cel·lular [196] però per l'altra, l'activació dels mecanismes de supervivència fa que les cèl·lules s'adaptin a les baixes concentracions d'oxigen.

A això li hem de sumar el fet que cada vegada hi ha més evidències de que la hipòxia juga un paper molt important en la resistència a la radioteràpia en el càncer, en tant que disminueix la radiosensibilitat de les cèl·lules tumorals i per aquest motiu esdevé un gran repte terapèutic.

La presència de l'oxigen molecular influencia l'efecte biològic de la teràpia per radiació, ja que sota condicions d'hipòxia les cèl·lules són resistents a la RT. Per un mateix nivell de supervivència es requereixen majors dosis de radioteràpia sota condicions d'hipòxia comparat amb condicions d'oxigen. De fet, les cèl·lules tumorals, quan se'ls permet créixer sota hipòxia fisiològica, tenen una capacitat reduïda per reparar lesions subletals.

Es creu que les cèl·lules mare tumorals (CSC, Cancer Stem Cells) resideixen preferentment en zones tumorals amb característiques microambientals concretes, una d'aquestes característiques és la baixa concentració d'oxigen.

L'estroma tumoral (cèl·lules endotelials, cèl·lules del sistema immunitari, fibroblasts normals i fibroblasts associats al tumor) per la seva banda, també influeix en la resposta a la RT [197] i existeix certa controvèrsia en quant a les dosis i al fraccionament d'aquesta per al tractament òptim del càncer.

Així doncs, cada vegada hi ha més evidències que l'adaptació a la hipòxia juga un paper en la resistència a la RT. En un treball [198] es va estudiar la densitat vascular i l'expressió de HIF-1 $\alpha$  i el seu gen diana, carbonic anhidrasa IX i van observar que la densitat

vascular era significativament més baixa i l'expressió de HIF-1 $\alpha$  era més elevada en les mostres de recidiva en comparació amb els EC primaris i aquesta correlacionava amb p53 en els EC primaris. Malgrat això, aquests tres paràmetres no eren diferents en pacients de EC amb o sense recidiva i per tant no eren marcadors pronòstics independents de EC recurrent.

Nosaltres hem vist que l'expressió de HIF-1 $\alpha$  és estadísticament més elevada en les recidives. Com era d'esperar, la translocació nuclear de HIF-1 $\alpha$  es fa evident quan les cèl·lules IK es sotmeten a condicions d'hipòxia. Prèviament s'ha descrit que HIF-1 $\alpha$  està implicat en respostes adaptatives a la hipòxia tumoral i a la resistència a la radiació en diferents tipus de tumors [199, 200]. No obstant, nosaltres no hem observat translocació nuclear de HIF-1 $\alpha$  després de sotmetre les cèl·lules IK a radiació.

En sotmetre les cèl·lules IK a condicions d'hipòxia hem observat un augment de FLIP citoplasmàtic i nuclear però quan les hem sotmès a radiació no hem observat diferències. Així semblaria que l'augment de FLIP en les recidives és probablement degut, en part, a una resposta adaptativa a la hipòxia però també pot estar associat al paper proposat de FLIP en la formació de tumor a distància [201]. També hem vist de manera freqüent translocació nuclear dels membres de NF- $\kappa$ B (p50, c-Rel, RelB) en les recidives. Quan les cèl·lules IK es sotmeten a condicions d'hipòxia s'observa un augment de l'activitat NF- $\kappa$ B mitjançant l'assaig luciferasa, en canvi, quan sotmetem les cèl·lules a radiació no s'observava augment significatiu en l'activitat NF- $\kappa$ B.

A més, la translocació nuclear de  $\beta$ -catenina també s'observa quan les cèl·lules IK es sotmeten a condicions d'hipòxia. Gairebé no observem nivells de  $\beta$ -catenina nuclear quan exposem les cèl·lules IK a radiació ionitzant. Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules de EC, sotmeses a hipòxia, mostren activació de la via Wnt, promovent l'acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina en absència de les mutacions de CTNNB1. Un estudi suggereix un paper per FLIP-L nuclear en la modulació de la via Wnt [194].

### **4.3 La resistència a la hipòxia implica activació de les dues vies de senyalització NF- $\kappa$ B (canònica i alternativa)**

Després d'observar que quan les cèl·lules IK es sotmetien a condicions d'hipòxia es produïa un augment de l'activitat NF- $\kappa$ B mitjançant l'assaig luciferasa i, en canvi, quan



## Discussió

sotmetíem les cèl·lules a radiació no s'observava augment en l'activitat NF- $\kappa$ B, vam decidir estudiar el comportament de NF- $\kappa$ B sota condicions d'hipòxia.

Com hem dit, sabem que la presència o absència de l'oxigen molecular influencia l'efecte biològic de la radiació ionitzant. Les cèl·lules són radioresistents sota condicions d'hipòxia. Alguns estudis han demostrat que la manca d'oxigen dificulta la formació dels trencaments de cadena de DNA mitjançant radiació ionitzant [202]. La radiació ionitzant induïx la ionització del DNA genòmic de les cèl·lules diana i genera radicals lliures que generen trencaments en la cadena de DNA. L'oxigen oxida els radicals i fa que el dany sigui permanent. Per altra banda, en absència d'oxigen els radicals es redueixen mitjançant components que contenen grups SH (SH groups, sulfhydryl groups) els quals reparen els danys.

A més, la hipòxia disminueix els nivells d'expressió de Ciclina D1 i induïx l'arrest cel·lular en fase G0-G1. Recentment s'ha vist que la disminució de Ciclina D1 pot ser atribuïda a HIF1 $\alpha$  mitjançant la interacció amb el seu promotor. Aquest arrest del cicle cel·lular podria explicar la resistència de les cèl·lules hipòxiques als agents quimioterapèutics que actuen en contra de la síntesi del DNA en la fase S. HIF-1 pot ser activat per vàries vies moleculars com la via PI3K-Akt-mTor [203, 204], la via Ras-ERK o la senyalització mitjançant HER-2 /neu [205].

El factor de transcripció NF- $\kappa$ B respon a varis senyals d'estrès metabòlic, entre ells, la hipòxia. Nosaltres veiem que només un petit percentatge de cèl·lules tumorals moren per apoptosi sota condicions d'hipòxia; per aquest motiu hem decidit estudiar la contribució de la via de supervivència NF- $\kappa$ B a la resistència a l'apoptosi sota condicions d'hipòxia. Els nostres resultats mostren que la hipòxia induïx l'acumulació nuclear de RelA/p65 i l'activació transcripcional de NF- $\kappa$ B. Un article recent atribueix a c-Src la capacitat d'activar NF- $\kappa$ B als residus tirosina [206], mentre que altres han demostrat que l'activació es dona sota control de IKK $\beta$ . Mitjançant la downregulació de IKK $\alpha$  o IKK $\beta$  amb partícules de lentivirus i els fibroblasts d'embrions de ratolí deficientes en IKK $\alpha$  o IKK $\beta$  hem demostrat que són necessàries les dues subunitats per l'activació de NF- $\kappa$ B sota condicions d'hipòxia. Tot i que les dues cinases tenen una estructura similar i comparteixen un 65% d'homologia en els seus dominis cinasa, s'ha vist que els fibroblasts *knockout* per IKK $\alpha$  presenten una activació normal de IKK i una translocació nuclear de RelA/p65 en resposta a estímuls pro inflamatoris com TNF- $\alpha$  i una disminució d'un 50% de l'activitat d'unió al DNA per part de NF- $\kappa$ B [207,

208]. Un treball recent de Walmsey i col·laboradors [209] mostra un augment de l'activitat NF- $\kappa$ B sota condicions d'hipòxia però la relació entre NF- $\kappa$ B i IKK $\alpha$  es desconeix.

Pel que fa a la via alternativa, sabem que IKK $\alpha$  hi té un paper destacat. Hem estudiat el processament de p52 sota condicions d'hipòxia. Demostrem que la hipòxia indueix l'acumulació de p100 i el consegüent processament a p52 en cèl·lules de EC i MEFs d'acord amb els resultats publicats per Mordmüller i col·laboradors [210] que descriu que només p100 processada de nou es capaç de generar p52 nuclear. A més a més, el processament de p100 està molt controlat i mediat per NIK, una cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK, NF- $\kappa$ B Inducing Kinase) que al mateix temps permet la unió de IKK $\alpha$  a p100 i actua com a cinasa activadora de IKK $\alpha$ . Al seu torn, IKK $\alpha$  activada fosforila p100 i promou la seva ubiquitinització i processament a p52. El processament de p100 a p52 s'activa per varis estímuls com la limfotoxina B [211] o el lligand de CD40 [212]. A més, publicacions recents han demostrat que tant Stat3 [213] com AKT activa [214] indueixen el processament de p100 a p52. A més s'ha vist que aquestes dues vies s'activen sota condicions d'hipòxia [215, 216]. Nosaltres hem demostrat que sota condicions d'hipòxia IKK $\alpha$  es responsable del processament de p100 a p52 i, d'acord amb la bibliografia, activant la via alternativa [217]. No obstant, els nostres resultats indiquen que tant IKK $\alpha$  com IKK $\beta$  son necessàries per a l'acumulació de p100. Per tant, tot això suggereix que l'activació de la via alternativa requereix una activació prèvia de NF- $\kappa$ B a través de la via canònica a través de IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ . Hi ha varis estudis que demostren la comunicació creuada entre les dues vies. Sun i col·laboradors [218] descriuen que la transactivació de p65 estimula l'expressió de l'mRNA de p100 i l'expressió de la proteïna augmentant així la quantitat de p100 disponible. Nosaltres proposem que l'activitat alternativa de NF- $\kappa$ B mediada per la hipòxia es basa en l'acumulació de p100 i això està controlat per IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ . També hem investigat el paper de p52 i p65 en promoure la supervivència cel·lular sota condicions d'hipòxia i tant el silenciament de RelA (p65) com p52 feia que augmentés la sensibilitat a la mort per apoptosi de les cèl·lules IK sotmeses a l'estrès hipòxic, fet que subratllava el paper de pro supervivència de les dues vies. També s'ha de dir que sota hipòxia, tant IKK $\alpha$  com IKK $\beta$  s'acumulen al nucli i, tot i que s'ha vist que l'acumulació nuclear de IKK $\alpha$  controla el procés de metàstasi en càncer de pròstata [219], es necessiten estudis addicionals per acabar de determinar quin paper hi juguen. Pel que fa a HIF1 $\alpha$  s'ha vist que contribueix a l'activació de NF- $\kappa$ B en neutròfils murins per tal d'inhibir l'apoptosi i permetre la supervivència en

