

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA
DIFERENCIAL EN EL CÀNCER
D'ENDOMETRI

Jesús Planagumà i Valls





Finançament del projecte de tesi:

Projectes FIS 99/0897 i FIS 02/0733 (Instituto Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo)

Beca BEFI 02/9366 (Instituto Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo)

Les imatges, figures, fotografies, esquemes, gràfiques i taules de la memòria han estat realitzades per: **Jesús Planagumà** utilitzant els softwares: Adobe Photoshop CS2[®], Macromedia FreeHand MX[®], Microsoft Office Visio 2003[®], Microsoft Office Excel 2003[®], SSPS 12.0[®] i la càmera digital Olympus Camedia C-5060[®], excepte les figures: 1) part dreta modificada de F. Goya; 3) modificada d'ADAM[®]; 4) part inferior modificada de F. Netter; 5b1) www.mimatrona.com; 5b2) d'O. Namy; 5b3) www.gdsb.org.cn; 6) modificat de SM. Schlossberg; 8) modificada de www.sego.es; 10) 4 imatges de www.udel.com; 11) part inferior modificada de F. Netter; 13) de P. Aeginetae; 15) imatge inferior modificada de D. Malore; 16) i 17) 13 imatges d'A.J. Fuller; 25) de L. Catusus; i 37) 4 imatges d'A. Gil-Moreno, així com les imatges de microscòpia fluorescent 38b) 55) i 56) de M. Valeri.

Obres dels separadors de secció, per ordre d'aparició: **Maurits Cornelis Escher** "Sky and Water I" (1938); *State Museum of Holland*; **Antoni Tàpies** "La grande table" (1982); *Museum of Modern Art, Linz*; **Leonardo da Vinci** "Illustrazione del feto nell'utero" (detall) (1492); *Royal library, Windsor Castle*; **Hieronymus van Aeken Bosch** "El Bosco" *The garden of delights (detall)* (1500); *Museo del Prado, Madrid*; **Jan Vermeer** "La lattaia" (detall) (1658); *Rijksmuseum, Amsterdam*; **Salvador Dalí** "Femmes dans les vagues" (detall) (1969); *Teatre-Museu Dalí, Figueres*; **Rembrandt Harmenszoon van Rijn** "The anatomy Lesson of Dr. Nicolaes Tulp", (1632) *Mauritshuis Museum, La Haya*; **Vilhelm Hammershoi** "Dust motes dancing in the sunlight" (1900); *Ordrupgaard Collection, Copenhagen*; **Pavli Aeginetae** "Epitomae medicae libri septem" (detall) (S. XI); traducció al llatí del llibre *Epitomes iatrikes biblio hepta*, *Biblioteca di Modena*; **Ramon Casas** "Plen air" (1890) *Museu d'Art Modern (MNAC), Barcelona*; **Sir Lawrence Alma-Tadema** "Expectations" (1885) *col·lecció particular*

Imatge de la coberta: modificada de **Marek Denko**; "Female anatomic study" (2004)

Imatge de la contracoberta: modificada de **Jaume Vilanova**; "Estudi a llapis de moviment" (2002)

Tipografies utilitzades: Perpetua[©], Romantic[©], Times New Roman[©], Symbol[©], Felix Titling[©], Aircut[©] i Arial[©] (per a les figures)

Disseny de la coberta, grafisme i maquetació: **Jesús Planagumà**
darksilhouettes@gmail.com

ANÀLISI DE L' EXPRESSIÓ GÈNICA DIFERENCIAL EN EL CÀNCER D' ENDOMETRI

Memòria presentada per
Jesús Planagumà i Valls

per optar al grau de
Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi doctoral realitzada a la Unitat de Recerca Biomèdica, de l'Hospital Maternoinfantil de la Vall d'Hebron, Fundació Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, sota la direcció del Dr. Jaume Reventós i Puigjaner, el Dr Francesc Alameda i Quitllet i el Dr. Timothy Thomson Okatzu.

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el programa de doctorat de Bioquímica i Biologia Molecular, bienni (1999/2001)

Tutor: Dr. Josep Antoni Biosca i Vaqué

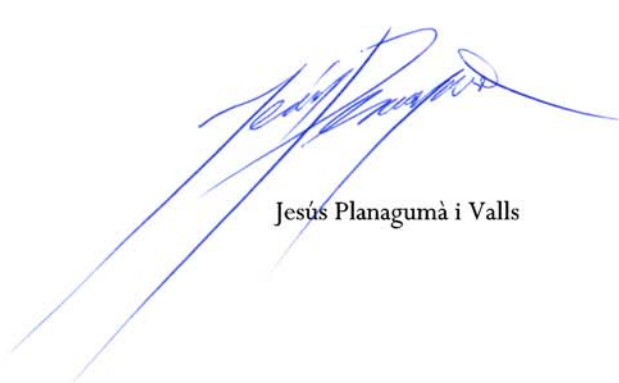
Barcelona, Desembre de 2005



Dr. Jaume Reventós i Puigjaner

Dr. Francesc Alameda i Quitllet

Dr. Timothy Thomson Okatzu



Jesús Planagumà i Valls

Un dels llibres que més vegades he llegit, en el trajecte de casa a l'hospital, ha estat, sens dubte, la trilogia "El Senyor dels Anells". JRR. Tolkien relata la gesta d'un viatge iniciàtic, ambientat en un món èpic i màgic, com a resultat del qual, els protagonistes, creixen i són transformats. En arribar a aquest punt de la tesi se m'ha fet evident aquesta idea. Des de l'inici fins ara, he viscut històries, anècdotes, moments d'incertesa, moments d'esperança, moments d'èxit, algun que altre revés, moments d'alegria, moments d'il·lusió. Malgrat tot, al llarg d'aquest temps, el que n'he après és que he après.

Es per això que voldria donar les gràcies a totes aquelles persones que d'una manera o altre m'han ajudat i donat suport durant el transcurs d'aquests anys.

En primer lloc als de casa, sense el recolzament dels quals res de tot això s'hagués pogut portar endavant. Especialment als meus germans i amics Jordi i Marc "Dj Kram" (*nois si ens ho proposem tots tres junts podem fer grans coses*). Als meus pares Jordi i Carme i a les meves àvies, l'Àvia Dolors d'Olot, l'Àvia Paquita i a tu Àvia Dolors de Canet *-com van les potinguetes? sempre em deies; no he arribat a temps de poder-te-les ensenyar àvia, però crec que t'haguessin agradat*. Als meus tiets i cosins.

En segon lloc, també m'agradaria fer extensiu el meu reconeixement i agraïments, a escala acadèmic-humana. A tu Jaume, per haver-me fet un lloc en el teu laboratori i considerar-me un dels teus. Gràcies també per haver-me deixat tirar endavant el teu projecte d'endometri durant aquest anys, així com, per proporcionar-me les eines i el mitjans necessaris que m'han permès realitzar aquesta tesi.

A tu Francesc, gràcies per haver-me obert les portes de l'Hospital del Mar, així com a nous coneixements, noves tècniques i haver-me ensenyat tot el que se de patologia. La teva col·laboració ha estat de grandíssim valor pel desenvolupament d'aquesta tesi.

A en Timothy per la teva intervenció en la part inicial del projecte de tesi i per les teves idees, anàlisis i consells.

A l'Antonio Gil, peça clau del projecte, per haver compartit amb mi el teu saber en el camp de ginecologia oncològica, per haver permès acompanyar-te en les teves intervencions a quiròfan, i per haver estat sempre allí disposat a donar-me un cop de mà en tot moment.

A en Jordi Xercavins, a en Miguel Abal, així com a la Fundació Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron i a l'Instituto Carlos III. També a en Josep Antoni Biosca, que de manera desinteressada, has estat el meu enllaç amb l'Autònoma.

Aquest camí, però, no m'ha tocat recorre'l sol sinó que, afortunadament, he comptat amb el suport de molts companys que han estat al meu costat fent-me gaudir d'aquest viatge.

Un d'aquests últims dies a la planta 14 algú va dir: *- Ostres! la Marta i en Jesús, com no, inseparables!*. Tenia raó, tants anys, mesos i dies compartint el temps que se'ns havia donat, han creat un lligam difícil de trencar. Que dir de la Musa Preraphaelita de cabells vermells, comprensiva, amable, temperamental, divertida, senzilla, tímida, però desprenent humanitat per tot costats. Per això deixa'm dir-te gràcies Marta, "Martuxi", "Truxi", "Valery Gallery", "Xester-Xeto", "Xufi" has estat essencial per fer rodar els engranatges que m'han portat fins aquí. Gràcies també als teus (Nil, Isaac i Joan).

A tu Joan Carles "JC". Des què els nostres camins es varen creuar i malgrat les teves anades i vingudes per mig món sempre has estat aquí, molt proper, per donar-me el teu consell. Gràcies per totes les vivències que hem compartit plegats, i per com m'ho he passat de bé.

A tu Carmen, “*Karmele*”, “*Morti*”, “*My Beauty in Darkness*”, per fer-me tocar de peus a terra mentre somniàvem. Gràcies Carmen, pel teu encant, pel teu bon humor, per la teva companyia, pels teus ànims i per mostrar-me el teu món, *J'ai appris plus avec toi qu'avec mille livres*. Una abraçada molt forta.

Als meus companys i amics del laboratori; A tu Albert, per haver-me ajudat en la realització d'aquesta tesi, per haver aportat els teus coneixements lingüístics, per haver-me donat la teva visió crítica. Gràcies “*Symphonaire Albertus*”, “*Mestre Xiferito*”, “*Artesà de la immuno*” pel teu suport i per compartir amb mi realitats totalment invisibles per a molts. A tu Pep i als teus (Ariadna i Clara) per haver estat sempre disposat a ajudar, amb tu era una tranquil·litat estar al laboratori, i per fer-me passar molt bones estones tot fent el virtual i comentant els diferents protocols d'actualitat, anant a córrer fins a la barra de ferro, anant d'excursió per la muntanya o anant de sopars a Can Toni Gros. A en Jordi Guallart, què passa *Completo Harry?* Company infatigable amb el que he compartit colze a colze hores de feina al laboratori, a més d'una molt bona amistat que en ha portat a conquerir alguns dels pics més majestuosos del Pirineu català. Gràcies per la teva vitalitat i coratge i el teu sentit de l'humor. A l'Alba, no fa pas massa podia llegir a l'inici de la teva tesi, referint-te a mi, les paraules “*Amigo mio*” deixa'm que et respongui; gràcies “*Amiga mia*” per la teva estimació, el teu temperament i la teva força de voluntat.

Un record especial als coetanis de la planta 14 amb els quals he compartit el dia a dia i alguna cosa més; a tu Tomàs; “*Professor Gasenga*”, “*Mestre del doble híbrid*”, “*expert del cel·luloide*”, deixo el meu troçet de laboratori en bones mans (*que la força dels cavallers Jedi t'acompanyi*), a tu Mariano, com deia en Pep; “*Che de Bifurca*”, rei indiscutible dels *westerns* i la conya, ja n'hem arribat a fer de bestieses, (*que la llum de Eärendil et guii en hores fosques*), a tu Cristina Areste, el temps de mica en mica ens ha anat apropant, per la teva amabilitat, pel discret encant que apuntava en Joan en la seva brillant tesi i per aquell punt gòtic que em recorda a la germana petita d'en *Sandman (Sleep is the brother of Death)*, a tu Olga, per la teva dedicació i constància, *-molts ànims amb la tesi!*, a en Toni pel teu interès i a la Pili, per les primeres paraules, *-ànims també amb la tesi*. Un altre record pels coetanis de les altres plantes; per en Ricardo, hem anat a la part, varem començar junts i acabem junts, gràcies pels consells i per les teves animacions, a en Haffit, l'Israel, a l'Ester i a la Roser.

Un petit espai és per en Javier de la Torre, com tu deies “*mi amigo en el exilio*”, gràcies per llençar-me un cable quan l'he necessitat, per la teva amabilitat, per tenir-me en compte i per veure les coses tant clares. I com no per la Maria, per tants moments compartits, per la teva energia, per les teves ganes de fer coses, per la teva il·lusió i per la teva alegria.

Un record també per als antics companys; l'Àlex Benavidez, quants records i historietes passades, gràcies pel teu suport tècnic, pels teus consells pràctics i pel teu efecte, a la Patri i a l'Adri per la dolça simpatia personificada, l'entusiasme, la naturalitat i la vitalitat, l'Andreu “*el Caçador de Baobabs*”, quin gourmet tant excel·lent, Michael i Sara (*Hej hvordan går det!*), Nour i Marta, Victor “*el Mestre*”, Javi “*el Senyor de la Katana*”, Anna Menoyo, Joan Isern “*la bondat i el saber*”, Arnau, Tofol, Johi, per la complicitat i el recolzament, Vane, Marta Chao, Mónica Àvila, Aguililla, Àngel “*en Carpaman*”, Anna fortuný, Anna Santamaria, Anna llort, Maite, Oscar, David, Lluís, Marta Amat, Meritxell Guitart, Laurília, Deborah, David de Salamanca, Mauri, Marisa, Barbara, Gerard, Marta C., Juani, Paula, Vanessa, Raquel i Lidia.

I per als nous; Marta Monge, *-m'alegra que continuís el projecte d'endometri, ànims i molta sort!*, Sara “*l'Arquera de Lorien*”, gràcies pel teu inestimable ajut i eficàcia, Valentí, per contribuir a enriquir la tribu urbana de la planta, *salut!*, Ester Saus, per l'humor i l'entusiasme, *-que la sort et somrigui!*, Tonia “*l'Al·lota*”, Ramon, Jesús, Javi, Marta Tech, Sandra, Eli, Jordi, Laia, Marina i Andreas. I els del 2; Guillermo “*el freestyler de la 14*”, Neus, Marta i Gloria.

A l'*Staff* de la planta; Francina, Rosanna, Maite, M^a Antonia, Anna, Maia, Joan i M^a Carmen. I al personal de la casa; Nuria Prim, Fredi i la gent d'anatomia patològica, Laura Casado, Biki, Olga, Isabel, Maruja, Sílvia, Antonio, Paco, la Senyora Maria, la Diana, l'Anna Maria i la Susanna. També per les col·laboracions amb a l'Àngel Corbí, l'Anne Chotteau-Lelièvre i en Pere Feliu.

També als membres de la UCTS; a tu Paqui, "*capitana absoluta de la Real Time*", va ser una joia treballar al teu costat, gràcies per la teva alegria innata i per fer-me un raconet en el teu laboratori, a la Maria Angeles per l'ajuda, els ànims, i les rialles, a la Fatima i a l'Àlex.

A vosaltres Sole i Pepe per ensenyar-me que hi havia més amunt de la planta 5 de l'hospital Maternoinfantil i a la Carme per la teva simpatia i per fer que no fossin tants feixugues les estades a la planta, - *el mon dona moltes voltes, i ens hem acabat trobant tots aquí*. Gràcies Sole per invertir hores i hores compartint els teus coneixement de *microarrays*.

No voldria deixar de citar a l'apreciat grup de l'Hospital del Mar, la meva segona llar; A tu Teresa, "*mestressa de la immuno*", per la teva alegria, pel teu ajut, pels teus consells i per posar-m'ho tot tant fàcil, a la Pilar, a la Mercè, a la Jordina, a la Fani, a l'Ester, a la Mar, a la Maria, a la Pepi, a la Dra. Mariñoso, al Dr. Coromines, i al Dr. Lloreta, a tots vosaltres per integrar-me com a un més i fer-me sentir com si fos a casa.

Un apartat especial el dedico a la Cari i la Gemma amb als teus (Marta, Bernat i Àngel), companyes incansables del cafè matinal a la cruïlla Bruc-Aragó, gràcies per la companyia, per el sentit de l'humor, per al petit respir que permet afrontar la jornada laboral amb ànims. Un agraïment també per a la Neus, la Gloria i la M^a Àngels.

En la meva etapa universitària he tingut la sort de poder gaudir de les dues universitats tant de la Central (la UB), durant la carrera, com de l'Autònoma (la UAB) durant el doctorat. Es per aquest motiu que també m'agradaria tenir un record per a la gent de la facultat i del doctorat, molt especialment a en Jordi Torras. Des què ens varem conèixer a primer no hem deixat d'estar en contacte, primer amb l'intercanvi de cassets, que ha evolucionat al de DVDs carregats d'mp3sos. I ara amb els concerts i les fabuloses rutes musico-gastronòmiques. Gràcies per la generositat, la paciència, la predisposició, els coneixements i els teu gustos exquisits, elements amb els quals, de mica en mica, s'ha anat forjant una gran amistat i com no pel *Dark Folk!*. No em voldria deixar a en Miquel Ramon, "*company inseparable de Bioquímica*", a en Víctor d'Eivissa, a l'Anna Planagumà, a la Rut Vila, a la Gisela, a la Cristina, a en Lluís Riera, a la Marta, a la Charo, a la Rosa, a l'Alba, a l'Àlex "*l'altre JASP*", a la Mamen, a en Jordi Barretina, a la Lourdes. a la Noemi, en Pep, en Gerard, en Gabriel Pons i l'Eric Martz.

Un agraïment molt especial a la gent d'Olot en primer lloc a tu Jaume Vilanova, amic incondicional, entranyable company de batalles i aventures, pel teu caràcter, la teva perseverança, la teva manera de fer, la teva generositat, i sobretot, per obrir-me una finestra al teu univers a través de l'art amb el qual omple de color la grisor dels temps que corren. *Nai tiruvantel ar varyuvantel i Valar tielyanna nu vil*. I a tu Kuru, però si gairebé som de la mateixa família, entre sardanes, les acampades, Tregurà, i els *Wekes*. Gràcies per la teva bona fe, la teva simpatia, la teva ironia, i pel teu caràcter obert i extrovertit. I ,com no, agrair als *Wekes* haver-me fet sentir part vostre (per ordre alfabètic) Albert, Ari, Borja, Carla, Carme, Coll, Dorca, Golet "*Sid Popypunk*", Laura, Lluís, Jota, Miquel, Mixa, Page "*Up The Irons*", Sílvia, Sita i Xumi, així com a l'Oriol, l'Aura, la Nuri, l'Emma i a l'Eric.

Parlant de gent d'Olot, no em podia deixar a la gran família de sardanes. 14 anys ballant sardanes a *Flor de Fajol* en son uns quants, que quan et pares a pensar, te'n adones que t'han deixat empremta. Es per això que us voldria agrair haver compartit tot aquest temps amb vosaltres. A

l'Àlex Banús, per tants bons moments que m'has fet passar, a en Suqui i l'Isa, per les pujades al Bastiments i al Balandrau, els tiberis al Palau i als Hostalets i per la bona companyia, a en Ricard, a la Marta Sala - *espero que siguis molt feliç* i l'Albert, a en Pol i l'Anna, a en Jordi Sala, a l'Elisabet, a la Gemma Barnó, a l'Anna Mayola, a en David Avila, a en Jordi Ferrer, a la Laura Pallars, a la Francesca i a l'Anna Muntada. També m'agradaria donar les gràcies a la colla dels mitjans, a l'Enric Urenya, a en Francesc Ribes i la Joana, a la Laura Mir, a en David Mir, a l'Aulines, a en Meison "*Spidermaison*", a l'Anna Vegas, a l'Isaac, a la Sílvia i a la Laura Darné a l'Irene i a la Sílvia Parerols, així com als Sala-Codina, Coromines-Cordomí, Sala-Reixach i Vegas-Cererols.

Un apunt també per en David del Museu i en Lluís Sacrest, per permetre que l'exposició Vallsquer fos tot un èxit i a la M^a Àngels, per interessar-te pels meus progressos, a en Guillem Matilló, per les excursions amb l'Alex, pels concerts d'*undreground* metàl·lic i per les fabuloses converses d'*avangarde-black-prog-folk-metal*, a la Lisa, a en Turu i en Rafel "*els cop de clown*", a en Ricardo i la Carme i als Victori.

Fent ara menció a la ciutat que conjuntament amb Olot m'han vist créixer, no voldria deixar de citar a la gent de Mataró. Especialment a tu Lluís Renter i al teus (Carlota, Pol i Sandra), el caràcter, el bon humor, el temperament, la conya, el saber, la ironia, el coneixement, expert en les arts de la filosofia, la història, la metafísica i la música; has estat el meu primer gran mestre i un dels meus més apreciats amics. A tu Antònia, ets pur talent, es sensacional sentir com fas emergir notes del violí amb una gràcia sorprenent. Gràcies per haver compartit amb mi hores intentant, patosament, imitar-te, pel teu afecte i per tenir-me sempre present i també a la Maria *2d'arc*. A tu Enric "*el viatger indomable*" que després de tants anys ens hem retrobat. Tenim pendent augmentar una mica més la nostra cultura gastronòmica, a en Xevi, a en Francesc, a en Roger Estrany amb els teus pensament i reflexions, a la Cristina i la Marta Armengol, a l'Albert Garcia i en Rodri, i com no, a en Beas i en Roca.

També voldria mencionar a la Meritxell Passoles, pel discret somriure i el teu agradable saber estar, a la Paula, als companys d'anglès, la Raquel, la Núria i en David, també a en Toni Lirio i a CREA per als coneixement gràfics de valuosíssima utilitat que m'heu aportat.

En últim terme voldria agrair i alhora demanar disculpes a totes les persones que pugui haver oblidat i una vegada més, repetir a tots vosaltres, gràcies.

Finalment, a nota de cloenda també m'agradaria, encara que fos de manera simbòlica, agrair a: *Katatonía, Dark Tranquillity, My Dying Bride, Anathema, Agalloch, Empyrium, Explosions In The Sky, The Gathering, Elend, Ataraxia, Sopor Aeternus* o els mateixos *Dead Can Dance*, entre moltíssims altres, a tota l'escena *Heavy, Doom, Black i Death Metal*, a l'escena *Gothic, Electro i Dark Folk*, així com la *Indie, Post-Rock i Progresiva*, que m'han fet somniar despert cada matí al connectar-me els auriculars per anar a l'hospital, i en aquest darrers temps, en les meves hores de reclusió tot escrivint la tesi. I a en Tim Burton i els germans Grangel, que amb *Corpse Bride* us heu més que superat, quina meravella!.

"Oozed in a thousand atoms of atmospheric dust, we are the apotheosis of light"
(Francesca Nicoli)

“Certament tot plaer és un bé per la seva conformitat amb la naturalesa i, no obstant això, no tot plaer és elegible; així com tot dolor és un mal, però no sempre tot dolor ha d’evitar-se. Convé jutjar-ho amb el càlcul i la consideració del que és útil i del que és inconvenient, perquè en algunes circumstàncies ens servim del bé com d’un mal i, viceversa, del mal com d’un bé.”

EPICUR (341-270 aC), *Carta a Meneceu*

A la memòria de meu avi

Maurici VALLSQUER

Pintor i Pessebrista (1904-1992)

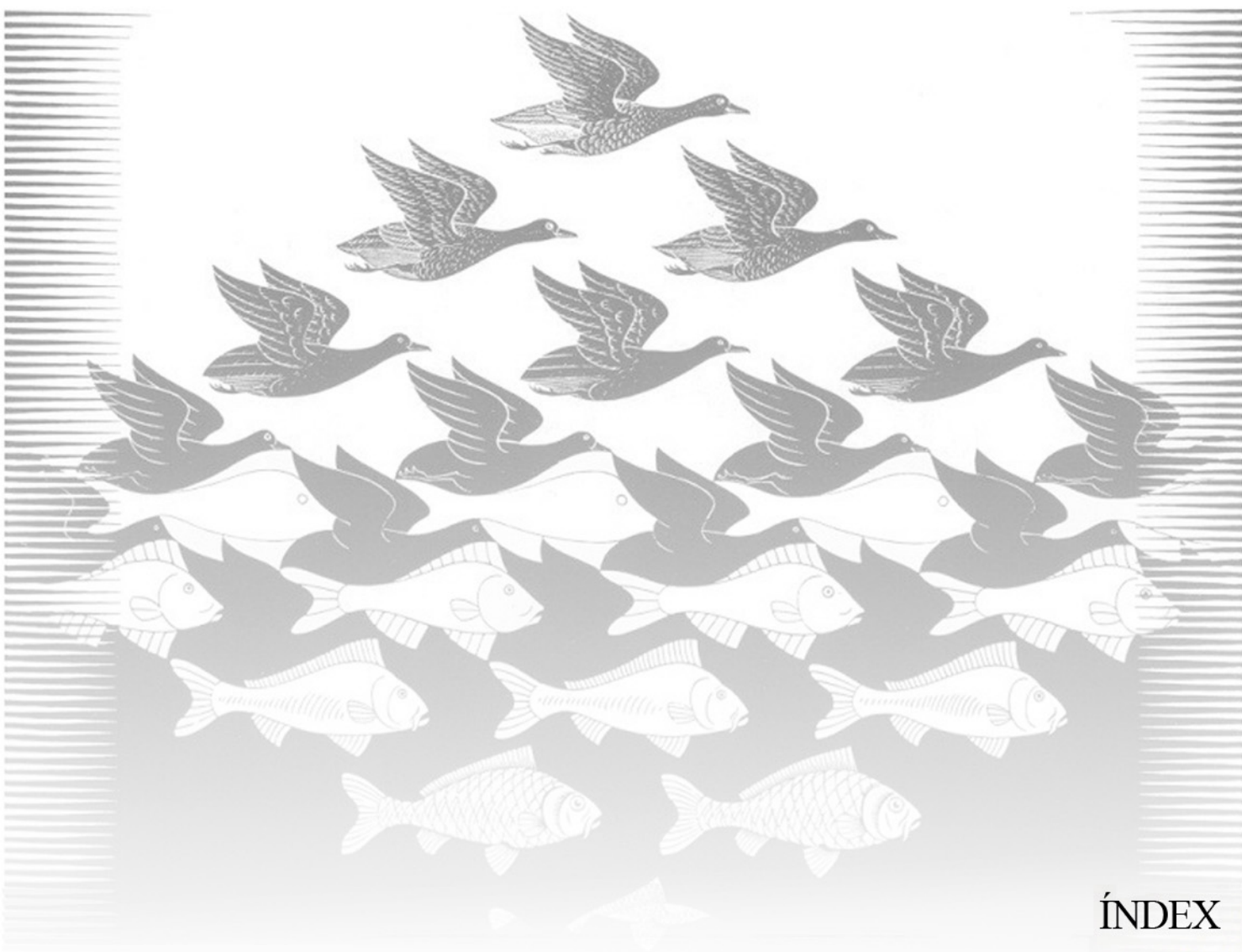


Maurici Vallsquer “Neu a la Vila” (1975); oli sobre fusta, col·lecció particular

A la memòria de meu avi
Joaquim PLANAGUMÀ
(1917-1981)



Joaquim Planagumà "paisatge Olotí" (1939) oli sobre tela, col·lecció particular



ÍNDICE

ÍNDEX

<i>ÍNDEX DE FIGURES</i>	11
<i>ÍNDEX DE TAULES</i>	15
<i>ABREVIATURES</i>	17
INTRODUCCIÓ	27
1. Aparell reproductor femení	29
1.1. Composició de l'aparell reproductor femení	30
1.1.1. Òrgans genitals femenins interns	30
1.1.2. Òrgans genitals femenins externs	32
1.2. Fisiologia de l'aparell reproductor femení	33
1.2.1. La gametogènesi femenina	33
1.2.2. El cicle menstrual	34
1.2.3. La fecundació	36
1.2.4. Desenvolupament embrionari	38
1.2.5. El part	39
1.2.6. La menopausa	39
1.3. Regulació de l'aparell reproductor femení	39
1.3.1.1. Les hormones esteroïdals	41
2. Endometri: anatomia, morfologia i funció	42
2.1. L'úter: òrgan genital femení	42
2.2. Endometri: morfologia i histologia	43
2.2.1. Endometri proliferatiu	44
2.2.2. Endometri secretor	44
2.2.3. Endometri en la fase descamativa	45
2.2.4. Endometri gestacional	45
2.2.5. Endometri atròfic	45
2.3. Cicle endometrial: funció, fases i regulació	47
3. Carcinoma endometrial	49
3.1. Epidemiologia i patogènesi	50
3.2. Etiologia i aspectes genètics	51
3.2.1. Factors de risc	52
3.2.1.1. Factors relacionats amb un elevat índex de massa corporal IMC	52