## Discussió

condicions d'hipòxia [209]. Nosaltres hem volgut comprovar la seva contribució a l'activació de la via clàssica i l'alternativa. Tot i que l'acumulació nuclear de p65 i l'activitat de NF-κB disminuïa en silenciar HIF1α, la translocació nuclear de p52 es veia inalterada. El fet de silenciar HIF1α incrementava la mort cel·lular per apoptosi fet que confirma el seu paper a favor de la supervivència sota condicions d'hipòxia.

A més hem demostrat que p65 i p52 mostren augment significatiu de l'expressió en les recidives post radiació en comparació amb els tumors primaris. També hem demostrat que les cèl·lules de EEC presenten translocació nuclear d'aquestes dues proteïnes quan es sotmeten a condicions d'hipòxia, cosa que indica que la resistència a la hipòxia implica activació de les dues vies de senyalització NF-κB (canònica i alternativa).

Encara són necessaris molts treballs que determinin la contribució de NF-κB a la supervivència de les cèl·lules hipòxiques, però mitjançant la comprensió de les mateixes es podran obtenir guanys terapèutics importants. Per tal de regular NF-κB i sensibilitzar les cèl·lules a les teràpies convencionals existeixen varis inhibidors d'aquesta via. Els inhibidors del proteasoma en són un exemple. Bortezomib (Velcade; PS-341), el primer inhibidor del proteasoma que ha estat utilitzat en aplicacions clíniques, ha demostrat bona activitat antitumoral [220]. En combinació amb la radioteràpia s'han obtingut beneficis importants en alguns tipus de càncers [221]. En el càncer d'endometri però, els inhibidors del proteasoma indueixen mort cel·lular però enlloc de bloquejar NF-κB, augmenten la seva activitat transcripcional [161].

Tot i això, existeixen varies estratègies per superar la radioresistència de les cèl·lules tumorals hipòxiques mitjançant les quals en alguns casos s'han obtingut bons resultats en assaigs clínics. Per exemple, augmentar l'aportació d'oxigen, o l'ús dels radio sensibilitzadors (els quals mimetitzen els efectes de l'oxigen), les citotoxines hipòxiques, els inhibidors de HIF-1 o inhibidors de les vies que activen HIF-1, com la via PI3K-Akt-mTOR; també en són exemples les estratègies de teràpia gènica, la teràpia de radiació fraccionada i la teràpia de radiació modulada per la intensitat (IMRT, Intensity-modulated Radiation Therapy) (la qual permet controlar la distribució de les dosis de radiació al llarg de tota la formació tumoral). Degut al fet que la cromatina està més condensada durant la fase G2/M, alguns autors han suggerit que la radiosensibilitat es veu influenciada per l'estructura de la cromatina ja que, teòricament un fotó que viatja a través de la cromatina condensada travessa més DNA, la qual cosa augmenta la probabilitat de causar un trencament de doble cadena irreparable

[222]. Aquest fet també té implicacions importants pel que fa a l'ús dels inhibidors de les histones deacetilases, els quals poden augmentar la compactació de la cromatina. Varis estudis han demostrat la seva efectivitat com a radiosensibilitzadors [223]. Existeixen altres treballs on s'estudia la sensibilització de les cèl·lules tumorals a la teràpia per radiació. Zhang i col·laboradors van demostrar que miRNA-221-222 controlen la sensibilització a la radiació regulant la via PTEN/AKT i es podrien estudiar com a noves dianes terapèutiques [224]. MicroRNA-21 també es troba desregulat en una gran varietat de càncers i juga un paper en la carcinogènesi, la recidiva i la metàstasi; es creu que podria ser una diana potencial per a les teràpies de radiació [225].

#### **4.4 Annexina A2 és un marcador predictiu de malaltia recurrent en el càncer d'endometri**

Després d'estudiar el paper de les proteïnes implicades en el EC recurrent i la resistència a la radioteràpia i la hipòxia vam decidir estudiar els gens predictius de malaltia recurrent. Com hem dit anteriorment, en general, el EC s'associa a bon pronòstic quan els pacients es detecten en situació de baix risc; tot i això, es necessiten marcadors fiables que permetin identificar els pacients susceptibles de recidivar en un futur i candidats a rebre cirurgia radical i radioteràpia/ quimioteràpia.

En altres tipus de càncer s'han estudiat gens predictius de malaltia recurrent. Belt i col·laboradors [226] han vist que pacients amb càncer de colon estadi II que expressaven baixos nivells de Bcl-X i alts nivells de FasL i pacients amb estadi III amb baixos nivells de Fas, alts nivells de FasL i baixos nivells de Bcl-2 es podien considerar pacients amb un alt risc de presentar malaltia recurrent. Per altra banda, en un altre estudi, l'expressió immunohistoquímica de CKAP2 (Cytoskeleton-Associated protein 2) podia ser un marcador biològic potencial per identificar els pacients amb carcinoma hepatocel·lular amb risc de recidiva després de la cirurgia [227]. Pel que fa al EC existeixen pocs marcadors predictius de malaltia recurrent. En un treball de Gehrig i col·laboradors [228] la negativitat del ER va ser predictiva de malaltia recurrent en EC estadi I amb independència del grau tumoral. L1CAM, una proteïna transmembrana, s'ha descrit com a factor pronòstic en els EC tipus I, estadi I [229]. Un estudi recent de Wik E i col·laboradors afirma que la puntuació de recurrència de EC (ECARS, Endometrial Carcinoma Recurrence Score) definida en un treball

## Discussió

anterior [230] és vàlida per identificar malaltia agressiva i s'associa amb marcadors de transició epiteli-mesènquima i alteracions de PI3K [231]. I finalment, HIF-1 $\alpha$  s'ha associat amb malaltia recurrent i histologia no endometriode [118]. Per altra banda, la presència d'alts nivells en sèrum de CA 125, CA 19.9 i CEA (Carcino Embryonic Antigen) pot ser útil per predir la disseminació extrauterina abans del tractament o pel seguiment post tractament d'aquells pacients amb nivells inicials elevats. Alts nivells de CA 125 han resultat ser predictius de malaltia recurrent i mort en el EEC [232]. De fet, el marcador CA 125 és l'únic que s'ha utilitzat en la pràctica clínica i que permet determinar el risc de recidiva i tractar amb quimioteràpia de manera agressiva aquells tumors amb alt risc de recurrència. No obstant, la sensibilitat i l'especificitat són baixes (70% i 83%, respectivament), a més, en la majoria de casos, aquesta elevada expressió es dona en el mateix temps en què es diagnostica la recidiva i per tant el temps per realitzar canvis en el tractament resulta insuficient. Finalment, HE4 en sèrum s'ha descrit recentment com a biomarcador pronòstic en el EC i ha resultat ser millor factor predictiu d'invasió miometrial que CA125 [233].

Nosaltres hem estudiat l'expressió de gens predictius de malaltia recurrent en el càncer d'endometri. Per tal d'identificar-los es va realitzar una comparació proteòmica (2D-DIGE) entre lesions de carcinoma primari d'endometri i les corresponents biòpsies de recidiva i vam veure que varies proteïnes estaven altament sobreexpressades en les recidives en comparació amb els tumors primaris, entre elles, ANXA2. Està descrit que els canvis en l'expressió de les Annexines contribueixen en la progressió i el desenvolupament tumoral [234]. La sobreexpressió d'aquesta proteïna s'ha descrit en el EC estadi I en comparació amb l'endometri normal i correlaciona amb marcadors de transició epiteli-mesènquima. Es va comparar mitjançant immunohistoquímica l'expressió d'ANXA2 entre els tumors primaris i les recidives i es va comprovar que aquestes tenien uns valors més elevats d'ANXA2 amb diferències estadísticament significatives. Per tal de determinar la implicació d'ANXA2 en el procés d'invasió i metàstasi en primer lloc vam estudiar si ANXA2 proporcionava capacitat a les cèl·lules de EC per evadir l'efecte de la radiació i de la quimioteràpia i conseqüentment recidivar. Els resultats no obstant, van mostrar que ANXA2 no conferia avantatge a aquestes cèl·lules i que no interferia en la sensibilitat a la quimio/radioteràpia. A continuació vam estudiar si ANXA2 estava directament implicada en l'adquisició de capacitat d'invasió i metàstasi. La *down*-regulació d'ANXA2 feia que les cèl·lules adquirissin un fenotip més epitelial i perdessin el fenotip mesenquimal. A més,

disminuïa la capacitat de les cèl·lules IK de migrar cosa que suggeria un paper de l'ANXA2 en l'adquisició d'un fenotip agressiu durant els primers passos del procés d'invasió i disseminació. Finalment vam avaluar la capacitat de les cèl·lules IK-pLKO i IK-shANXA2 de formació de colònies en absència d'un substrat sòlid. Les cèl·lules IK en absència d'ANXA2 presentaven una capacitat reduïda de generar implants. Aquests resultats *in vitro* suggerien que ANXA2 podia jugar un paper en el procés d'invasió i metastasi del EC.