3.2.1.2. Factors reproductius i de contracepció	52
3.2.1.3. Factors relacionats amb la teràpia hormonal	52
3.2.2. Factors hereditaris	53
3.3. Història natural del carcinoma d'endometri	53
3.3.1. Lesions precursors (hiperplàsies endometrials)	54
3.3.1.1. Hiperplàsia simple (HS)	54
3.3.1.2. Hiperplàsia complexa (HC)	55
3.3.1.3. Hiperplàsia amb presència d'atípies	55
3.4. Presentació clínica i diagnòstic	57
3.4.1. Presentació clínica	57
3.4.2. Tècniques de diagnòstic emprades per a la detecció del carcinoma endometrial	58
2.4.2.1. Citologia cervical	58
2.4.2.2. Avaluació de l'endometri per ultrasons	58
2.4.2.3. Biòpsia endometrial	58
2.4.2.4. Histeroscòpia	59
2.4.2.5. Altres tècniques de diagnòstic	59
3.5. Anatomia patològica del carcinoma endometrial	59
3.5.1. Característiques macroscòpiques generals del carcinoma d'endometri	59
3.5.2. Progressió del càncer endometrial	60
3.5.3. Classificació del carcinoma endometrial	60
3.5.3.1. Classificació del carcinoma endometrial segons la dependència hormonal	60
3.5.3.2. Classificació del carcinoma endometrial segons el tipus histològic	61
3.5.4. Carcinoma endometriode	64
2.5.4.1. Carcinoma endometriode típic	65
2.5.4.2. Carcinoma endometriode amb diferenciació escamosa	66
2.5.4.3. Carcinoma endometriode secretor	66
2.5.4.4. Carcinoma endometriode villoglandular	66
2.5.4.5. Carcinoma endometriode amb cèl·lules ciliades	67
4. Bases moleculars del carcinoma endometrial	67
4.1. Model dualístic de carcinogènesi endometrial	67
4.2. Alteracions moleculars en l'EEC (Via genètica de l'MSI)	69
4.2.1. Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)	69
4.2.2. Inactivació del supressor tumoral PTEN	70
4.2.3. Mutacions en el protooncogen <i>K-ras</i>	71
4.2.4. Mutacions en el gen de la β -catenina	72

4.2.5. Desbalanceig hormonal d'esteroides	73
4.2.5.1. Alteració del gen de l'ER	73
4.2.5.2. Alteració del gen del PR	74
4.2.6. Model de progressió del carcinoma endometrioides	74
4.3. Alteracions moleculars en el NEEC (Via genètica de la CIN)	75
4.3.1. Mutacions en el supressor tumoral p53	75
4.3.2. Inactivació del supressor tumoral p16 ^{INK4a}	76
4.3.3. Inactivació del gen de l'E-cadherina	77
4.3.4. Amplificació del protooncogen HER2/neu	77
4.3.5. Model de progressió del carcinoma serós	78
4.4. Altres alteracions moleculars	79
4.4.1. Pèrdua d'heterozigositat (LOH)	79
4.4.2. Pèrdua d'expressió de p27 ^{KIP1}	80
4.4.3. Pèrdua d'expressió de p21 ^{WAF1/CIP1}	81
4.4.4. Pèrdua de funció de les molècules de control apoptòtic Bcl-2 i BAX	81
4.5. Dubtes del model dualístic, barreja d'EEC i NEEC	81
5. Factors pronòstic del carcinoma endometrial	82
5.1. Factors de primera generació	83
5.1.1. Estadiatge F.I.G.O.	83
5.1.2. Grau histològic	85
5.1.3. Profunditat d'invasió miometrial	87
5.1.4. Afectació ganglionar	87
5.1.5. Invasió de l'espai limfovascular	87
5.1.6. Tipus histològic	88
5.1.7. Edat	88
5.2. Factors de segona generació	88
5.2.1. Receptors hormonaals d'estrògens i progesterona	89
5.2.2. Ploidia del DNA	89
5.2.3. Marcadors de proliferació	90
5.2.4. Els protooncògens HER-2/neu, K-ras i Bcl-2 com a factors pronòstic	91
5.2.5. Els supressors tumorals PTEN, p53, p21 ^{WAF1/CIP1} i p16 ^{INK4a} com a factors pronòstic	92
5.2.6. Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) en la prognosi endometrial	95
5.2.7. β -catenina com a factor pronòstic	96
5.2.8. Angiogènesi associada a tumor en la prognosi endometrial	97

6. Sumari i aspectes futurs	96
OBJECTIUS	99
7. Objectiu general	101
7.1. Objectiu desglossat	102
MATERIAL I MÈTODES	103
8. Mostreig	105
8.1. Pacients a estudi	105
8.2. Tipus de mostra i recollida	105
8.2.1. Mostres tumorals	105
8.2.2. Mostres control	106
8.3. Processament de les mostres	106
8.3.1. Establiment de cultius primaris d'endometri proliferatiu	106
8.3.2. Extracció d'RNA total	107
8.3.3. Anàlisi d'integritat de l'RNA total	107
8.3.4. Purificació de l'mRNA	108
8.3.5. Anàlisi de Northern Blot	108
9. Anàlisi de l'expressió gènica diferencial en <i>microarrays</i> de cDNA	108
9.1. Preparació de les mostres	109
9.2. Prehibridació dels filtres	110
9.3. Preparació de la sonda experimental i del control	110
9.4. Quantificació de les sondes	111
9.5. Hibridació al filtre i rentats	111
9.6. Exposició dels filtres	111
9.7. Obtenció de les dades	112
9.8. Anàlisi de les dades	112
9.9. <i>Cluster</i> jeràrquic	113
10. Confirmació de l'expressió gènica diferencial per la tècnica de la PCR a temps real (RT-Q-PCR)	113
10.1. Mostres	115
10.2. Obtenció del cDNA per retrotranscripció	115
10.3. Oligonucleòtids i les sondes TaqMan®	116
10.4. Protocol d'amplificació de la PCR a temps real	118

10.5. Ajustament i normalització de la PCR a temps real	119
10.6. Anàlisi de les dades	119
11. Anàlisi de l'expressió diferencial proteica per la tècnica de <i>western blot</i>	119
11.1. Mostres	119
11.2. Assaig de <i>western blot</i>	120
11.3. Anàlisi de les dades	121
12. Anàlisi d'expressió diferencial proteica en <i>arrays</i> de teixit	121
12.1. Disseny dels <i>arrays</i> de teixit	122
12.2. Selecció de mostres	123
12.3. Disposició en matriu de les mostres	124
12.4. Tallat de l' <i>array</i>	124
12.5. Tinció immunohistoquímica	125
12.6. Valoració	126
12.7. Captació de les imatges	127
12.8. Anàlisi de les dades	127
13. Construccions, clonatge i transfecció a la línia cel·lular HEC-IA	127
13.1. Construccions originals	127
13.2. Clonatge de RUNX1/AML1 i ETV5/ERM	128
13.3. Disseny de la construcció de RUNX1/AML1	129
13.4. Construccions amb la proteïna verda fluorescent (GFP)	130
13.5. Transfecció transitòria en la línia HEC-IA	131
13.6. Visualització de la transfecció a la línia HEC-IA	132
13.7. Assajos sobre la línia transfectada HEC-IA	132
14. Estudi de possibles mecanismes d'acció de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en el carcinoma endometrial	132
14.1. Estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica i proteica de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM	132
14.2. Estudi de dianes de regulació de RUNX1/AML1	133
14.2.1. $p21^{WAF1/CIP1}$ diàna de regulació de RUNX1/AML1	133
14.2.2. Anàlisi del perfil d'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC	133
14.2.3. Anàlisi del perfil d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC	133
14.2.3.1. Assaig de <i>western blot</i> per a $p21^{WAF1/CIP1}$	134
14.2.3.2. Assaig immunohistoquímic de $p21^{WAF1/CIP1}$ en <i>arrays</i> de teixit	134
14.2.4. Anàlisi estadístic de correlació de $p21^{WAF1/CIP1}$, RUNX1/AML1 i ETV5/ERM	134

RESULTATS	135
15. Estudi de l'expressió diferencial en <i>microarrays</i> de cDNA	137
15.1. Obtenció del panell de mostres	137
15.1.1. Comprovació anatomopatològica de les mostres tumorals	138
15.1.2. Obtenció i verificació de les mostres control	139
15.1.2.1. Obtenció i verificació de les mostres d'endometri normal atròfic	139
15.1.2.2. Verificació del cultiu primari d'endometri normal proliferatiu	139
15.2. Resultat de les hibridacions dels <i>microarrays</i> de cDNA	140
15.2.1. Imatges dels filtres	141
15.3. Tractament bioinformàtic	142
15.3.1. Anàlisi computacional dels filtres	142
15.3.2. Anàlisi computacional de les dades	143
15.3.2.1. Premisses de l'anàlisi:	143
15.3.2.2. Criteris d'anàlisi	144
15.3.2.3. Taula d'anàlisi	144
15.3.3. Anàlisi de distribució jeràrquica dels elements	145
15.3.4. Cerca de gens amb expressió diferencial	145
15.4. Anàlisi dels resultats dels <i>microarrays</i> de cDNA	147
15.4.1. Diagrama colorimètric	147
15.4.2. Agrupació per mostres	150
15.4.3. Agrupació per gens	150
15.4.4. Anàlisi dels elements amb expressió diferencial	151
16. Validació de l'expressió diferencial per PCR a temps real	153
16.1. Obtenció del panell de mostres	154
16.2. Resultats d'expressió gènica de RUNX1/AML1 per PCR a temps real	155
16.2.1. Anàlisi dels perfils d'expressió de RUNX1/AML1	155
16.2.2. Anàlisi estadística dels perfils d'expressió de RUNX1/AML1	157
16.3. Resultats d'expressió gènica d'ETV5/ERM per PCR a temps real	157
16.3.1. Anàlisi dels perfils d'expressió d'ETV5/ERM	157
16.3.2. Anàlisi estadística dels perfils d'expressió d'ETV5/ERM	159
17. Estudi de l'expressió diferencial proteica per <i>western blot</i>	160
17.1. Obtenció del panell de mostres	160
17.2. Resultats d'expressió proteica de RUNX1/AML1 per <i>western blot</i>	161

17.3. Resultats d'expressió proteica d'ETV5/ERM per <i>western blot</i>	162
18. Estudi de l'expressió diferencial proteica en <i>arrays</i> de teixit	163
18.1. Obtenció dels repertoris d' <i>arrays</i> de teixit	163
18.2. Resultats d'expressió proteica de RUNX1/AML1 en <i>arrays</i> de teixit	164
18.3. Resultats d'expressió proteica d'ETV5/ERM en <i>arrays</i> de teixit	167
19. Estudi d'expressió <i>in vitro</i> dels gens seleccionats	169
19.1. Resultats de les construccions de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ETV5/ERM</i> amb la GFP	170
19.2. Resultats de les transfeccions en la línia HEC-IA	170
19.2.1. Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió transfectades	171
19.2.1.1. Localització subcel·lular de la GFP- <i>RUNX1/AML1</i>	171
19.2.1.2. Localització subcel·lular de la GFP- <i>ETV5/ERM</i>	171
19.2.2. Resultats de col·localització de les línies HEC-IA transfectades	172
20. Anàlisi de possibles mecanismes d'acció de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en el carcinoma endometrial	174
20.1. Resultats de l'estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica i proteica de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM	174
20.1.1. Resultats de l'estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica	174
20.1.2. Resultats de l'estudi de correlació dels perfils d'expressió proteica	175
20.2. Estudi de la diana de regulació de RUNX1/AML1: <i>p21^{WAF1/CIP1}</i>	175
20.2.1. Resultats del perfil d'expressió gènica de <i>p21^{WAF1/CIP1}</i> en l'EEC	176
20.2.2. Resultats del perfil d'expressió proteica de <i>p21^{WAF1/CIP1}</i> en l'EEC	177
20.2.3. Resultats de la correlació estadística de <i>p21^{WAF1/CIP1}</i> , <i>RUNX1/AML1</i> i <i>ETV5/ERM</i>	179
20.2.3.1. Resultats de correlació en els perfils d'expressió gènica	179
20.2.3.2. Resultats de correlació en els perfils d'expressió proteica	181
DISCUSSIÓ	183
21. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica diferencial obtinguts per <i>microarrays</i> de cDNA en l'EEC	185
22. <i>RUNX1/AML1</i> gen sobreexpressat en l'EEC	189
22.1. El gen <i>RUNX1/AML1</i>	189
22.2. Estructura genòmica de <i>RUNX1/AML1</i>	190
22.3. Localització i funció del gen <i>RUNX1/AML1</i>	191
22.4. Alteracions de RUNX1/AML1 i càncer	191

23. <i>ETV5/ERM</i> , gen sobreexpressat en l'EEC	193
23.1. El gen <i>ETV5/ERM</i>	193
23.2. Estructura genòmica d' <i>ETV5/ERM</i>	193
23.3. Localització i funció del gen <i>ETV5/ERM</i>	194
23.4. Alteracions d' <i>ETV5/ERM</i> i càncer	195
24. Anàlisi del nivell d'expressió gènica de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ETV5/ERM</i> per PCR a temps real en l'EEC	196
24.1. Expressió del gen <i>RUNX1/AML1</i>	196
24.2. Expressió del gen <i>ETV5/ERM</i>	197
25. Estudi proteic de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ETV5/ERM</i> en l'EEC	198
25.1. Anàlisi de l'estructura proteica de <i>RUNX1/AML1</i>	198
25.2. Anàlisis dels nivells d'expressió proteica de <i>RUNX1/AML1</i>	200
25.2.1. Anàlisi de western blot	200
25.2.2. Anàlisi immunohistoquímica en arrays de teixit endometrial	201
25.3. Anàlisi de l'estructura proteica d' <i>ETV5/ERM</i>	203
25.4. Anàlisi dels nivells d'expressió proteica d' <i>ETV5/ERM</i>	204
25.4.1. Anàlisi de western blot	204
25.4.2. Anàlisi immunohistoquímic en arrays de teixit endometrial	205
26. Anàlisi de possibles mecanismes d'acció de la sobreexpressió de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ETV5/ERM</i> en l'EEC	206
26.1. Anàlisi de les interrelacions entre <i>RUNX1/AML1</i> i <i>ETV5/ERM</i>	207
26.2. Estudi de dianes de regulació de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ERM/ETV5</i>	207
26.2.1. <i>p21^{WAF1/CIP1}</i> : diàna de regulació de <i>RUNX1/AML1</i>	208
26.2.2. <i>PTEN</i> : diàna de regulació de <i>RUNX1/AML1</i> (estudis preliminars)	210
26.2.3. <i>MMP2</i> : diàna de regulació d' <i>ETV5/ERM</i> (estudis preliminars)	212
27. Significació patològica i aplicació clínica de la sobreexpressió de <i>RUNX1/AML1</i> i d' <i>ETV5/ERM</i>	214
28. Perspectives de futur del projecte d'investigació	215
CONCLUSIONS	217
BIBLIOGRAFIA	221
RELACIÓ DE FABRICANTS CITATS	245
ANNEX	249