A continuació vam traslladar aquests resultats a un model *in vivo* mimetitzant la disseminació distant i metastasi. Mitjançant injecció intracardíaca es van introduir les cèl·lules IK amb presència o no d'ANXA2 i es va avaluar l'extensió de la malaltia metastàtica. Els animals injectats amb les cèl·lules deficientes en ANXA2 mostraven reducció de la càrrega metastàtica. L'anàlisi histopatològic mostrava un patró similar de disseminació amb metastasi, principalment en glàndules adrenals i ovaris. Les metastasis als ovaris denoten un patró relacionat amb la clínica, probablement degut a l'origen mesentèric comú. A més, ANXA2 *knock down* presentava absència total de metastasis pulmonars i hematògenes.

Vam estudiar la disseminació distant mitjançant enumeració de Cèl·lules Tumorals Circulants (CTC, Circulating Tumor Cells). La presència de CTC en sang perifèrica s'ha associat a mal pronòstic en diferents tipus de càncers [235-237]. La disseminació del càncer es basa en la intravasació al torrent sanguini de les cèl·lules del tumor primari i la posterior disseminació. Les CTC són capaces d'evadir el sistema immunològic i establir un lloc de creixement tumoral secundari. L'expressió d'ANXA2 en les CTC mitjançant RT PCR (Real-Time PCR) es va veure augmentada en els pacients amb malaltia recurrent respecte els pacients que no presentaven recidiva i finalment respecte els pacients sans.

Finalment, vam analitzar la significança d'ANXA2 com a factor predictiu de recurrència. Els resultats mostraven que analitzar l'expressió d'ANXA2 als tumors primaris permet determinar el risc de malaltia recurrent i per tant pot ser útil en l'estratificació dels pacients susceptibles de rebre cirurgia radical i quimio/radioteràpia. A més, l'anàlisi del temps de supervivència lliure de recidiva mostrava que el temps lliure de malaltia era menor en aquells pacients amb valors d'*histoscore* d'ANXA2 > 190 (HR=2.99, p-value=0.004). Per últim, existeix correlació significativa entre la immunotinció en els aspirats endometrials i les peces quirúrgiques fet que ens indica que el valor d'ANXA2 en els curetatges ens permetrà identificar les pacients d'alt risc prèviament a la cirurgia.

## Discussió

D'aquests resultats també se'n pot deduir que ANXA2 podria ser utilitzada com a possible diana terapèutica per al EC. De fet, en la bibliografia trobem un treball recent on s'ha provat que el bloqueig d'ANXA2 mitjançant un anticòs anti-ANXA2 reduïa els processos oncogènics dependents d'EGFR en càncers de mama triple negatius i resistents a Herceptin [238].

### **4.5 Una firma molecular permet predir el tipus histològic en el carcinoma d'endometri mitjançant immunohistoquímica**

En la segona part d'aquest treball de tesi doctoral hem volgut determinar una firma molecular per tal de predir el tipus histològic en el carcinoma d'endometri.

En la majoria de EC la classificació histològica és fàcil. No obstant, el diagnòstic pot ser difícil en alguns carcinomes d'alt grau o que presenten característiques mixtes EEC/NEEC.

El tipus histològic ha demostrat ser un factor biològic predictiu important en el EC. En funció del tipus histològic es determina l'extensió del procés quirúrgic i la subseqüent teràpia adjuvant. La reproductibilitat entre observadors en quant a la determinació del tipus histològic és alta (0.62-0.87), però quan es tracta de tumors d'alt grau, disminueix. De fet, alguns EEC poden presentar característiques papil·lars (típiques de SCE) i alguns SCE poden presentar característiques glandulars (típiques dels EEC). Per aquest motiu, en alguns casos, l'acord interobservador si que és pobre en quant a la determinació del tipus histològic. S'ha dit que un NEEC (normalment el SCE) deriva de la progressió tumoral d'un EEC ja que s'ha vist que el primer comparteix característiques moleculars amb el segon. En alguns casos però, el NEEC sorgeix de novo i no a partir d'un EEC previ cosa que donaria suport a un origen biclonal de la malaltia.

La classificació del EC en dos grups (tipus I, II) és probablement molt rígida. Hi ha certa controvèrsia en quant a si el EEC grau 3 hauria de ser considerat tipus I o tipus II basant-nos en l'epidemiologia i el pronòstic. En la pràctica diària els tumors mostren característiques histològiques i moleculars mixtes. De fet, com hem dit, quan en un tumor s'observa histologia EEC/NEEC combinada i el component minoritari té una presència de, com a mínim, un 5%, aquest es diagnostica com a carcinoma mixt. En la bibliografia trobem moltes sèries de casos que han demostrat que els carcinomes mixtes tenen pitjor pronòstic que els EEC purs i que una mínima presència de component no endometriode ja es suficient

per afectar negativament a l'evolució del pacient [239], cosa que emfatitza la importància de trobar el component NEEC en un EEC. En un estudi multicèntric recent amb participació del nostre grup, hem demostrat que el perfil mutacional i l'evolució clínica dels carcinomes mixtes EEC-SCE és diferent dels EEC o SCE purs [240]. De fet, la classificació recent del EC (TGCA), agrupa en el cluster 4, que es caracteritza per tenir un alt nombre d'alteracions en el número de còpies, la majoria dels SCE i dels carcinomes mixtes EEC/NEEC, a més del 12% dels EEC (la majoria EEC G3) [34].

En varis grups tumorals s'ha vist que utilitzar la morfologia com a eina diagnòstica única és insuficient, com en el càncer de mama o en els limfomes no-Hodgkin, en els quals la immunotinció s'utilitza de forma rutinària. Les subclasses que sorgeixen d'aquests estudis adjuvants influeixen en el tractament i el pronòstic dels pacients.

Així doncs, malgrat que moltes vegades l'acord interobservador en el diagnòstic del EC d'alt grau és baix [241], augmenta quan s'utilitzen marcadors immunohistoquímics. Hi ha varis autors que han intentat utilitzar panells d'anticossos per ajudar en el diagnòstic i el pronòstic del EC. Wei i col·laboradors, després de revisar 358 casos de EC tipus I i II, van afirmar que un panell immunohistoquímic d'anticossos era útil per a la classificació d'aquells casos ambigus o discordants [242]. Alkushi i col·laboradors [243] van estudiar el perfil immunohistoquímic d'expressió de 12 anticossos en 200 EC mitjançant TMA. El grup estava basat en 8 marcadors (p53, ER, bcl-2, HER-2, p27, E2F1, PTEN, i p21) i correlacionava amb el grau histològic, l'estadi i el tipus cel·lular, també es va verificar la reproductibilitat interobservador. Reid-Nicholson i col·laboradors [244] van examinar 126 EC (42 EEC 1-2, 40 EEC 3, and 24 SC) utilitzant un perfil IHQ de 5 biomarcadors i van observar que només el 70% dels EEC 1-2 i el 26% dels EEC 3 presentaven el fenotip típic de EEC (p16 -, ER +, PR +, mCEA -, vimentin +). Alkushi i col·laboradors [245] també van determinar la utilitat d'un panell de 6 anticossos en una sèrie de 160 EC i un subgrup de 58 EC d'alt grau. Van veure que p16, PTEN i IMP3 s'expressaven més en els SCE en comparació amb els EEC 3 i les diferències eren estadísticament significatives, en canvi ER i p53 no arribaven als nivells mínims de significança. Una combinació de p16 i PTEN permetia predir EEC 3 en front a SCE amb una sensibilitat i especificitat del 90% i del 96.8% respectivament. Han i col·laboradors [246] han determinat un acord interobservador pel que fa al tipus histològic de EC d'alt grau mitjançant la morfologia però també utilitzant una combinació de 6 marcadors de rutina i 6 experimentals. El consens en la determinació del tipus histològic era del 72% quan es



## Discussió

basaven únicament en la morfologia però augmentava al 100% quan s'afegien els marcadors d'IHQ. Recomanaven un panell de 3 marcadors, p53, ER, p16. Recentment, McConechi i col·laboradors [247] han realitzat una seqüenciació d'exons dels següents gens: *ARID1A*, *PPP2R1A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, *CTNNB1*, *P53*, *BRAF* i *PPP2R5C* i han suggerit que el panell de 9 marcadors pot ajudar en la determinació del tipus histològic. Malgrat tots els estudis, no existeixen guies precises pel que fa a l'ús de la IHQ o la patologia molecular en la determinació del tipus histològic [247].

Nosaltres hem realitzat la IHQ per diverses proteïnes, les quals en anàlisis previs de cDNA i proteïnes s'expressaven de forma diferencial en EEC i en SCE. Primer es van escollir aquelles proteïnes l'expressió de les quals presentava diferències estadísticament significatives entre EEC 1-2 i SCE. Es va definir una signatura basada en el nombre de condicions satisfetes. Com a resultat es van identificar 9 condicions que permetien predir SCE ( $IMP3 \geq 2$ ,  $IMP2 \geq 115$ ,  $p53 \geq 20$ ,  $HMGA2 \geq 30$ ,  $FoR1 \geq 50$ ,  $p16 \geq 170$ ,  $CycE1 \geq 220$ , nuclear  $PTEN \geq 2$  i  $ER \leq 50$ ). La signatura era sòlida amb una bona sensibilitat i especificitat 85.71% (63-96%) i 100% (89-100%) respectivament i l'acord interobservador també era bo. La firma va predir correctament tots els EEC 1-2 i gairebé tots els SCE. 3 SCE van ser predits erròniament com a EEC. Les seccions corresponents a aquests casos es van revisar retrospectivament i es va veure que totes tenien característiques típiques patològiques i immunohistoquímiques de SCE. A continuació vam comprovar la utilitat del panell en un grup de EEC 3 i tots van ser predits com a EEC.

En el grup de nou carcinomes mixtes (EEC-SC) la firma va predir el diagnòstic patològic de cada un dels components (endometriode i la no endometriode) en 4 casos cosa que suggereix que els carcinomes mixtes són ambigus. Les característiques moleculars dels dos components es superposen i per tant presenten característiques moleculars i immunohistoquímiques mixtes.

Per confirmar la fiabilitat de la firma vam utilitzar una sèrie de validació de 88 casos dels quals 24 de 29 EEC 1-2 i 24 de 28 EEC 3 van ser predits com a EEC i tots els SCE (31) van ser predits com a SCE amb una sensibilitat i especificitat del 100% (CI: 83%-100%) i 83% (CI: 64%-94%), respectivament.

En resum, 12 dels 185 casos (després d'extreure els carcinomes mixtes) van ser predits de manera errònia. D'aquests 12 casos discrepants, l'anàlisi mutacional va confirmar el diagnòstic patològic de tots menys un. Aquest cas era microscòpicament un EEC 3 però

presentava una mutació de p53 i cap mutació característica de EEC per tant, va ser reinterpretat com a SCE i de fet, predit com a SCE mitjançant la signatura molecular; així doncs podem dir que la nostra firma predictiva va ser superior a les característiques microscòpiques pel que fa al fet d'identificar el tumor com a SCE.

#### **4.6 La tecnologia dels TMA i la immunohistoquímica són eines potencials per a l'estudi del càncer d'endometri**

La immunohistoquímica, una eina d'ús habitual en els serveis d'anatomia patològica, s'utilitza cada vegada més en la recerca translacional del càncer. El fet que cada vegada es disposi de més anticossos que funcionen en parafina, millors tècniques de recuperació antigènica (que permeten superar els problemes causats per les diferents fixacions i processaments tissulars) i millors sistemes de detecció, ha fet que aquesta sigui una tècnica de gran utilitat per a l'estudi de marcadors diagnòstics, pronòstics i predictius de malaltia.

La tecnologia dels TMA ha estat àmpliament utilitzada en la bibliografia. Des de que Kononen i col·laboradors van introduir un nou mètode per combinar varis teixits en un únic bloc de parafina mitjançant un *array* matricial de teixits, la tecnologia dels TMA s'ha utilitzat com una eina d'alt rendiment per entendre la biologia, el diagnòstic i el pronòstic del càncer.

La utilitat de la tecnologia dels TMA, juntament amb la Immunohistoquímica, per a l'estudi de la patologia molecular ha estat demostrada en molts treballs. Els estudis de validació en càncer d'endometri [248] han demostrat una bona concordança entre els resultats obtinguts mitjançant TMA i les seccions senceres. Això indica que un bon disseny del TMA d'acord amb els biomarcadors que es pretenen analitzar permetrà superar el principal desavantatge d'aquesta tecnologia, l'heterogeneïtat dels teixits. En el EC els TMA s'han utilitzat amb diverses finalitats. Per exemple, per establir el perfil immunohistoquímic respecte altres tumors [243, 244], per definir panells de marcadors que permetin classificar els canvis pre-malignes de l'endometri [172, 173], per identificar molècules que s'expressen de manera diferencial en els diferents subtipus de EC [249, 250], per comprovar el valor pronòstic de nous biomarcadors [251, 252], per avaluar l'amplificació de DNA mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* [253] o per correlacionar les dades obtingudes en un TMA amb altres alteracions moleculars [254, 255].

## Discussió

Nosaltres hem utilitzat la IHQ i els TMA per a l'estudi de l'expressió de proteïnes implicades en la resistència a la radioteràpia i la hipòxia així com per estudiar un gen predictiu de recurrència en el càncer d'endometri. A més, hem obtingut una firma de biomarcadors que ens permetrà predir el tipus histològic en el EC.

**Conclusions**

---



## 5 CONCLUSIONS

- PRIMERA Les recidives post radioteràpia de EC mostren valors d'immunoexpressió més elevats de gens relacionats amb la proliferació, la inhibició de l'apoptosi i la hipòxia.
- SEGONA La línia cel·lular de EC IK sotmesa a condicions baixes d'oxigen mostra alteracions en l'expressió de proteïnes implicades en l'apoptosi, la via Wnt i la família de proteïnes NF- $\kappa$ B . En canvi, la radiació no influeix en els nivells d'expressió o l'activitat d'aquestes.
- TERCERA La hipòxia induïx l'activació de la via NF- $\kappa$ B canònica i alternativa tant en la línia cel·lular de EC IK com en les recidives post radioteràpia (IHQ).
- QUARTA La hipòxia controla l'activació de NF- $\kappa$ B en la línia cel·lular de EC IK. L'activació de la via NF- $\kappa$ B intervé en la supervivència cel·lular sota condicions d'hipòxia.
- CINQUENA El gen ANXA2 està implicat en el procés de metàstasi del EC.
- SISENA ANXA2 és un marcador predictiu de malaltia recurrent en el EC i en el EC de baix grau, estadi I.
- SETENA La firma molecular de 9 biomarcadors permet predir el tipus histològic en el EC amb una sensibilitat i una especificitat del 85.71% (63-96%) i 100% (89-100%), respectivament.
- VUITENA Els carcinomes mixtes endometrioides-no endometrioides tenen característiques histològiques i moleculars mixtes.

## Conclusions

NOVENA La Immunohistoquímica i els TMA's són eines de gran utilitat per a l'estudi del EC.







## 6 ANNEX

### PUBLICACIONES

- 1- Mutation profile and clinical outcome of mixed endometrioid-serous endometrial carcinomas are different from that of pure endometrioid or serous carcinomas.  
Coenegrachts L, Garcia-Dios DA, Depreeuw J, Santacana M, Gatus S, Zikan M, Moerman P, Verbist L, Lambrechts D, Matias-Guiu X, Amant F.  
*Virchows Arch.* 2015 Feb 13. [Epub ahead of print]
- 2- Modeling glands with PTEN deficient cells and microscopic methods for assessing PTEN loss: Endometrial cancer as a model.  
Eritja N, Santacana M, Maiques O, Gonzalez-Tallada X, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
*Methods.* 2014 Nov 18. [Epub ahead of print]
- 3- FISH analysis of PTEN in endometrial carcinoma. Comparison with SNP arrays and MLPA.  
Maiques O, Cuevas D, García Dios DA, Coenegrachts L, Santacana M, Velasco A, Romero M, Sónia G, Lambrechts D, Dolcet X, Amant F, Matias-Guiu X.  
*Histopathology.* 2014 Sep;65(3):371-88.
- 4- A 9-protein biomarker molecular signature for predicting histologic type in endometrial carcinoma by immunohistochemistry.  
Santacana M, Maiques O, Valls J, Gatus S, Abó AI, López-García MÁ, Mota A, Reventós J, Moreno-Bueno G, Palacios J, Bartosch C, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
*Hum Pathol.* 2014 Dec;45(12):2394-403.
- 5- Annexin-A2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cancer.  
Alonso-Alconada L, Santacana M, Garcia-Sanz P, Muínelo-Romay L, Colas E, Mirantes C, Monge M, Cueva J, Oliva E, Soslow RA, Lopez MA, Palacios J, Prat J, Valls J, Krakstad C, Salvesen H, Gil-Moreno A, Lopez-Lopez R, Dolcet X, Moreno-Bueno G, Reventos J, Matias-Guiu X, Abal M.  
*Int J Cancer.* 2015 Apr 15;136(8):1863-73.
- 6- Role of local bioactivation of vitamin D by CYP27A1 and CYP2R1 in the control of cell growth in normal endometrium and endometrial carcinoma.  
Bergadà L, Pallares J, Maria Vittoria A, Cardus A, Santacana M, Valls J, Cao G, Fernández E, Dolcet X, Dusso AS, Matias-Guiu X.  
*Lab Invest.* 2014 Jun;94(6):608-22.
- 7- Optimal protocol for PTEN immunostaining; role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues.  
Maiques O, Santacana M, Valls J, Pallares J, Mirantes C, Gatus S, García Dios DA, Amant F, Pedersen HC, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
*Hum Pathol.* 2014 Mar;45(3):522-32
- 8- Combinatorial therapy using dovitinib and ICI182.780 (fulvestrant) blocks tumoral activity of endometrial cancer cells.  
Eritja N, Domingo M, Dosil MA, Mirantes C, Santacana M, Valls J, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Dolcet X.  
*Mol Cancer Ther.* 2014 Apr;13(4):776-87.
- 9-  $\beta$ -Catenin and cyclin D1 expression in Gli1-independent basal cell carcinomas.  
Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, Fernández RM, Sanmartín V, Casanova JM, Gari E.  
*Eur J Dermatol.* 2013 Sep-Oct;23(5):734-6.