ÍNDIX DE FIGURES

Introducció

Fig. 1, (esquema de l'aparell reproductor femení)	30
Fig. 2, (esquema dels òrgans genitals femenins interns)	32
Fig. 3, (esquema de la gametogènesis femenina)	34
Fig. 4, (esquema de funcionament del cicle menstrual)	35
Fig. 5a, (esquema de la maduració, fecundació i implantació de l'oòcit)	37
Fig. 5b, (imatges de la fecundació i la implantació de l'oòcit)	37
Fig. 6, (esquema del desenvolupament embrionari)	38
Fig. 7a, (esquema de regulació hormonal del cicle menstrual)	40
Fig. 7b, (ruta de síntesi i fórmula química de les hormones esteroidals)	41
Fig. 8, (esquema de la morfologia de l'úter)	42
Fig. 9, (imatge de la histologia de l'endometri)	44
Fig. 10, (composició d'imatges de diferents tipus d'endometri)	46
Fig. 11, (esquema de regulació del cicle endometrial)	48
Fig. 12a, (esquema del càncer endometrial)	49
Fig. 12b, (comparació histològica de l'EEC amb l'EA)	49
Fig. 13, (escrits de Paul d'Aegina)	51
Fig. 14, (composició d'imatges d'HS, HC i HA)	55
Fig. 15, (esquema de progressió tumoral i metastasi)	60
Fig. 16, (composició d'imatges dels tipus histològics de carcinoma endometrial)	63
Fig. 17, (composició d'imatges dels tipus d'EEC)	66
Fig. 18, (esquema del model de progressió de l'EEC)	75
Fig. 19, (esquema del model de progressió del NEEC)	79
Fig. 20, (esquema de progressió de l'EEC de l'estadi IA al IVB)	85
Fig. 21, (IHQ d'ER i PR)	89
Fig. 22, (IHQ de PCNA i Ki-67)	91
Fig. 23, (IHQ d'HER-2/neu i Bcl-2)	92
Fig. 24, (IHQ de PTEN, p53, p21 ^{WAF1/CIP1} i p16 ^{INK4a})	94
Fig. 25, (imatge de l'MSI)	96

Material i Mètodes

Fig. 26, (imatge d'obtenció del teixit atròfic i del teixit tumoral)	106
Fig. 27, (imatge del sistema d'anàlisi de l'integritat de l'RNA)	107
Fig. 28, (esquema dels filtres <i>LifeGrid</i> TM d'Incyte Genomics, Inc.)	109
Fig. 29a, (esquema de les fases de la PCR)	114

Fig. 29b, (esquema d'anàlisi de l'eficiència de la PCR pel mètode de la corba estàndard)	114
Fig. 30, (esquema del funcionament de la sonda TaqMan [®])	117
Fig. 31, (esquema de la selecció dels punts del TMA)	124
Fig. 32, (esquema del funcionament de les agulles en la construcció del TMA)	125
Fig. 33, (esquema global de construcció del TMA)	126
Fig. 34, (esquema dels plasmidis originals: <i>pCMV5</i> i <i>pSVh</i>)	128
Fig. 35, (esquema d'inserció de la diana <i>XhoI</i>)	129
Fig. 36, (esquema dels plasmidis <i>pEGFP-C1</i> i <i>C2</i>)	130

Resultats

Fig. 37, (imatge de 6 histerectomies)	138
Fig. 38a, (imatge dels cultius primaris de cèl·lules epitelials d'ENP)	139
Fig. 38b, (processament de les mostres, ICQ de CK19 en cultiu el primari d'ENP)	140
Fig. 39, (processament de les mostres, integritat de l'RNA hibridat)	141
Fig. 40, (composició d'imatges dels filtres hibridats)	142
Fig. 41, (arbre jeràrquic de 53 elements)	148
Fig. 42a, (diagrama colorimètric)	149
Fig. 42b, (diagrama d'agrupació per mostres)	150
Fig. 42c, (diagrama d'agrupació per gens)	151
Fig. 43, (gràfic dels grups funcionals dels 53 gens alterats)	153
Fig. 44, (processament de les mostres utilitzades en la PCR a temps real)	154
Fig. 45a, (perfil d'expressió de <i>RUNX1/AML1</i> per RT-Q-PCR calibrat per EA)	155
Fig. 45b, (perfil d'expressió de <i>RUNX1/AML1</i> per RT-Q-PCR calibrat per ENP)	155
Fig. 46, (llindar de significació de l'expressió gènica de <i>RUNX1/AML1</i>)	156
Fig. 47a, (perfil d'expressió d' <i>ETV5/ERM</i> per RT-Q-PCR calibrat per EA)	158
Fig. 47b, (perfil d'expressió d' <i>ETV5/ERM</i> per RT-Q-PCR calibrat per ENP)	158
Fig. 48, (llindar de significació de l'expressió gènica d' <i>ETV5/ERM</i>)	159
Fig. 49a, (WB de <i>RUNX1/AML1</i>)	161
Fig. 49b, (densitometria del WB de <i>RUNX1/AML1</i>)	161
Fig. 50a, (WB d' <i>ETV5/ERM</i>)	162
Fig. 50b, (densitometria del WB d' <i>ETV5/ERM</i>)	162
Fig. 51, (imatge dels TMAs d'EA, HS, HC i EEC)	163
Fig. 52a, (localització cel·lular de <i>RUNX1/AML1</i> en la IHQ dels TMAs)	164
Fig. 52b, (imatge dels punts dels TMAs amb marcatge de <i>RUNX1/AML1</i>)	165
Fig. 52c, (quantificació del nivell d'expressió de <i>RUNX1/AML1</i> en els TMAs)	165
Fig. 52d, (diagrama dels resultats estadístics de <i>RUNX1/AML1</i> en els TMAs)	166
Fig. 53a, (localització cel·lular d' <i>ETV5/ERM</i> en la IHQ dels TMAs)	167
Fig. 53b, (imatge dels punts dels TMAs amb marcatge d' <i>ETV5/ERM</i>)	168

Fig. 53c, (quantificació del nivell d'expressió d'ETV5/ERM en els TMAs)	168
Fig. 53d, (diagrama dels resultats estadístics d'ETV5/ERM en els TMAs)	169
Fig. 54, (esquema de les construccions GFP-RUNX1/AML1 i GFP-ETV5/ERM)	170
Fig. 55a, (imatge de la transfecció GFP-RUNX1/AML1)	171
Fig. 55b, (imatge de la transfecció GFP-ETV5/ERM)	171
Fig. 56a, (imatge de la ICQ fluorescent, col·localització de la GFP i RUNX1/AML1)	172
Fig. 56b, (imatge de la ICQ fluorescent, col·localització de la GFP i ETV5/ERM)	173
Fig. 57, (diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió gènica)	174
Fig. 58, (diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió proteica)	175
Fig. 59a, (perfil d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ per RT-Q-PCR calibrat per EA)	176
Fig. 59b, (perfil d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ per RT-Q-PCR calibrat per ENP)	176
Fig. 59c, (perfil d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ per estadis histològics)	177
Fig. 60a, (WB de $p21^{WAF1/CIP1}$)	178
Fig. 60b, (densitometria del WB de $p21^{WAF1/CIP1}$)	178
Fig. 61, (localització cel·lular de $p21^{WAF1/CIP1}$ en la IHQ dels TMAs)	179
Fig. 62a, (imatge de correlació de l'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ i <i>RUNX1/AML1</i>)	180
Fig. 62b, (diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió gènica)	180
Fig. 63a, (imatge de correlació del marcatge de $p21^{WAF1/CIP1}$ i <i>RUNX1/AML1</i>)	181
Fig. 63b, (diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió proteica)	181

Discussió

Fig. 64, (esquema del gen <i>RUNX1/AML1</i>)	190
Fig. 65, (esquema del gen <i>ETV5/ERM</i>)	194
Fig. 66a, (imatge 3D de la proteïna RUNX1/AML1)	199
Fig. 66b, (imatge 3D del heterodímer RUNX1/AML1-CBF β i el DNA)	199
Fig. 67, (imatge de la reconstrucció 3D de la unió de RUNX1/AML1 al DNA)	200
Fig. 68, (imatge de la predicció 3D de la proteïna ETV5/ERM)	204
Fig. 69a, (imatge de la correlació inversa de l'expressió gènica de <i>PTEN</i> i <i>RUNX1/AML1</i>)	210
Fig. 69b, (diagrama dels resultats estadístics de la correlació gènica)	210
Fig. 70a, (proposta de mecanisme de regulació de RUNX1/AML1 i $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC)	211
Fig. 70b, (proposta de mecanisme de regulació de RUNX1/AML1 i <i>PTEN</i> en l'EEC)	211
Fig. 71a, (imatge de la correlació del marcatge d'MMP-2 i ETV5/ERM)	213
Fig. 71b, (imatge del marcatge d'ETV5/ERM en el front invasió de l'EEC)	213
Fig. 72, (proposta de mecanisme de regulació d'ETV5/ERM i <i>MMP-2</i> en l'EEC)	214

INDEX DE TAULES

Introducció

Taula 1 , (comparació de l'evolució de les diferents hiperplàsies endometrials) _____	56
Taula 2 , (característiques principals dels dos tipus de carcinomes) _____	61
Taula 3 , (classificació histològica en funció del tipus cel·lular) _____	62
Taula 4 , (subtipus histològics de l'EEC) _____	65
Taula 5 , (principals alteracions genètiques dels carcinomes endometrials de tipus I i II) _____	68
Taula 6 , (estadis del carcinoma endometrial establerts per la F.I.G.O.) _____	84
Taula 7 , (gradació arquitectural proposada per la F.I.G.O.) _____	86
Taula 8 , (gradació nuclear proposada per la F.I.G.O.) _____	86

Material i mètodes

Taula 9 , (mostres hibridades en el <i>microarray</i> de cDNA) _____	110
Taula 10 , (mostres processades per RT-Q-PCR) _____	116
Taula 11 , (mostres processades per WB) _____	120
Taula 12 , (mostres utilitzades en els TMAs) _____	123

Resultats

Taula 13 , (comparació dels diferents filtres) _____	144
Taula 14 , (taula d'anàlisi del conjunt de filtres) _____	145
Taula 15 , (establiment d'interval d'exclusió en l'anàlisi d'expressió diferencial) _____	146
Taula 16 , (53 seqüències obtingudes de l'estudi d'expressió gènica diferencial) _____	152



ABREVIATURES**3D:** tridimensional**18S:** unitat ribosomal 18S**28S:** unitat ribosomal 28S**32Dcl3:** mouse, C3H/HeJ, bone marrow cell line**AA:** aminoàcids**Ab:** antibody**ADD3:** adducin 3**AML1:** acute myeloid leukaemia 1**AML1-ETO:** acute myeloid leukaemia 1-eight twenty one protein translocation**AML1-Evi1:** acute myeloid leukaemia 1-ecotropic viral integration site 1 translocation**Amp^r:** ampicillin resistance**AREG:** amphiregulin**ARMDens:** artifact-removed mean density**A.T.C.C.:** American Type Culture Collection**ATP:** adenosine triphosphate**ATP9B:** ATPase 9B**B3GAT3:** beta-1,3-glucuronyltransferase 3**Ba/F3:** mouse, peripheral blood, pro B cell**BAC:** bacterial artificial chromosome**BAX:** Bcl2-associated X protein**Bcl2:** B-cell CLL/lymphoma 2**Bkgd:** background**bp:** base pair**BSA:** bovine serum albumin**BTN2A1:** butyrophilin 2 A1**°C:** grau centígrad**C13ORF9:** chromosome 13 open reading frame 9**C8A:** complement component 8, alpha polypeptide**CA:** Califòrnia (Estats Units)**(CA)_n:** adenine citosine (n) repeat**CBF:** core binding factor**CBF α 2:** core binding factor alpha 2**CBF β :** core binding factor beta**CBF β -SMMHC:** core binding factor beta-smooth muscle myosin heavy chain**CDH1:** cadherin 1**CDK-D:** cyclin-dependent kinase D**CDKN1A:** cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1/CIP1})**CDKN2A:** cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16^{INK4a})

CDKN4: cyclin-dependent kinase inhibitor (p27^{KIP1})

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein

CEP290: centrosomal protein Cep290

c-erbB2/neu: erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (neuro/glioblastoma derived oncogene homolog)

c-ets 1: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

CGH: comparative genomic hybridation

CH₃ (H₃C): formula química del grup metil

Ci: Curie

C.I.B.: Centre d'Investigacions Biològiques

CIN: chromosome instability

CIP: calf intestinal alkaline phosphatase

CK19: cytokeratin 19

CNTF: ciliary neurotrophic factor

CO₂: formula química del diòxid de carboni

Cpm: counts per minute

CREB1: cAMP responsive element binding protein 1

CRTAP: cartilage-associated protein

C.S.I.C.: Consell Superior d'Investigacions Científiques

Ct: cycle threshold

CT: Connecticut (Estats Units)