- 10- Usefulness of negative and weak-diffuse pattern of SDHB immunostaining in assessment of SDH mutations in paragangliomas and pheochromocytomas.  
Castelblanco E, Santacana M, Valls J, de Cubas A, Cascón A, Robledo M, Matias-Guiu X.  
Endocr Pathol. 2013 Dec;24(4):199-205
- 11- An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias.  
Mirantes C, Eritja N, Dosil MA, Santacana M, Pallares J, Gatus S, Bergada L, Maiques O, Matias-Guiu X, Dolcet X.  
Dis Model Mech. 2013 May;6(3):710-20.
- 12- Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors.  
Urduñigo RG, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, Huidobro C, Rodriguez RM, Ferrero C, Martinez-Cambor P, Obaya AJ, Bernal T, Parra-Blanco A, Rodrigo L, Santacana M, Matias-Guiu X, Soldevilla B, Dominguez G, Bonilla F, Cal S, Lopez-Otin C, Fraga MF.  
Cancer Res. 2013 Jan 1;73(1):395-405.
- 13- Gene expression microarray-based assay to determine tumor site of origin in a series of metastatic tumors to the ovary and peritoneal carcinomatosis of suspected gynecologic origin.  
Azueta A, Maiques O, Velasco A, Santacana M, Pallares J, Novell A, Llombart-Cussac A, Gonzalez-Tallada X, Mozos A, Prat J, Pillai R, Mata M, Matias-Guiu X.  
Hum Pathol. 2013 Jan;44(1):20-8.
- 14- Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA.  
Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Díez-Castro MJ, Cuevas D, Panadés MJ, González S, Llombart A, Iglesias E, Matias-Guiu X.  
Virchows Arch. 2012 Jun;460(6):569-75.
- 15- Immunohistochemical features of post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium: role for proteins involved in resistance to apoptosis and hypoxia.  
Santacana M, Yeramian A, Velasco A, Bergada L, Gatus S, García V, Azueta A, Palacios J, Dolcet X, Oliva E, Matias-Guiu X.  
Histopathology. 2012 Feb;60(3):460-71.
- 16- Sprouty1 is a candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma.  
Macià A, Gallel P, Vaquero M, Gou-Fabregas M, Santacana M, Maliszewska A, Robledo M, Gardiner JR, Basson MA, Matias-Guiu X, Encinas M.  
Oncogene. 2012 Aug 30;31(35):3961-72.
- 17- FGFR2 alterations in endometrial carcinoma.  
Gatus S, Velasco A, Azueta A, Santacana M, Pallares J, Valls J, Dolcet X, Prat J, Matias-Guiu X.  
Mod Pathol. 2011 Nov;24(11):1500-10.
- 18- Nuclear factor- $\kappa$ B2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF-1 $\alpha$  independent manner.  
Yeramian A, Santacana M, Sorolla A, Llobet D, Encinas M, Velasco A, Bahi N, Eritja N, Domingo M, Oliva E, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
Lab Invest. 2011 Jun;91(6):859-71.
- 19- Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway.  
Yeramian A, Sorolla A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egado R, Casanova JM, Puig S, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Martí RM.  
Int J Cancer. 2012 Feb 15;130(4):967-78.
- 20- KSR1 is overexpressed in endometrial carcinoma and regulates proliferation and TRAIL-induced apoptosis by modulating FLIP levels.

Llobet D, Eritja N, Domingo M, Bergada L, Mirantes C, Santacana M, Pallares J, Macià A, Yeramian A, Encinas M, Moreno-Bueno G, Palacios J, Lewis RE, Matias-Guiu X, Dolcet X.  
Am J Pathol. 2011 Apr;178(4):1529-43.

21- Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma.

Velasco A, Pallares J, Santacana M, Gatus S, Fernandez M, Domingo M, Valls J, Yeramian A, Encinas M, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
Hum Pathol. 2011 Feb;42(2):185-93.

22- A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis.

Eritja N, Llobet D, Domingo M, Santacana M, Yeramian A, Matias-Guiu X, Dolcet X.  
Am J Pathol. 2010 Jun;176(6):2722-31.

23- The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms.

Llobet D, Eritja N, Yeramian A, Pallares J, Sorolla A, Domingo M, Santacana M, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X, Dolcet X.  
Eur J Cancer. 2010 Mar;46(4):836-50.

24- DcR1 expression in endometrial carcinomas.

Tarragona J, Llecha N, Santacana M, Lopez S, Gatus S, Llobet D, Dolcet X, Palomar-Asenjo V, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X.  
Virchows Arch. 2010 Jan;456(1):39-44.

25- A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma.

Pallares J, Santacana M, Puente S, Lopez S, Yeramian A, Eritja N, Sorolla A, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
Anal Quant Cytol Histol. 2009 Aug;31(4):217-26. Review.

26- CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation.

Pallares J, Llobet D, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Cuevas D, Lopez S, Palomar-Asenjo V, Yeramian A, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
Am J Pathol. 2009 Jan;174(1):287-96.

27- Targeted therapies in gynecologic cancers and melanoma.

Ortega E, Marti RM, Yeramian A, Sorolla A, Dolcet X, Llobet D, Abal L, Santacana M, Pallares J, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X.  
Semin Diagn Pathol. 2008 Nov;25(4):262-73. Review.

Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints.

Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Dolcet X, Matias-Guiu X.  
J Clin Pathol. 2009 Sep;62(9):777-85. Review.

28- Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma.

Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, Sorolla A, Llecha N, Matias-Guiu X.  
Int J Gynecol Pathol. 2008 Jul;27(3):305-17. Review.

29- Nuclear factor-kappaB activation is associated with somatic and germ line RET mutations in medullary thyroid carcinoma.

Gallel P, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Eritja N, Santacana M, Yeramian A, Palomar-Asenjo V, Lagarda H, Mauricio D, Encinas M, Matias-Guiu X.  
Hum Pathol. 2008 Jul;39(7):994-1001.

## Annex

30- Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma.  
Pallarés J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catasús L, Prat J, Matias-Guiu X.  
Mod Pathol. 2008 Jun;21(6):691-9.

## **Bibliografia**

---



## 7 BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10-7.
3. Kurman, *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 2015.
4. Zaino, R.J., et al., *The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study*. Cancer, 1995. **75**(1): p. 81-6.
5. Keys, H.M., et al., *A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(3): p. 744-51.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*, in *Cell*. 2000: United States. p. 57-70.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*, in *Cell*. 2011, 2011 Elsevier Inc: United States. p. 646-74.
8. kumar, *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. 2015.
9. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
10. Byron, S.A., et al., *FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30801.
11. Spaans, V.M., et al., *Designing a high-throughput somatic mutation profiling panel specifically for gynaecological cancers*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93451.
12. Bussaglia, E., et al., *PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases*. Hum Pathol, 2000. **31**(3): p. 312-7.
13. Ashwell, S. and S. Zabludoff, *DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4032-7.
14. Bullock, A.N., et al., *Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14338-42.
15. Dolcet, X., et al., *FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis*. Lab Invest, 2005. **85**(7): p. 885-94.
16. Llobet, D., et al., *KSRI is overexpressed in endometrial carcinoma and regulates proliferation and TRAIL-induced apoptosis by modulating FLIP levels*. Am J Pathol, 2011. **178**(4): p. 1529-43.
17. Paz-Priel, I., et al., *C/EBPalpha or C/EBPalpha oncoproteins regulate the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by direct interaction with NF-kappaB p50 bound to the bcl-2 and FLIP gene promoters*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 365-74.
18. Xu, H.L., et al., *Polymorphisms and haplotypes in the caspase-3, caspase-7, and caspase-8 genes and risk for endometrial cancer: a population-based, case-*



## Bibliografía

- control study in a Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(7): p. 2114-22.
19. E, O. *COORDINACIÓN DE INNOVACIÓN EDUCATIVA (CIE)*. 2015; Available from: <http://www.cie.umich.mx/biolog%C3%ADa%20de%20sistemas/Cap%20V%20BIO.html>.
  20. Sakamoto, T., et al., *Microsatellite instability and somatic mutations in endometrial carcinomas*. *Gynecol Oncol*, 1998. **71**(1): p. 53-8.
  21. Basil, J.B., et al., *Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Cancer*, 2000. **89**(8): p. 1758-64.
  22. O'Hara, A.J. and D.W. Bell, *The genomics and genetics of endometrial cancer*. *Adv Genomics Genet*, 2012. **2012**(2): p. 33-47.
  23. Lax, S.F. and R.J. Kurman, *A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses*. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1997. **81**: p. 228-32.
  24. Matias-Guiu, X., et al., *Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma*. *Hum Pathol*, 2001. **32**(6): p. 569-77.
  25. Yeramian, A., et al., *Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression*. *Oncogene*, 2013. **32**(4): p. 403-13.
  26. Fadare, O. and W. Zheng, *Insights into endometrial serous carcinogenesis and progression*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2009. **2**(5): p. 411-32.
  27. Hoang, L.N., et al., *Immunohistochemical characterization of prototypical endometrial clear cell carcinoma--diagnostic utility of HNF-1beta and oestrogen receptor*. *Histopathology*, 2014. **64**(4): p. 585-96.
  28. Fadare, O., et al., *The clinicopathologic significance of p53 and BAF-250a (ARID1A) expression in clear cell carcinoma of the endometrium*. *Mod Pathol*, 2013. **26**(8): p. 1101-10.
  29. Catusus, L., et al., *Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(4): p. 522-9.
  30. Murali, R., R.A. Soslow, and B. Weigelt, *Classification of endometrial carcinoma: more than two types*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(7): p. e268-78.
  31. Krakstad, C., et al., *High-throughput mutation profiling of primary and metastatic endometrial cancers identifies KRAS, FGFR2 and PIK3CA to be frequently mutated*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e52795.
  32. Bourgon, R., et al., *High-throughput detection of clinically relevant mutations in archived tumor samples by multiplexed PCR and next-generation sequencing*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(8): p. 2080-91.
  33. Pappa, K.I. and N.P. Anagnou, *Emerging issues of the expression profiling technologies for the study of gynecologic cancer*. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **193**(3 Pt 2): p. 908-18.
  34. Kandath, C., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. *Nature*, 2013. **497**(7447): p. 67-73.
  35. Gurin, C.C., et al., *Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 462-6.
  36. Gryfe, R., et al., *Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(2): p. 69-77.
  37. Oda, K., et al., *High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 10669-73.

38. Cheung, L.W., et al., *High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(2): p. 170-85.
39. Chow, L.M. and S.J. Baker, *PTEN function in normal and neoplastic growth*. *Cancer Lett*, 2006. **241**(2): p. 184-96.
40. Song, M.S., L. Salmena, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(5): p. 283-96.
41. Cook, W.D. and B.J. McCaw, *Accommodating haploinsufficient tumor suppressor genes in Knudson's model*. *Oncogene*, 2000. **19**(30): p. 3434-8.
42. Bonneau, D. and M. Longy, *Mutations of the human PTEN gene*. *Hum Mutat*, 2000. **16**(2): p. 109-22.
43. Salvesen, H.B., et al., *PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Int J Cancer*, 2001. **91**(1): p. 22-6.
44. Fukuchi, T., et al., *Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium*. *Cancer Res*, 1998. **58**(16): p. 3526-8.
45. Kobayashi, K., et al., *Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas*. *Jpn J Cancer Res*, 1999. **90**(1): p. 55-9.
46. Schlosshauer, P.W., et al., *Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma*. *Mod Pathol*, 2000. **13**(10): p. 1066-71.
47. Machin, P., et al., *CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas*. *Hum Pathol*, 2002. **33**(2): p. 206-12.
48. Kreizman-Shefer, H., et al., *Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer*. *Diagn Pathol*, 2014. **9**: p. 77.
49. Rahman, M.T., et al., *ESR1 gene amplification in endometrial carcinomas: a clinicopathological analysis*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(9): p. 3775-81.
50. Zannoni, G.F., et al., *The expression ratios of estrogen receptor alpha (ERalpha) to estrogen receptor beta1 (ERbeta1) and ERalpha to ERbeta2 identify poor clinical outcome in endometrioid endometrial cancer*. *Hum Pathol*, 2013. **44**(6): p. 1047-54.
51. Pietsch, E.C., et al., *The p53 family and programmed cell death*. *Oncogene*, 2008. **27**(50): p. 6507-21.
52. Jia, L., et al., *Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(8): p. 2263-9.
53. Lax, S.F., et al., *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways*. *Cancer*, 2000. **88**(4): p. 814-24.
54. Halperin, R., et al., *Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium*. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2001. **22**(2): p. 122-6.
55. Tashiro, H., et al., *p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(1): p. 177-85.
56. Kovalev, S., et al., *Loss of p53 function in uterine papillary serous carcinoma*. *Hum Pathol*, 1998. **29**(6): p. 613-9.
57. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. *Pathology*, 2007. **39**(3): p. 305-18.
58. Stefansson, I.M., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(7): p. 1242-52.

## Bibliografia

59. Risinger, J.I., et al., *Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 98-102.
60. Mell, L.K., et al., *Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5546-53.
61. Konecny, G.E., et al., *Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 263-9.
62. Santin, A.D., et al., *Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: identification of novel molecular markers for uterine serous cancer diagnosis and therapy*. Br J Cancer, 2005. **92**(8): p. 1561-73.
63. Berchuck, A., et al., *Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(1 Pt 1): p. 15-21.
64. Hetzel, D.J., et al., *HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 1992. **47**(2): p. 179-85.
65. Yemelyanova, A., et al., *Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(10): p. 1504-14.
66. Salvesen, H.B., S. Das, and L.A. Akslen, *Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 153-9.
67. Chiesa-Vottero, A.G., et al., *Immunohistochemical overexpression of p16 and p53 in uterine serous carcinoma and ovarian high-grade serous carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2007. **26**(3): p. 328-33.
68. Netzer, I.M., et al., *Diagnostic implications of p16 expression in serous papillary endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2011. **21**(8): p. 1441-5.
69. McCluggage, W.G., et al., *HMGA2 is commonly expressed in uterine serous carcinomas and is a useful adjunct to diagnosis*. Histopathology, 2012. **60**(4): p. 547-53.
70. Nielsen, J., et al., *A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1262-70.
71. Christiansen, J., et al., *IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes*. J Mol Endocrinol, 2009. **43**(5): p. 187-95.
72. Zhang, L., et al., *IMP2 expression distinguishes endometrioid from serous endometrial adenocarcinomas*. Am J Surg Pathol, 2011. **35**(6): p. 868-72.
73. Li, C., et al., *Expression of a novel oncofetal mRNA-binding protein IMP3 in endometrial carcinomas: diagnostic significance and clinicopathologic correlations*. Mod Pathol, 2007. **20**(12): p. 1263-8.
74. Zheng, W., et al., *The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(2): p. 304-15.
75. Mhawech-Fauceglia, P., et al., *IMP3 distinguishes uterine serous carcinoma from endometrial endometrioid adenocarcinoma*. Am J Clin Pathol, 2010. **133**(6): p. 899-908.
76. Dainty, L.A., et al., *Overexpression of folate binding protein and mesothelin are associated with uterine serous carcinoma*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(3): p. 563-70.

77. Chang, M.C., et al., *Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways*. *Biochem J*, 2012. **442**(2): p. 293-302.
78. Bharadwaj, U., et al., *Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 106.
79. Wang, K., et al., *Inhibition of mesothelin as a novel strategy for targeting cancer cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e33214.
80. Marone, M., et al., *Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(1): p. 34-9.
81. Leach, F.S., et al., *Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas*. *Cancer Res*, 1993. **53**(9): p. 1986-9.
82. Akama, Y., et al., *Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas*. *Jpn J Cancer Res*, 1995. **86**(7): p. 617-21.
83. Keyomarsi, K. and A.B. Pardee, *Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(3): p. 1112-6.
84. Schraml, P., et al., *Cyclin E overexpression and amplification in human tumours*. *J Pathol*, 2003. **200**(3): p. 375-82.
85. Cassia, R., et al., *Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma*. *J Pathol*, 2003. **201**(4): p. 589-95.
86. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. *Genes Dev*, 1999. **13**(1): p. 76-86.
87. Padmanabhan, B., et al., *Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer*. *Mol Cell*, 2006. **21**(5): p. 689-700.
88. Kim, Y.R., et al., *Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin*. *J Pathol*, 2010. **220**(4): p. 446-51.
89. Jiang, T., et al., *High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5486-96.
90. Chen, N., et al., *Nrf2 expression in endometrial serous carcinomas and its precancers*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010. **4**(1): p. 85-96.
91. Zhang, X., et al., *Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7086-91.
92. Lee, S.H., et al., *Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer*. *Apmis*, 2003. **111**(2): p. 309-14.
93. Korkolopoulou, P., et al., *c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations*. *Urology*, 2004. **63**(6): p. 1198-204.
94. Dutton, A., et al., *Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(17): p. 6611-6.
95. Rippo, M.R., et al., *FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(47): p. 7753-60.
96. Chen, H.X., et al., *Expression of cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein is associated with malignant potential in endometrial carcinoma*, in *Int J Gynecol Cancer*. 2005: United States. p. 663-70.
97. Thome, M. and J. Tschopp, *Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(1): p. 50-8.

## Bibliografia

98. Tawfic, S., et al., *Protein kinase CK2 signal in neoplasia*. *Histol Histopathol*, 2001. **16**(2): p. 573-82.
99. Zhang, P., A.T. Davis, and K. Ahmed, *Mechanism of protein kinase CK2 association with nuclear matrix: role of disulfide bond formation*. *J Cell Biochem*, 1998. **69**(2): p. 211-20.
100. Tawfic, S., et al., *Nuclear matrix as an anchor for protein kinase CK2 nuclear signalling*. *J Cell Biochem*, 1996. **62**(2): p. 165-71.
101. Pallares, J., et al., *CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(1): p. 287-96.
102. Llobet, D., et al., *CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulating FLIP levels in endometrial carcinoma cells*. *Oncogene*, 2008. **27**(18): p. 2513-24.
103. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 221-7.
104. Aggarwal, B.B., *Nuclear factor-kappaB: the enemy within*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(3): p. 203-8.
105. Pallares, J., et al., *Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma*. *J Pathol*, 2004. **204**(5): p. 569-77.
106. Dolcet, X., et al., *NF-kB in development and progression of human cancer*. *Virchows Arch*, 2005. **446**(5): p. 475-82.
107. Olinerenko, S., et al., *Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(4): p. 843-54.
108. Hitchcock, J.K., A.A. Katz, and G. Schafer, *Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity*. *J Cell Commun Signal*, 2014. **8**(2): p. 125-33.
109. Lokman, N.A., et al., *The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression*. *Cancer Microenviron*, 2011. **4**(2): p. 199-208.
110. Zhai, H., et al., *Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression*. *J Neurosci*, 2011. **31**(40): p. 14346-60.
111. Zheng, L., et al., *Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19390.
112. Sharma, M.R., et al., *Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression*. *Exp Mol Pathol*, 2006. **81**(2): p. 146-56.
113. Zhao, P., et al., *Annexin II promotes invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells in vitro via its interaction with HAb18G/CD147*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(2): p. 387-95.
114. Zhou, S., et al., *Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis*. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(7): p. M112.017988.
115. Maxwell, G.L., et al., *Proteomic analysis of stage I endometrial cancer tissue: identification of proteins associated with oxidative processes and inflammation*. *Gynecol Oncol*, 2011. **121**(3): p. 586-94.
116. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 38-47.
117. Vaupel, P., D.K. Kelleher, and M. Hockel, *Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 29-35.