C-tal: extrem carboxi-terminal

CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein), beta 1

CTP: cytidine triphosphate

CYP1A1: cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

DAB: diaminobenzidine

dATP: deoxynucleosides adenosine triphosphate

DEPC: diethylpyrocarbonate

dGTP: deoxynucleosides guanosine triphosphate

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DNA: deoxyribonucleic acid

DNAJA2: DNAJ (hsp40) homolog, subfamily A2

dNTP: deoxynucleosides nucleotides triphosphate

dTTP: deoxynucleosides thymidine triphosphate

dUTP: deoxynucleosides uracil triphosphate

E1AF: E1A enhancer binding protein

EA: endometri atròfic

EcoR1: Escherichia coli restriction site 1

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EEC: endometrioid endometrial carcinoma

EGFP: enhanced green fluorescent protein

- EGF-R:** *epidermal growth factor receptor*
- EIC:** *endometrial intraepithelial carcinoma*
- Elf-1:** *E74-like factor 1*
- ELF-2:** *E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)*
- EMX2:** *empty spiracles homolog 2 (Drosophila)*
- ENP:** *endometri normal proliferatiu*
- ER:** *estrogen receptor*
- ER81:** *ETS related protein 81*
- ER α :** *estrogen receptor alpha*
- ER β :** *estrogen receptor beta*
- ERBB:** *erythroblastic leukemia viral oncogene*
- ERBB2:** *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*
- ERM:** *ETS-related molecule*
- ERO1L:** *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like*
- EST:** *expressed sequence tag*
- ETS:** *v-ets erythroblastosis virus E26*
- ETS-1:** *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*
- ETV1:** *ETS translocation variant 1*
- ETV4:** *ETS translocation variant 4*
- ETV5:** *ETS translocation variant 5*
- f1 ori:** *filamentous bacteriophage 1 replication origin*
- F.I.G.O.:** *Federació Internacional de Ginecologia Oncològica*
- FBS:** *fetal bovine serum*
- Fig:** *figura*
- FITC:** *fluorescein-5-isothiocyanate*
- FSH:** *follicle stimulating hormone*
- FUCA1:** *fucosidase alpha-L- 1*
- GBA:** *glucosidase beta; acid (includes glucosylceramidase)*
- GFP:** *green fluorescent protein*
- GnHR:** *gonadotropin-releasing hormone*
- GP2:** *glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)*
- GpG:** *guanine pirimidine guanine*
- G-TLE:** *groucho transducin-like enhancer of split*
- GZMA:** *granzyme A*
- h:** *hora*
- H₂O:** *formula química de l'aigua*
- H₂O₂:** *formula química del peròxid d'hidrogen*
- H₂O_d:** *formula química de l'aigua destil·lada*
- HA:** *hiperplàsia amb atípia*
- HC:** *hiperplàsia complexa*

HCA: hiperplàsia complexa amb atípia

HDACs: *histone deacetylases*

HEC-IA: *human endometrial adenocarcinoma cell line, stage IA*

hem/eos: hematoxilina/eosina

HER2/neu: *herstatin; neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog*

H.M.I.-V.H.: Hospital Maternoinfantil de la Vall d'Hebron

hMLH1: *DNA mismatch repair protein mutL protein homolog 1*

hMSH2: *DNA mismatch repair protein mutS protein homolog 2*

hMSH3: *DNA mismatch repair protein mutS protein homolog 3*

hMSH6: *DNA mismatch repair protein mutS protein homolog 6*

HNPCC: *hereditary non polyposis colorectal cancer*

H-ras: *Harvey rat sarcoma*

HS: hiperplàsia simple

HSA: hiperplàsia simple amb atípia

HSV TK pA: *herpes simplex virus thymidine kinase polyadenylation signal sequence*

ICQ: immunocitoquímica

ID: *identification*

IGF2R: *insulin-like growth factor 2 receptor*

IHPK1: *Inositol hexaphosphate kinase 1*

IHQ: immunohistoquímica

IL: Illinois (Estats Units)

IMC: índex de massa corporal

IR: índex de resistència del flux sanguini

I.S.G.Y.P.: *International Society of Gynecological Pathology*

ITPKC: *inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C*

Kan^r/Neo^r: *kanamycin and neomycin resistance*

KCl: fórmula química del clorur de potassi

kDa: *kilo Dalton*

Ki-67: *antigen identified by monoclonal antibody Ki 67*

kp: *kilo base*

K-ras: *kirsten rat sarcoma*

KYNU: *kynureninase (L-kynurenine hydrolase)*

LB: *Luria Bertani (medium)*

LDL: *low-density lipoprotein*

LH: *luteinizing hormone*

LOH: *loss of heterozygosity*

M: molar

MA: Massachusetts (Estats Units)

MAD: *median of absolute deviation*

MCS: *multiple cloning site*

MD: Maryland (Estats Units)

- MgCl₂**: formula química del clorur de magnesi
- MIB-1**: *mind bomb homolog 1 (Ki-67)*
- ml**: mil·lilitre
- mm**: mil·límetre
- mM**: mil·limolar
- MMAC**: *mutated in multiple advanced cancers*
- M-MLVRT**: *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*
- mmols**: mil·limols
- MMP-1**: *matrix metalloproteinase-1*
- MMP-2**: *matrix metalloproteinase-2*
- MMP-3**: *matrix metalloproteinase-3*
- MMP-9**: *matrix metalloproteinase-9*
- MMPs**: *matrix metalloproteinases*
- MMRs**: *mismatch repair genes*
- MO**: Missouri (Estats Units)
- MOPS**: *N-morpholino propanesulfonic acid buffer*
- mRNA**: *messenger ribonucleic acid*
- MRPL3**: *mitochondrial ribosomal protein L3*
- MS4A6**: *membrane-spanning 4-domains, subfamily A6*
- MSI**: *microsatellite instability*
- mSin3A**: *mammalian Sin3 protein homolog A*
- MTHFR**: *methylenetetrahydrofolate reductase*
- MTVR1**: *mouse mammary tumor virus receptor homolog 1*
- MYB**: *v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog*
- NCALD**: *neurocalcin delta*
- N.C.B.I.**: *National Center for Biotechnology Information*
- nCoR**: *nuclear receptor corepressor*
- NDUFA2**: *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2*
- NEEC**: *non endometrioid endometrial carcinoma*
- NERF**: *new ETS-related factor*
- ng**: nanogram
- NH₄Cl**: formula química del clorur d'amoni
- N.H.G.R.I.**: *National Human Genome Research Institute*
- N.I.H.**: *National Institutes of Health*
- NIH3T3**: *mouse, NIH Swiss, embryo 3T3 cell line*
- NJ**: New Jersey (Estats Units)
- nm**: nanòmetre
- NPTX1**: *neuronal pentraxin 1*
- N-ras**: *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*
- N-tal**: *extrem amino-terminal*
- NY**: New York (Estats Units)

O₂ (O): formula química de l'oxigen molecular

OH (HO): formula química del grup alcohol

O.M.S.: Organització Mundial de la Salut

OR: Oregon (Estats Units)

p16^{INK4a}: *protein (16kDa) cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A*

p21^{WAF1/CIP1}: *protein (21kDa) wild-type p53-activated fragment 1 / CDK-interaction protein 1*

p27^{KIP1}: *protein (27kDa) cyclin-dependent kinase inhibitor protein 1*

P³²: *phosphore 32 isotope*

P³³: *phosphore 33 isotope*

p53: *protein (53 kDa) (tumor suppressor)*

p300: *transcriptional adapter protein (300 kDa)*

PAC: *P1 artificial chromosome*

PBS: *phosphate buffered saline*

pCMV5: *plasmid carrying the citomegalovirus promotor 5*

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*

pCR 2.1.: *plasmid for cloning PCR products (2.1.)*

PCR: *polimerase chain reaction*

PCMV IE: *immediate early promotor of cytomegalovirus*

PDYN: *prodynorphin*

PEA3: *polyomavirus enhancer activator-3*

PEBP: *polyomavirus enhancer-binding protein*

PEBP2β: *polyomavirus enhancer-binding protein 2 beta subunit*

PEBP2αB: *polyomavirus enhancer-binding protein 2 alpha subunit, B*

pEGFP-C1: *plasmid carrying enhanced green fluorescent protein (C1)*

pEGFP-C2: *plasmid carrying enhanced green fluorescent protein (C2)*

PGGT1B: *protein geranylgeranyltransferase type 1, beta subunit*

PIF: *prolactine inhibitor factor*

POLR2H: *polymerase (RNA) 2 (DNA directed) polypeptide H*

POM121: *nuclear pore membrane protein 121 kDa*

PR: *progesterone receptor*

PR-A: *progesterone receptor isoform A*

PR-B: *progesterone receptor isoform B*

PRKAR1B: *protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 1, beta*

pSG5: *plasmid of streptomyces ghanaensis DSM 2932*

PSMA3: *proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3*

pSVh: *plasmid carrying virus SV40 promotor*

PSV40: *promotor of SV40 virus*

PT7: *polymerase T7*

PTEN: *phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)*

pUC ori: *plasmid universal cloning replication origin*

- PVDF:** *polyvinylidene fluoride*
- RARRES1:** *retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1*
- Rb:** *retinoblastoma*
- Ref:** referència
- RF:** *releasing factor (releasing hormone)*
- RMN:** *ressonància magnètica nuclear*
- RNA:** *ribonucleic acid*
- ROX:** *6-carboxy-X-rhodamine*
- RPS4X:** *ribosomal protein S4, X-linked*
- rRNA:** *ribosomal ribonucleic acid*
- RT:** *retrotranscripció*
- RT-Q-PCR:** *real time-quantitative-polimerase chain reaction*
- RUNX:** *runt-related transcription factor*
- RUNX1:** *runt-related transcription factor 1*
- RUNX2:** *runt-related transcription factor 2*
- RUNX3:** *runt-related transcription factor 3*
- RUVBL1:** *ruvB (E. coli homolog)-like 1*
- sARMDens:** *artifact-removed mean density subtracted*
- SDS:** *sodium dodecyl sulfate*
- S.E.G.O.:** *Societat Espanyola de Ginecologia Oncològica*
- SELP:** *selectin P (granule membrane protein 140kD)*
- SHD:** *Src homology 2 domain containing transforming protein D*
- SIAT1:** *sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)*
- SMAD4:** *SMAD, mothers against decapentaplegic homolog 4*
- SMADs:** *SMADs, mothers against decapentaplegic*
- SMYD2:** *SET and MYND domain containing 2*
- SNAPC1:** *small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1*
- SNC:** *sistema nerviós central*
- SNP:** *single nucleotide polymorphisms*
- SpRunt:** *strongylocentrotus purpuratus runt protein*
- SPSS:** *statistical package for the social sciences*
- SSC:** *saline sodium citrate*
- SV40pA:** *virus SV40 polyadenylation signal sequence*
- TAC:** *tomografia axial computeritzada*
- Taq:** *Thermus aquaticus (polymerase)*
- TCEB3:** *transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3*
- TEL-AML1:** *translocation-ets-leukaemia-acute myeloid leukaemia 1*
- TGFβ:** *transforming growth factor, beta*
- TGFβR2:** *transforming growth factor, beta receptor 2*
- TIFF:** *tagged image file format*

TMAs: *tissue microarrays*

TNM: *tumor nodule metastasis*

TP53: *tumor protein p53*

TRIP15: *thyroid receptor interacting protein 15*

Tris-Cl: *tris-chloride*

Tris-HCl: *tris-hydrochloride*

TRITC: *tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate*

U: Unitats

U.A.B.: Universitat Autònoma de Barcelona

U.C.T.S.: Unitat Científicotècnica de Suport

uPA: *urokinase-type plasminogen activator*

U.R.B.: Unitat de Recerca Biomèdica

UTR: *untranslated regions*

V: volt

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WB: *western blot*

WI: Wisconsin (Estats Units)

X-Gal: *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*

Xho1: *Xanthomonas horticola restriction site 1*

YES1: *V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog 1*

YP1: *yolk protein1*

ZBED1: *zinc finger, BED-type containing 1*

µg: microgram

µl: microlitre

µM: micromolar



INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Aparell reproductor femení

La reproducció és una funció essencial dels essers vius, constitueix el procés a través del qual els organismes procreen formant individus semblants a ells mateixos. Els òrgans encarregats de portar a terme aquesta funció constitueixen l'aparell reproductor. En l'aparell reproductor humà hi trobem les glàndules genitals o gònades on s'originen les cèl·lules sexuals o gàmetes. Les gònades femenines (ovarís) produeixen els gàmetes femenins que reben el nom d'òvuls. L'òvul després d'haver madurat i haver estat fecundat és capaç de desenvolupar un nou organisme. L'òvul és una cèl·lula de gran dimensions que porta la informació genètica femenina. Generalment és una cèl·lula voluminosa, puix que presenta una gran quantitat de vitel de reserva en el citoplasma. En els metazous es forma una capa cel·lular que l'envolta, segons disposicions característiques de cada grup zoològic, que constitueix el fol·licle. Sol ésser un epitelí simple, constituït per més o menys cèl·lules, que en alguns casos s'ondula i origina fistons ramificats que poden penetrar l'òvul. El nucli esfèric de l'òvul s'anomena vesícula germinativa. Rodejant l'òvul, hi ha una capa mucosa anomenada zona pel·lúcida, que protegeix l'òvul contra agents externs i impedeix que més d'un espermatozoide el fecundi.

El procés de formació dels òvuls és l'ovogènesi i comprèn tres fases: 1) la germinació; 2) el creixement ovular; i 3) la maduració. Mitjançant l'ovogènesi la quantitat de cromosomes es redueix d'un nombre diploide a un nombre haploide. Quan una cèl·lula diploide es divideix per meiosi rep només la meitat dels cromosomes, es a dir 23, però en el procés de fecundació es restaura el nombre de cromosomes amb la unió del gàmeta masculí i femení. Les gònades també actuen com a glàndules endocrines o de secreció interna que intervenen en els caràcters sexuals ^(1, 2).

1.1. Composició de l'aparell reproductor femení

L'aparell reproductor femení està constituït per un conjunt d'òrgans que permeten que desenvolupi la seva correcta funció: **1)** l'òrgan productor d'òvuls i hormones sexuals femenines (l'ovari); **2)** uns conductes que condueixen els òvuls fins a la cavitat uterina en els quals té lloc la fecundació (els oviductes o trompes de Fal·lopi); **3)** un òrgan de gestació (l'úter); **4)** un òrgan d'acoblament (la vagina); i **5)** uns genitals externs (llavis majors, llavis menors, clítoris i himen) que en conjunt constitueixen la vulva.

L'aparell reproductor femení es pot dividir en dues unitats anatòmiques, que contenen cadascun dels òrgans anteriorment citats: els genitals interns i els genitals externs ⁽¹⁻³⁾.

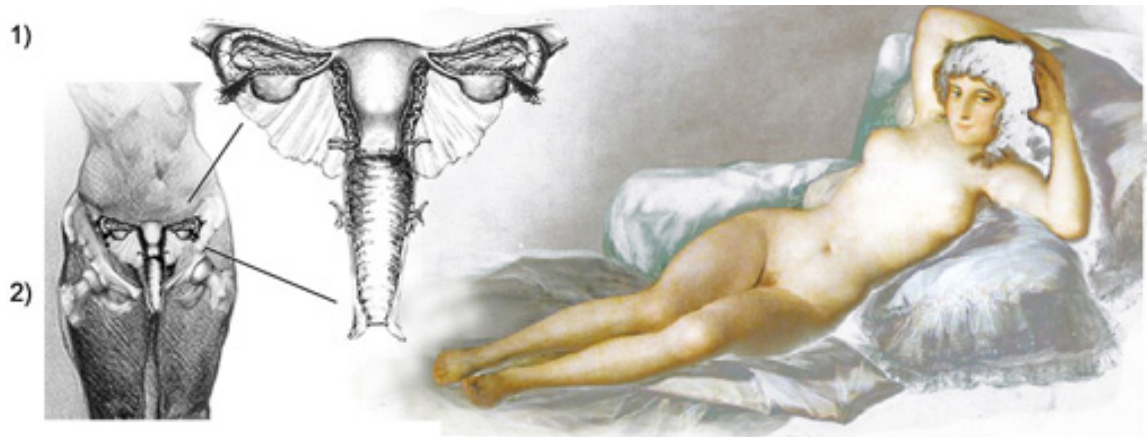


Figura 1, esquema de l'aparell reproductor femení: 1) imatge en la qual es detalla l'estructura de l'aparell reproductor femení intern; 2) detall de la localització anatòmica de l'aparell reproductor femení intern. Es pot observar la disposició de l'aparell reproductor a la part baixa de l'abdomen localitzat en la profunditat de la cavitat pèlvica. A la dreta de la fig. detall del quadre *La Maja Desnuda* de F. de Goya (Museo del Prado, Madrid). El centre del quadre coincideix amb el pubis, on hi apareix, per primera vegada en la història de la pintura, el pel púbic.

1.1.1. Òrgans genitals femenins interns

Els òrgans reproductors femenins interns tenen la funció de permetre la formació dels gàmetes, la fecundació dels òvuls, i el desenvolupament gestacional. Els òrgans genitals interns es troben constituïts pels ⁽¹⁻³⁾:

1) **ovaris:** glàndula femenina oviforme, de la mida d'una ametlla, situada a la part baixa de l'abdomen i dotada d'una doble funció: 1) la formació dels òvuls i 2) la secreció endocrina

dels estrògens i de la progesterona. Els ovaris es disposen simètricament a cada banda de l'úter, dins la cavitat pelviana en un plec del peritoneu denominat lligament ample. Cadascun resta connectat amb l'úter mitjançant la trompa de Fal·lopi, extremitat fimbriada de la qual el recobreix parcialment. L'ovari histològicament comprèn dues zones: 1) la zona cortical o germinativa, disposada perifèricament i integrada per un epitelí simple, denominat epitelí germinal, un teixit conjuntiu denominat estroma i pels fol·licles ovàrics en diversos estadis de maduresa (primordial, primari, secundari, terciari i madur o fol·licle de Graaf); i 2) La zona medul·lar o vascular, és situada al centre de l'ovari (Fig. 2).

2) **oviductes o trompes de Fal·lopi:** tubs membranosos d'uns 12-14 cm que parteixen des de l'angle superior de l'úter fins a l'ovari corresponent i es troben situats entre les fulles del lligament ample. L'extremitat externa, anomenada pavelló, recull l'òvul per transportar-lo fins a l'úter. Els òvuls es desplacen dels ovaris a l'úter impulsats per unes vellositats que recobreixen els oviductes (Fig. 2).

3) **annexos:** conjunt anatòmic format pels lligaments uterins, les trompes i els ovaris (Fig. 2).

4) **úter:** òrgan de l'aparell reproductor femení encarregat de la gestació. L'úter te la funció d'acollir l'òvul fecundat, mantenir les condicions adequades durant el seu desenvolupament i expel·lir el fetus en el moment del part. L'úter és un òrgan muscular recobert en la part interna per un teixit epitelial anomenat endometri on es fixa i desenvolupa l'òvul fecundat durant la gestació. L'endometri es modifica per poder presentar les condicions òptimes per permetre la implantació, si aquest procés no es dona, el teixit es renova mitjançant la menstruació (Fig. 2).

5) **vagina:** és un conducte elàstic, muscular i mucós d'uns 10-12 cm que, inserint-se en el coll uterí, travessa el sòl pelvià i s'obre a la part profunda de la vulva, de la qual és separada de l'exterior per l'himen o les seves restes. La vagina per les seves característiques morfològiques te les condicions exactes que permeten l'encaix amb l'aparell reproductor masculí extern durant el coit. També constitueix el canal de sortida del fetus durant el part (Fig. 2).

6) **glàndules de Bartholin:** cadascuna de les dues glàndules de l'aparell genital femení, que desemboquen als costats de l'orifici vaginal. Aquestes glàndules segreguen un líquid mucós, destinat a lubricar l'aparell genital en el moment del coit (Fig. 2).

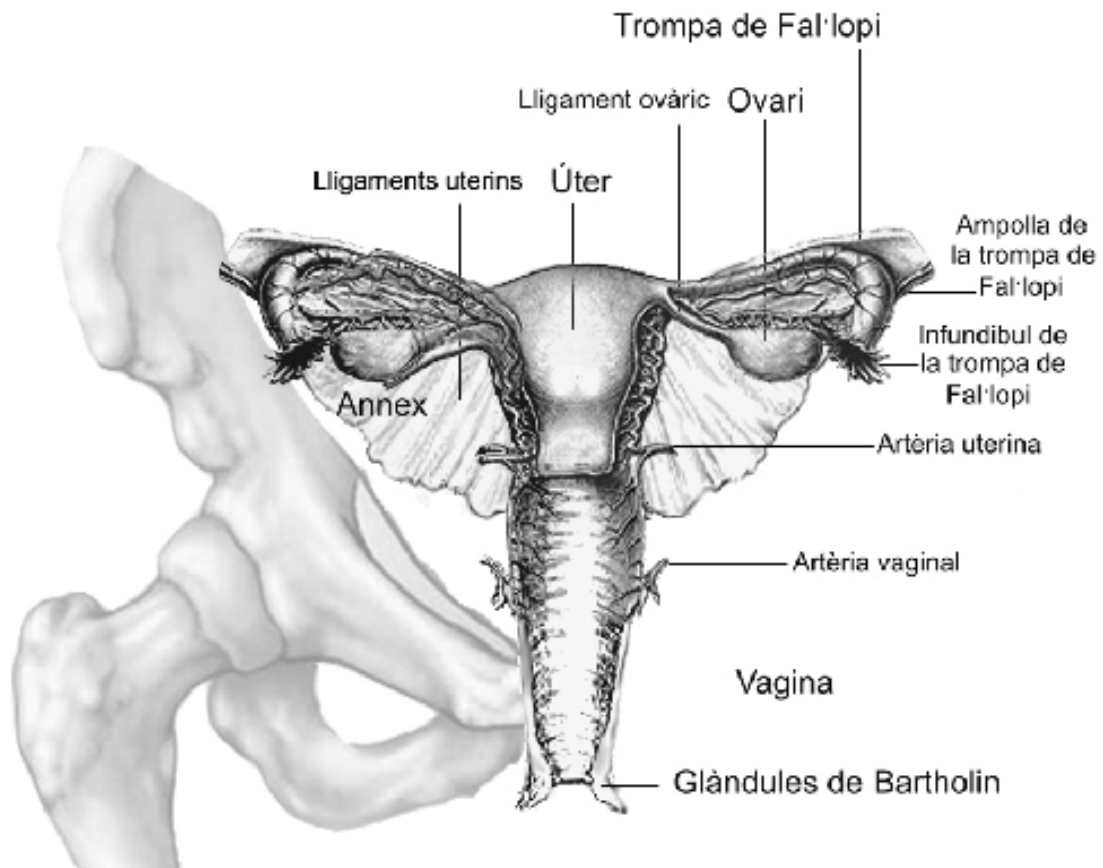


Figura 2, esquema dels òrgans genitals femenins interns: detall de la anatomia de l'aparell reproductor femení intern. Es pot observar la disposició de l'úter, les trompes i els ovaris, així com dels lligament uterins que en subjecten l'estructura. A l'esquerra de la figura es mostra la proporció de l'aparell reproductor femení intern respecte la cavitat pèlvica.

1.1.2. Òrgans genitals femenins externs

Els òrgans reproductors femenins externs presenten dues funcions: 1) permetre l'entrada del penis; i 2) protegir els òrgans genitals interns dels agents infecciosos. Els òrgans genitals externs constitueixen la vulva que envolta l'obertura de la vagina i s'estructura en ⁽¹⁻³⁾:

1) **llavis externs o majors:** cadascuna de les vores de la vulva. Els llavis majors, es troben constituïts per dos plecs cutanis recoberts de pèl que delimiten l'obertura vulvar.

2) **llavis interns, menors o nimfa**: cadascuna de les vores internes de la vulva. Els llavis menor, es troben constituïts per dos plecs mucosos situats sota els llavis majors que protegeixen les estructures vulvars profundes: la vagina, la uretra i el clítoris.

3) **clítoris o òrgan sensorial sexual femení**: òrgan erèctil femení situat a l'angle anterior de la vulva. És troba format per dos cossos cavernosos envoltats d'una mucosa i presenta una gran sensibilitat als estímuls físics.

4) **himen**: replec mucós perforat i flexible que tanca parcialment la vagina. L'himen pot tenir una forma, un gruix i una extensió diversa. Amb les relacions sexuals va desapareixent, i després del primer part només en resten petites cicatrius.

1.2. Fisiologia de l'aparell reproductor femení

1.2.1. La gametogènesi femenina

La gametogènesi femenina és el procés pel qual es porta a terme la formació dels gàmetes anomenats òvuls. Aquest procés també rep el nom d'ovogènesi.

El procés d'ovogènesi es porta a terme en els ovaris, i més concretament en unes estructures anomenades fol·licles. La formació dels òvuls comença durant la vida fetal, just abans de néixer, on el seu procés de formació s'atura, i no es reprèn fins a la pubertat, moment en el qual es porta a terme la maduració del sistema reproductor femení i s'origina el cicle menstrual. Al llarg de la vida fèrtil de la dona, cada 28 dies aproximadament, un dels fol·licles comença a madurar i acaba expulsant un òvul que es dirigeix a les trompes de Fal·lopi. Aquest procés s'anomena ovulació.

El procés d'ovogènesi comprèn tres fases: 1) la **germinació**, fase en la qual les oogònies es multipliquen i donen lloc als oòcits de primer ordre; 2) el **creixement** per acumulació de vitel·l nutritiu en el citoplasma ovàric; i 3) la **maduració**, en què per meiosi s'obtenen dues cèl·lules, una de les quals degenera i l'altra origina l'òvul madur. Mitjançant la maduració la quantitat de cromosomes es redueix d'un nombre diploide a un nombre haploide ^(1, 2, 4).

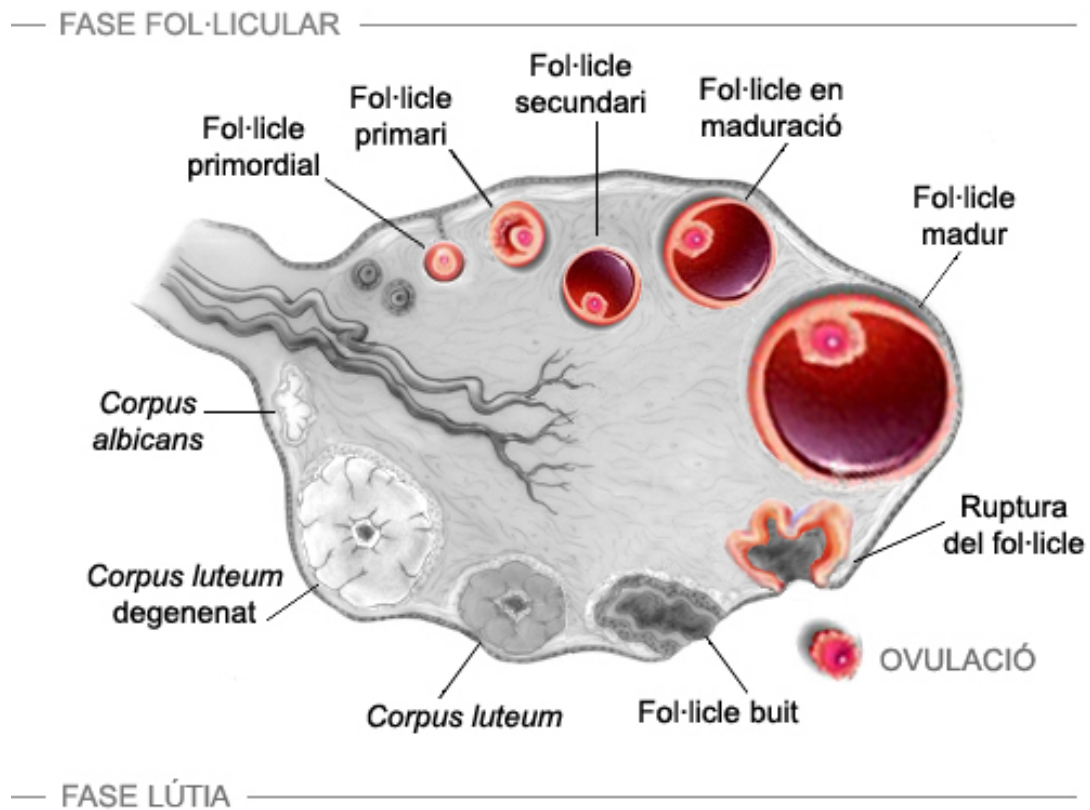


Figura 3, esquema de la gametogènesi femenina: imatge en la que es mostra les dues fases de la gametogènesi femenina, la fase fol·licular i la fase lútia. En la fase fol·licular es pot observar l'evolució del fol·lice primari al llarg de la seva maduració fins arribar al procés d'ovulació. En la fase lútia es mostra la regressió del fol·lice buit que acaba formant el *corpus albicans*.