118. Sadlecki, P., et al., *The role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha , glucose transporter-1, (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 616850.
119. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
120. Kazi, A.A. and R.D. Koos, *Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2363-74.
121. Yoshida, T., et al., *Transcriptional upregulation of HIF-1alpha by NF-kappaB/p65 and its associations with beta-catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells*. Lab Invest, 2013. **93**(11): p. 1184-93.
122. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
123. Semenza, G.L., *Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(1): p. 47-53.
124. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
125. Mani, A. and E.P. Gelmann, *The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(21): p. 4776-89.
126. Benedetti Panici, P., et al., *Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(23): p. 1707-16.
127. Kitchener, H., et al., *Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study*. Lancet, 2009. **373**(9658): p. 125-36.
128. Colombo, N., et al., *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, in *Ann Oncol*. 2013: England. p. vi33-8.
129. Creutzberg, C.L. and R.A. Nout, *The Role of Radiotherapy in Endometrial Cancer: Current Evidence and Trends*, in *Curr Oncol Rep*. 2011. p. 472-8.
130. Baskar, R., et al., *Cancer and radiation therapy: current advances and future directions*. Int J Med Sci, 2012. **9**(3): p. 193-9.
131. Hall, E.J., et al., *Basic radiobiology*. Am J Clin Oncol, 1988. **11**(3): p. 220-52.
132. Yoshiyama, K.O., K. Sakaguchi, and S. Kimura, *DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals*. Biology (Basel), 2013. **2**(4): p. 1338-56.
133. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis*, in *Nature*. 2005: England. p. 864-70.
134. Ding, M., et al., *Newly developed strategies for improving sensitivity to radiation by targeting signal pathways in cancer therapy*. Cancer Sci, 2013. **104**(11): p. 1401-10.
135. cancer.org, *Chemotherapy for endometrial cancer*. 2015.
136. cancer.org, *Hormone therapy for endometrial cancer*. 2015.
137. Li, J., et al., *Wortmannin reduces metastasis and angiogenesis of human breast cancer cells via nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 and interleukin-8 pathways*. J Int Med Res, 2012. **40**(3): p. 867-76.
138. Chon, H.S., W. Hu, and J.J. Kavanagh, *Targeted therapies in gynecologic cancers*. Curr Cancer Drug Targets, 2006. **6**(4): p. 333-63.

## Bibliografia

139. Gehrig, P.A. and V.L. Bae-Jump, *Promising novel therapies for the treatment of endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(2): p. 187-94.
140. Spreafico, A. and H.J. Mackay, *Current phase II clinical data for ridaforolimus in cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(11): p. 1485-93.
141. Chen, J., et al., *Activation of PI3K/Akt/mTOR pathway and dual inhibitors of PI3K and mTOR in endometrial cancer*. Curr Med Chem, 2014. **21**(26): p. 3070-80.
142. cancer.gov. *A Phase 2 Study of Oral MKC-1 in Patients With Ovarian or Endometrial Cancer*. 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view>.
143. Schwab, C.L., et al., *Neratinib shows efficacy in the treatment of HER2/neu amplified uterine serous carcinoma in vitro and in vivo*. Gynecol Oncol, 2014. **135**(1): p. 142-8.
144. Castonguay, V., et al., *A phase II trial of sunitinib in women with metastatic or recurrent endometrial carcinoma: a study of the Princess Margaret, Chicago and California Consortia*. Gynecol Oncol, 2014. **134**(2): p. 274-80.
145. Oza, A.M., et al., *Phase II study of erlotinib in recurrent or metastatic endometrial cancer: NCIC IND-148*. J Clin Oncol, 2008. **26**(26): p. 4319-25.
146. Vilella, J.A., et al., *HER-2/neu overexpression in uterine papillary serous cancers and its possible therapeutic implications*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(5): p. 1897-902.
147. Jewell, E., et al., *Use of trastuzumab in the treatment of metastatic endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(3): p. 1370-3.
148. Wilhelm, S. and D.S. Chien, *BAY 43-9006: preclinical data*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(25): p. 2255-7.
149. Wei, X.W., Z.R. Zhang, and Y.Q. Wei, *Anti-angiogenic drugs currently in Phase II clinical trials for gynecological cancer treatment*. Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(9): p. 1181-92.
150. Llobet, D., et al., *The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms*. Eur J Cancer, 2010. **46**(4): p. 836-50.
151. Lee, P.S. and A.A. Secord, *Targeting molecular pathways in endometrial cancer: a focus on the FGFR pathway*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(4): p. 507-12.
152. Dong, P., et al., *Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 130362.
153. Emons, G., et al., *Phase II study of fulvestrant 250 mg/month in patients with recurrent or metastatic endometrial cancer: a study of the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie*. Gynecol Oncol, 2013. **129**(3): p. 495-9.
154. Shao, R., *Progesterone receptor isoforms A and B: new insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma*. Ecancermedicallscience, 2013. **7**: p. 381.
155. Leslie, K.K., et al., *Endometrial cancer*, in *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012: United States. p. 255-68.
156. Ren, Y., et al., *Down-regulation of the progesterone receptor by the methylation of progesterone receptor gene in endometrial cancer cells*, in *Cancer Genet Cytogenet*. 2007: United States. p. 107-16.
157. Wagenknecht, B., et al., *Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells*. Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(3): p. 117-25.

158. Orłowski, R.Z., et al., *Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor*. *Cancer Res*, 1998. **58**(19): p. 4342-8.
159. Kudo, Y., et al., *p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(3): p. 916-23.
160. Sunwoo, J.B., et al., *Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(5): p. 1419-28.
161. Dolcet, X., et al., *Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(31): p. 22118-30.
162. Sorolla, A., et al., *Blockade of NFkappaB activity by Sunitinib increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells*. *Mol Oncol*, 2012. **6**(5): p. 530-41.
163. Gallinari, P., et al., *HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics*. *Cell Res*, 2007. **17**(3): p. 195-211.
164. Takai, N., et al., *Human ovarian carcinoma cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potentially induce apoptosis*. *Cancer*, 2004. **101**(12): p. 2760-70.
165. Ma, X., H.H. Ezzeldin, and R.B. Diasio, *Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials*. *Drugs*, 2009. **69**(14): p. 1911-34.
166. Ren, J., et al., *HDAC as a therapeutic target for treatment of endometrial cancers*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(11): p. 1847-56.
167. Jiang, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both Type I and Type II endometrial cancer cells*. *Gynecol Oncol*, 2007. **105**(2): p. 493-500.
168. Reinbolt, R.E. and J.L. Hays, *The Role of PARP Inhibitors in the Treatment of Gynecologic Malignancies*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 237.
169. Wang, X., et al., *HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review)*. *Int J Oncol*, 2014. **45**(1): p. 18-30.
170. Maiques, O., et al., *Optimal protocol for PTEN immunostaining; role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues*. *Hum Pathol*, 2014. **45**(3): p. 522-32.
171. Battifora, H. and P. Mehta, *The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block*. *Lab Invest*, 1990. **63**(5): p. 722-4.
172. Woo, M.M., et al., *Gain of OGP, an estrogen-regulated oviduct-specific glycoprotein, is associated with the development of endometrial hyperplasia and endometrial cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(23): p. 7958-64.
173. Balmer, N.N., et al., *Steroid receptor coactivator AIB1 in endometrial carcinoma, hyperplasia and normal endometrium: Correlation with clinicopathologic parameters and biomarkers*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(12): p. 1593-605.
174. Setakornnukul, J., et al., *Long term outcomes of patients with endometrial carcinoma treated with radiation - Siriraj Hospital experience*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(5): p. 2279-85.
175. Chino, J.P., et al., *The influence of radiation modality and lymph node dissection on survival in early-stage endometrial cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012. **82**(5): p. 1872-9.