1.2.2. El cicle menstrual

És un conjunt de fenòmens que tenen com a funció l'ovulació (formació d'òvuls), i que en l'espècie humana dura uns 28 dies. El cicle menstrual consta de tres fases: la fase preovulatòria o fol·licular, la fase ovulatòria o lútia i la menstruació.

1) **la menstruació:** el cicle comença prenent com a referència la menstruació que te una duració de 2 a 4 dies. Aquest punt s'anomena dia 1 del cicle, moment en el qual els nivells de les hormones esteroïdals secretades pels ovaris és baix i hi ha una augment de l'hormona FSH com a conseqüència d'una pèrdua de *feedback* negatiu. Si l'òvul no és fecundat, i per tant no s'implanta a l'endometri, es expulsat de les trompes de Fal·lopi, juntament amb el teixit endometrial, provocant una certa hemorràgia anomenada menstruació ^(1, 2, 4).

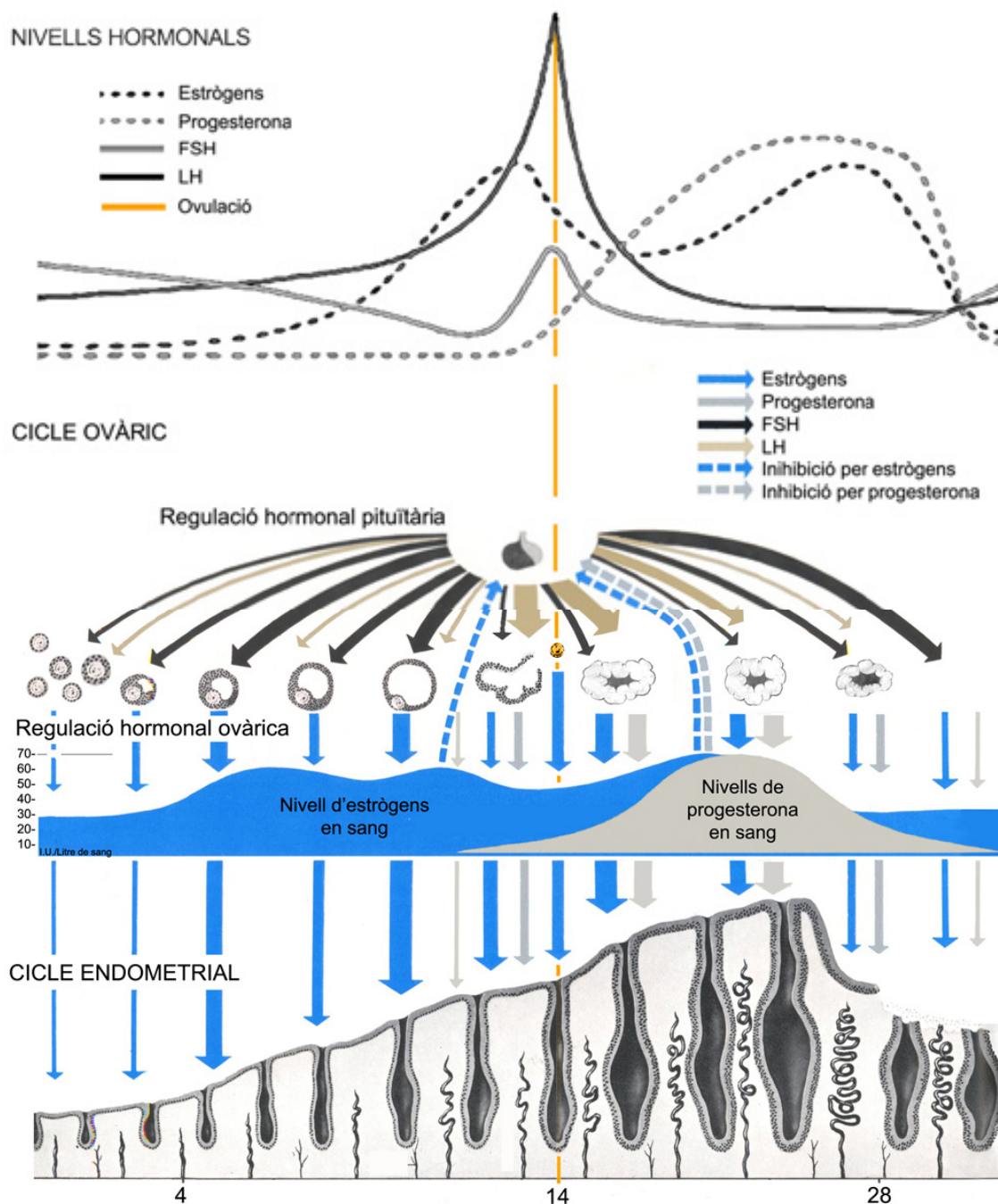


Figura 4, esquema de funcionament del cicle menstrual: el control del cicle menstrual s'articula a partir de la de la regulació coordinada del cicle ovàric i el cicle endometrial amb l'objectiu de portar a terme amb èxit el procés d'ovulació. Els nivells de les hormones gonadotrofines (LH i FSH) regulen tant el procés de maduració dels fol·licles ovàrics com el procés d'ovulació i formació del *corpus luteum* al llarg del cicle ovàric. La maduració dels fol·licles ovàrics, a la vegada permeten l'alliberament a la sang de les hormones esteroidals (estrògens i progesterona) que controlen l'evolució del cicle endometrial, per tal de condicionar l'endometri per a la possible acollida i niuació de l'òvul fecundat.

2) **fase preovulatòria o fol·licular:** al cinquè dia del cicle, aproximadament, i com conseqüència de l'augment de l'hormona gonadotrofina FSH, s'activa un fol·licle de l'ovari, el qual conté un òvul. Aquesta activació provoca que, per acumulació del vitel, l'òvul creixi. El vitel constitueix una reserva de nutrients. L'ovari requereix tant la hormona FSH com LH per produir les hormones esteroïdals (estrògens i progesterona) que regulen tant el creixement i maduració de l'endometri com el moment de l'ovulació. La fase fol·licular acostuma a durar fins al dia 13 del cicle i va acompanyada d'un augment del gruix del teixit endometrial degut a l'increment dels nivells de l'estrogen ^(1, 2, 4).

3) **fase ovulatòria o lúcia:** al 14^è dia del cicle, aproximadament, i com a conseqüència de la pressió interior el fol·licle eclosiona expulsant l'òvul cap a les trompes de Fal·lopi, per a ser fecundat. L'ovulació està regulada per l'augment d'estrògens que assoleixen un pic de secreció que provoca l'alliberament de l'òvul. La fase lúcia, amb una durada d'uns 14 dies, està dominada per uns nivells alts de progesterona, que porta a terme la maduració de l'endometri per tal de crear un ambient òptim per a l'implantació de l'òvul fecundat. En la segona part de la fase lúcia, si no s'ha dut a terme la fecundació i la posterior implantació, el fol·licle buit o *corpus luteum* pren el relleu en la regulació del cicle en un procés anomenat luteòlisi en el qual decauen els nivells de les hormones esteroïdals i torna a començar el cicle menstrual ^(1, 2, 4).

1.2.3. La fecundació

La fecundació és el procés pel qual es fusiona el gàmeta masculí (espermatozoide) amb el gàmeta femení (òvul), donant lloc a la cèl·lula anomenada ou o zigot, que seguida de diverses divisions dona lloc a l'embrió. Aquesta unió té lloc al terç superior d'una de les trompes de Fal·lopi (en la qual s'hagi portat a terme l'ovulació). Els espermatozoides per unir-se a l'òvul han de recórrer una distància molt ample comparada amb la seva mida i el seu temps de vida mig. És per aquest motiu que a més de disposar d'un flagel per moure's ràpidament, l'úter genera uns moviments peristàltics per tal de transportar els espermatozoides fins a les trompes de Fal·lopi, a més l'endometri presenta un conjunt de vellositats que afavoreixen aquest transport. Uns cents dels milions d'espermatozoides inicials arriben a l'emplaçament de l'òvul on només un d'ells serà capaç d'entrar a l'interior i fecundar-lo. Per tal de poder penetrar a l'interior de l'òvul, els espermatozoides disposen d'uns enzims capaços de digerir

la zona pel·lúcida que l'envolta. Al digerir una part suficient de la zona pel·lúcida, per un procés químicomecànic anomenat reacció acrosòmica, l'espermatozoide entra deixant fora la seva cua i quedant només el cap, el qual conté el material genètic masculí. El cap de l'espermatozoide s'uneix a la membrana citoplasmàtica de l'oòcit (unió no específica) per obtenir la dotació genètica final de 23 parelles de cromosomes.

a)

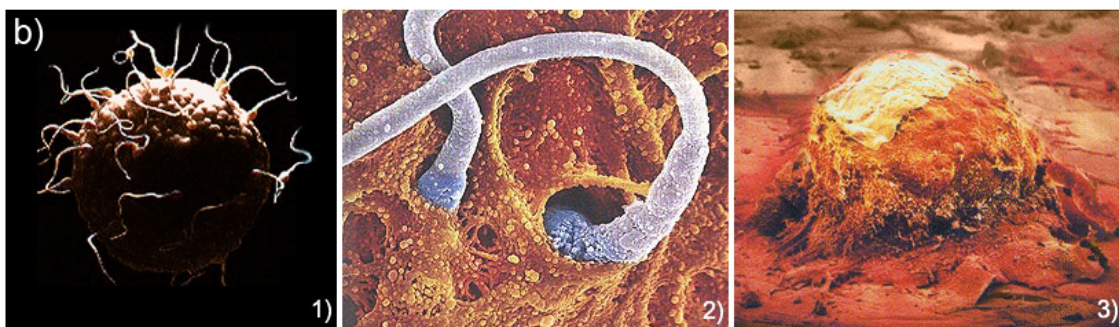
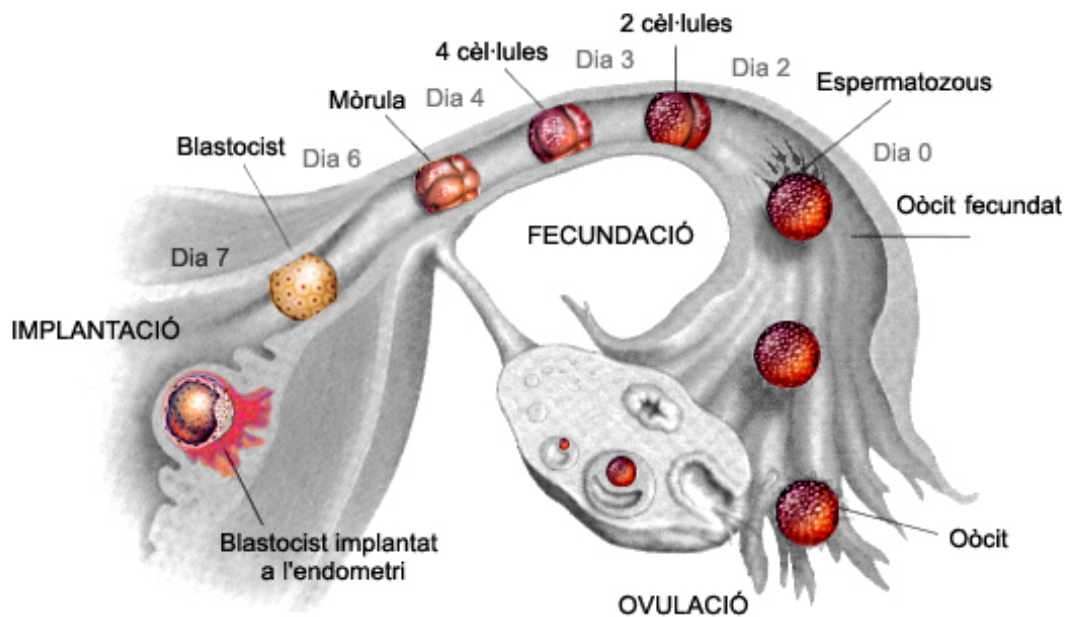


Figura 5a, esquema de la maduració, fecundació i implantació de l'oòcit: il·lustració en la que es mostra, de manera integrada, l'evolució de la maduració del fol·licle primari en l'ovari, el procés d'ovulació, la fecundació de l'oòcit, així com el procés de divisió de l'oòcit fecundat fins a la forma arribar a la forma de blastocist. L'esquema conclou amb la implantació del blastocist a l'endometri.

Figura 5b, imatges de la fecundació i la implantació de l'oòcit: 1) imatge de microscòpia òptica en la que s'observa el moment de la fecundació de l'oòcit. Com mostra la imatge, l'oòcit es troba completament envoltat pels espermatozoides que intenten entrar a l'interior. 2) imatge retocada de microscòpia electrònica que permet veure la reacció acrosòmica, en la qual dos espermatozoides s'obren camí a través de la capa pel·lúcida de l'oòcit. 3) imatge de microscòpia òptica que mostra la implantació del blastocist en la paret endometrial.

A partir del moment en que es fusionen els dos gàmetes es desencadenen tots els processos necessaris per al desenvolupament de l'embrió, però és necessari evitar la entrada de més espermatozoides, es a dir la prevenció de la polispermia. L'òocit disposa d'un conjunt de mecanismes que impedeixen la polispermia: 1) la reacció cortical, en la qual s'aboquen les vesícules corticals les qual alliberen enzims amb acció espermicida; 2) la reacció de membrana, canvi del potencial de membrana que repel·la la unió dels espermatozoides a l'òvul; i 3) la reacció fisico-química de zona pel·lúcida, es porta a terme un enduriment o *Hardering* que impedeix l'entrada dels espermatozoides ⁽²⁾.