## Bibliografia

176. Sorbe, B. and K. Soderstrom, *Treatment of vaginal recurrences in endometrial carcinoma by high-dose-rate brachytherapy*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(1): p. 241-7.
177. Jerezek-Fossa, B., A. Badzio, and J. Jassem, *Recurrent endometrial cancer after surgery alone: results of salvage radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000. **48**(2): p. 405-13.
178. Feofanova, N., J.M. Geraldo, and L.M. de Andrade, *Radiation oncology in vitro: trends to improve radiotherapy through molecular targets*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 461687.
179. Ahmed, K.M., H. Zhang, and C.C. Park, *NF-kappaB regulates radioresistance mediated by beta1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2013. **73**(12): p. 3737-48.
180. Pijnenborg, J.M., et al., *Defective mismatch repair and the development of recurrent endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2004. **94**(2): p. 550-9.
181. Huvila, J., et al., *Progesterone receptor negativity is an independent risk factor for relapse in patients with early stage endometrioid endometrial adenocarcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2013. **130**(3): p. 463-9.
182. Pijnenborg, J.M., et al., *Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma*. *J Pathol*, 2005. **205**(5): p. 597-605.
183. Davies, S., et al., *Identification of a novel mechanism of NF-kappaB inactivation by progesterone through progesterone receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells: induction of A20 and ABIN-2*. *Gynecol Oncol*, 2004. **94**(2): p. 463-70.
184. Wang, Y., et al., *Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(18): p. 5784-93.
185. Pijnenborg, J.M., et al., *TP53 overexpression in recurrent endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2006. **100**(2): p. 397-404.
186. Chen, F., V. Castranova, and X. Shi, *New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(2): p. 387-97.
187. Luo, A., et al., *Short hairpin RNA targeting c-FLIP sensitizes human cervical adenocarcinoma Hela cells to chemotherapy and radiotherapy*. *Cancer Lett*, 2008. **271**(2): p. 323-32.
188. Ahmed, K.M. and J.J. Li, *ATM-NF-kappaB connection as a target for tumor radiosensitization*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(4): p. 335-42.
189. Moreno-Bueno, G., et al., *Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer*. *Oncogene*, 2002. **21**(52): p. 7981-90.
190. Liu, Y., et al., *Clinical significance of CTNNB1 mutation and Wnt pathway activation in endometrioid endometrial carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(9).
191. Pijnenborg, J.M., et al., *APC, beta-catenin, and E-cadherin and the development of recurrent endometrial carcinoma*. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. **14**(5): p. 947-56.
192. Chen, H., Y. Wang, and F. Xue, *Expression and the clinical significance of Wnt10a and Wnt10b in endometrial cancer are associated with the Wnt/beta-catenin pathway*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(2): p. 507-14.
193. Woodward, W.A., et al., *WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(2): p. 618-23.

194. Katayama, R., et al., *Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 1): p. 23-8.
195. Ullenhag, G.J., et al., *Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(17): p. 5070-5.
196. Shimizu, S., et al., *Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2161-6.
197. Chargari, C., et al., *Understanding the functions of tumor stroma in resistance to ionizing radiation: emerging targets for pharmacological modulation*. Drug Resist Updat, 2013. **16**(1-2): p. 10-21.
198. Pijnenborg, J.M., et al., *Hypoxia contributes to development of recurrent endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(4): p. 897-904.
199. Semenza, G.L., *Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1*, in *Cancer Cell*. 2004: United States. p. 405-6.
200. Harada, H., et al., *Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance*. Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7508-16.
201. Mawji, I.A., et al., *Critical role for Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein in anoikis resistance and distant tumor formation*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 811-22.
202. Brown, J.M. and W.R. Wilson, *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 437-47.
203. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
204. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
205. Laughner, E., et al., *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3995-4004.
206. Lluís, J.M., et al., *Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- $\kappa$ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death*. Cancer Res, 2007. **67**(15): p. 7368-77.
207. Li, Z.W., et al., *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
208. Hu, Y., et al., *Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase*. Science, 1999. **284**(5412): p. 316-20.
209. Walmsley, S.R., et al., *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 105-15.
210. Mordmuller, B., et al., *Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism*. EMBO Rep, 2003. **4**(1): p. 82-7.
211. DeJardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 525-35.

## Bibliografia

212. Coope, H.J., et al., *CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52*. *Embo j*, 2002. **21**(20): p. 5375-85.
213. Nadiminty, N., et al., *Stat3 activation of NF-kappaB p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(19): p. 7264-9.
214. Gustin, J.A., et al., *Akt regulates basal and induced processing of NF-kappaB2 (p100) to p52*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(24): p. 16473-81.
215. Lee, S.M., et al., *Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells*. *Cancer Lett*, 2006. **242**(2): p. 231-8.
216. Noman, M.Z., et al., *The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis*. *J Immunol*, 2009. **182**(6): p. 3510-21.
217. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
218. Sun, S.C., et al., *Autoregulation of the NF-kappa B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(4): p. 1346-50.
219. Luo, J.L., et al., *Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin*. *Nature*, 2007. **446**(7136): p. 690-4.
220. Milano, A., R.V. Iaffaioli, and F. Caponigro, *The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours?* *Eur J Cancer*, 2007. **43**(7): p. 1125-33.
221. Pugh, T.J., et al., *Phase I trial of bortezomib and concurrent external beam radiation in patients with advanced solid malignancies*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010. **78**(2): p. 521-6.
222. Chapman, J.D., et al., *Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics*. *Radiat Res*, 1999. **151**(4): p. 433-41.
223. Karagiannis, T.C. and A. El-Osta, *The paradox of histone deacetylase inhibitor-mediated modulation of cellular responses to radiation*, in *Cell Cycle*. 2006: United States. p. 288-95.
224. Zhang, C., et al., *MicroRNA-221 and -222 regulate radiation sensitivity by targeting the PTEN pathway*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **80**(1): p. 240-8.
225. Liu, J., et al., *MicroRNA-21 is a novel promising target in cancer radiation therapy*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(5): p. 3975-9.
226. Belt, E.J., et al., *Expression of apoptosis regulating proteins identifies stage II and III colon cancer patients with high risk of recurrence*. *J Surg Oncol*, 2014. **109**(3): p. 255-65.
227. Hayashi, T., et al., *Cytoskeleton-associated protein 2 is a potential predictive marker for risk of early and extensive recurrence of hepatocellular carcinoma after operative resection*. *Surgery*, 2014. **155**(1): p. 114-23.
228. Gehrig, P.A., et al., *Estrogen receptor status, determined by immunohistochemistry, as a predictor of the recurrence of stage I endometrial carcinoma*, in *Cancer*. 1999, 1999 American Cancer Society.: United States. p. 2083-9.
229. Zeimet, A.G., et al., *LICAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation*, in *J Natl Cancer Inst*. 2013: United States. p. 1142-50.

230. Salvesen, H.B., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009: United States. p. 4834-9.
231. Wik, E., et al., *Endometrial Carcinoma Recurrence Score (ECARS) validates to identify aggressive disease and associates with markers of epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations*. *Gynecol Oncol*, 2014. **134**(3): p. 599-606.
232. Goksedef, B.P., et al., *Preoperative serum CA 125 level as a predictor for metastasis and survival in endometrioid endometrial cancer*. *J Obstet Gynaecol Can*, 2011. **33**(8): p. 844-50.
233. Brennan, D.J., et al., *Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer--a population based study*. *Gynecol Oncol*, 2014. **132**(1): p. 159-65.
234. Mussunoor, S. and G.I. Murray, *The role of annexins in tumour development and progression*. *J Pathol*, 2008. **216**(2): p. 131-40.
235. Cohen, S.J., et al., *Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(19): p. 3213-21.
236. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 781-91.
237. de Bono, J.S., et al., *Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 6302-9.
238. Chaudhary, P., et al., *Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(12): p. 2328-41.
239. Quddus, M.R., et al., *Minor serous and clear cell components adversely affect prognosis in "mixed-type" endometrial carcinomas: a clinicopathologic study of 36 stage-I cases*. *Reprod Sci*, 2010. **17**(7): p. 673-8.
240. Coenegrachts, L., et al., *Mutation profile and clinical outcome of mixed endometrioid-serous endometrial carcinomas are different from that of pure endometrioid or serous carcinomas*. *Virchows Arch*, 2015.
241. Gilks, C.B., E. Oliva, and R.A. Soslow, *Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 2013. **37**(6): p. 874-81.
242. Wei, J.J., A. Paintal, and P. Keh, *Histologic and immunohistochemical analyses of endometrial carcinomas: experiences from endometrial biopsies in 358 consultation cases*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(11): p. 1574-83.
243. Alkushi, A., et al., *Identification of prognostically relevant and reproducible subsets of endometrial adenocarcinoma based on clustering analysis of immunostaining data*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(11): p. 1156-65.
244. Reid-Nicholson, M., et al., *Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(8): p. 1091-100.
245. Alkushi, A., et al., *High-grade endometrial carcinoma: serous and grade 3 endometrioid carcinomas have different immunophenotypes and outcomes*. *Int J Gynecol Pathol*, 2010. **29**(4): p. 343-50.
246. Han, G., et al., *Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma*. *Mod Pathol*, 2013. **26**(12): p. 1594-604.
247. McConechy, M.K., et al., *Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas*. *J Pathol*, 2012. **228**(1): p. 20-30.

## Bibliografia

248. Fons, G., et al., *Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium*. J Clin Pathol, 2007. **60**(5): p. 500-3.
249. Dupont, J., et al., *Wilms Tumor Gene (WT1) and p53 expression in endometrial carcinomas: a study of 130 cases using a tissue microarray*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(2): p. 449-55.
250. Egan, J.A., et al., *Differential expression of WT1 and p53 in serous and endometrioid carcinomas of the endometrium*. Int J Gynecol Pathol, 2004. **23**(2): p. 119-22.
251. Chitale, D.A., et al., *Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray*. Mod Pathol, 2005. **18**(1): p. 119-26.
252. Stefansson, I.M., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3303-9.
253. Moreno-Bueno, G., et al., *Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 194-200.
254. Chan, Q.K., et al., *Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma*. J Mol Diagn, 2005. **7**(1): p. 8-16.
255. Dube, V., et al., *Verification of endometrial tissue biomarkers previously discovered using mass spectrometry-based proteomics by means of immunohistochemistry in a tissue microarray format*. J Proteome Res, 2007. **6**(7): p. 2648-55.