1.2.4. Desenvolupament embrionari

El desenvolupament embrionari és el procés de formació de l'embrió a partir d'un ou o zigot, el qual té lloc dins de l'úter matern. El procés s'inicia després de la fecundació a la trompa de Fal·lopi. A mesura que es va desenvolupant el zigot, es va desplaçant cap a la cavitat uterina, gràcies a uns cilis que recobreixen la part interna de les trompes de Fal·lopi. Durant el seu desplaçament, el zigot es va dividint per mitosis, augmentant el nombre de cèl·lules. Al cap d'una setmana arriba a l'úter, destruint la zona pel·lúcida que l'envolta i penetrant a l'interior del teixit endometrial que revesteix la part interna de l'úter. Aquesta fase rep el nom d'implantació. L'endometri crea l'entorn adequat perquè l'embrió es pugui desenvolupar correctament. Un cop el zigot ha estat implantat continua dividint-se originant l'embrió. En aquest procés també hi ha la formació d'un òrgan anomenat placenta que constitueix una membrana que rodeja externament l'embrió, amb la funció de barrera defensiva, d'aport O_2 i substàncies nutritives a l'embrió, i de filtre per eliminar el CO_2 i els productes residuals ⁽²⁾.

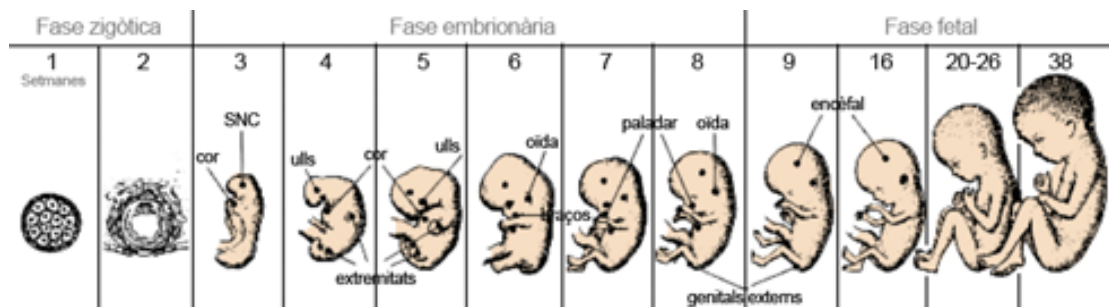


Figura 6, esquema del desenvolupament embrionari: diagrama que reproduïx el procés de formació del fetus a partir de la implantació del blastocist en l'endometri. Aquest procés dura unes 38 setmanes i es poden distingir tres fases diferenciades: la fase zigòtica, la fase embrionària i la fase fetal.

1.2.4. El part

Procés pel qual es dona la expulsió d'un fetus viable fora dels òrgans genitals. Aquest procés esdevé, aproximadament, uns 270 dies després de la fecundació. La fisiologia del part esta regulada hormonalment i consta de tres fases: **1) primera etapa:** l'úter es contrau, i el coll uterí, en la seva part baixa, es dilata per permetre el pas del fetus. Té una duració de 8 a 16 hores; **2) segona etapa:** és la sortida del fetus a l'exterior. Les contraccions de l'úter cada vegada més freqüents i fortes, provoquen la sortida del fetus a l'exterior. Té una duració de 20 minuts a una hora; i **3) tercera etapa:** és l'expulsió de la placenta a l'exterior. Després del part, l'úter es contrau, tancant l'hemorràgia ⁽²⁾.

1.2.5. La menopausa

La menopausa és una situació fisiològica de l'aparell reproductor femení, en la qual es posa fi a l'etapa reproductiva de la dona, s'atura la funció dels ovaris i per tant la producció d'òvuls després d'un període de manca de flux menstrual d'un any. En sentit estricte la menopausa, significa l'últim cicle menstrual que sol aparèixer entre els 45 i els 55 anys, malgrat que en alguns casos pot donar-se abans dels 45 (menopausa precoç) o bé després dels 55 (menopausa tardana). És habitual utilitzar la paraula "menopausa" en referència al que realment és el climateri, és a dir, el període que agrupa els anys previs i posteriors a aquest últim cicle menstrual. La menopausa també comporta el cessament de la producció d'estrògens i l'aparició d'una sèrie de símptomes, més o menys benignes, que es poden pal·liar i/o prevenir. L'endometri en aquesta etapa, al desaparèixer el cicle menstrual, es transforma en un epiteli atròfic, monocapa amb una escassa capacitat proliferativa ⁽²⁾.

1.3. Regulació de l'aparell reproductor femení

El procés reproductiu de la espècie humana depèn primàriament de l'ovulació regular d'un oòcit madur en la meitat exacte de cada cicle menstrual. La iniciació i manteniment d'aquest complex procés depèn de la integritat anatòmica i funcional de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gonadal i dels estímuls aferents d'altres sistemes reproductius secundaris, com les glàndules tiroides, suprarenal, fetge, pàncrees i ronyó; implicades en el metabolisme dels esteroides sexuals. En estat d'homeòstasi l'activació funcional de l'eix hipotàlem-hipòfisi-gonadal es deu a la secreció pulsativa de l'hormona alliberadora de gonadotropines GnHR.

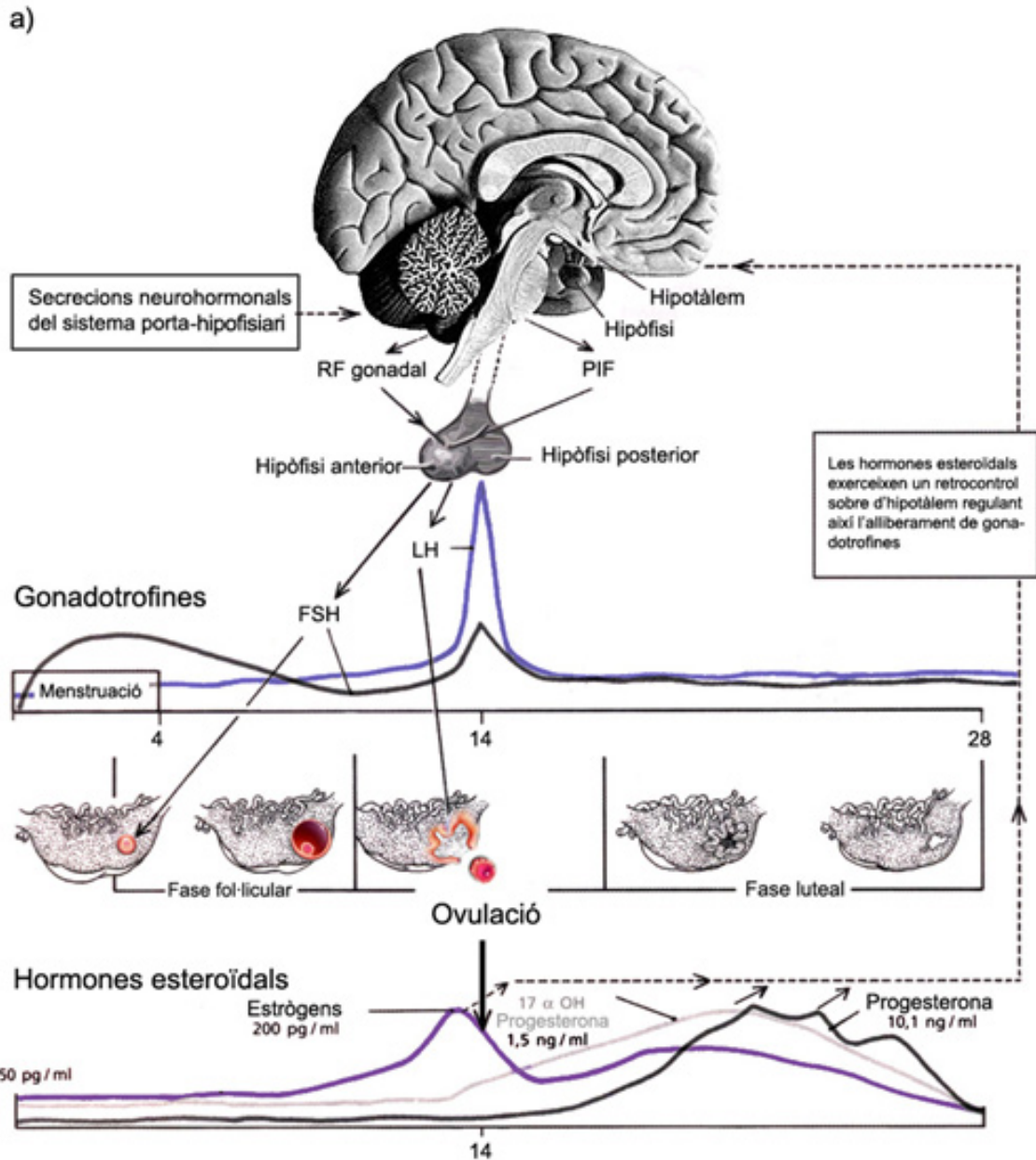


Figura 7a, esquema de la regulació hormonal del cycle menstrual: l'esquema de regulació il·lustra la relació entre el sistema porta-hipofisiari, el cycle ovàric i el cycle endometrial. L'hipòfisi és la glàndula encarregada de l'alliberament de les hormones FSH (responsable de la maduració dels fol·licles) i LH (el pic d'alliberament d'LH permet la sortida de l'òvul del fol·licle en el procés d'ovulació). El cycle ovàric és el responsable de la regulació de l'alliberament de les hormones esteroidals. Els estrògens permeten l'engruiximent de l'endometri (endometri proliferatiu). En produir-se l'ovulació decauen els nivells d'estrògens i augmenten els nivells de progesterona, que és l'hormona responsable de la maduració de l'endometri (endometri secretor) per tal d'acollir el producte de la concepció.

La GnHR estimula la hipòfisi a la producció i alliberament de les hormones gonadotropines FSH i LH les quals estimulen la producció de les hormones esteroidals per part de l'ovari, a

més s'encarreguen de la regulació del cicle ovàric. Les hormones esteroïdals exerceixen un retrocontrol sobre l'hipotàlem regulant així l'alliberament de gonadotropines ^(2, 4).

1.3.1.1. Les hormones esteroïdals

1) **Estrògens:** components del grup de les hormones esteroïdals. Es diferencien pel fet que presenten un anell (A) aromàtic, com el cas d'un dels representants més importants d'aquest grup, el 17- β estradiol. Els estrògens són responsables del desenvolupament dels caràcters sexuals femenins secundaris i dels canvis cíclics de l'epiteli de la vagina i del teixit endometrial. Els estrògens s'originen a partir de l'aromatització de la testosterona per part de l'aromatasa ^(2, 4).

2) **Progesterona:** hormona esteroïdal implicada en la regulació de la fisiologia sexual femenina. Pot existir en dues formes, segons la configuració del carboni 17, anomenades A i B, les quals mostren idèntica activitat fisiològica. La progesterona és obtinguda per síntesi parcial a partir de l'estigmasterol i el colesterol. És una hormona gonadotropa present en el lòbul anterior de la glàndula pituïtària. Estimula la producció de testosterona la qual per aromatització es converteix en estrògen en els fol·licles de Graaf. La progesterona té la funció de preparar per a la fecundació l'epiteli vaginal, el moc cervical i l'endometri, així com el manteniment de l'embaràs ^(2, 4).

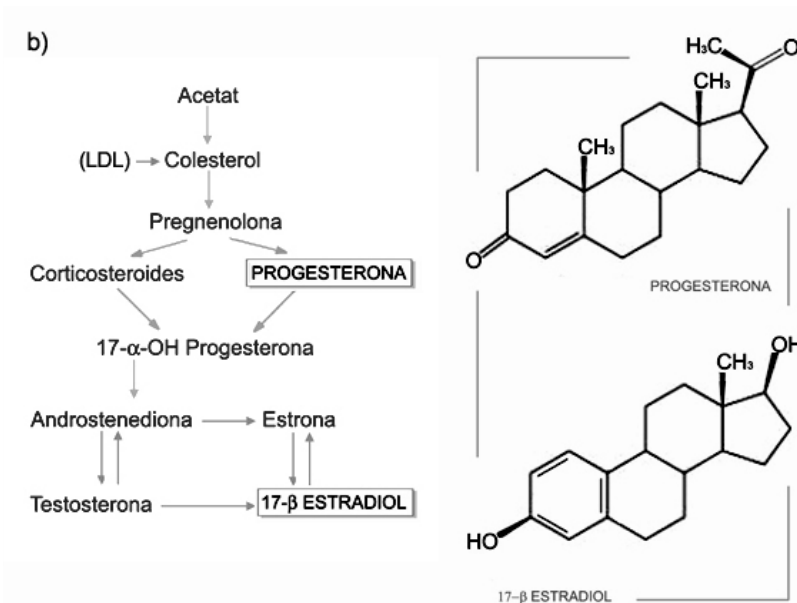


Figura 7b, ruta de síntesi i fórmula química de les hormones esteroïdals: A l'esquerra de la fig. es mostra la ruta biosintètica de les hormones esteroïdals. La síntesi parteix tant del colesterol obtingut a partir de l'acetat com del colesterol circulant en les LDL. La progesterona és la primera hormona que s'obté en la ruta, s'origina a partir de pregnenolona. El 17- β estradiol, estrogen majoritari, s'obté a partir de l'aromatització de la testosterona, també es pot obtenir pel catabolisme de l'estrona. A la dreta de la fig. es mostra la fórmula química de la progesterona i el 17- β estradiol.

2. Endometri: anatomia, morfologia i funció

2.1. L'úter: òrgan genital femení

La matriu o úter és un òrgan intrapèlvic accessori de la reproducció sexual, imparell, buit, periforme, de paret muscular, d'uns 8 cm de longitud, 5 cm d'amplada a l'extrem superior i d'uns 2,5 cm de gruix de mitjana. En condicions normals té un pes aproximat de 50 gr, però pot sofrir canvis importants al llarg de les gestacions. La matriu es l'òrgan responsable de proporcionar un entorn adient per al desenvolupament fetal.

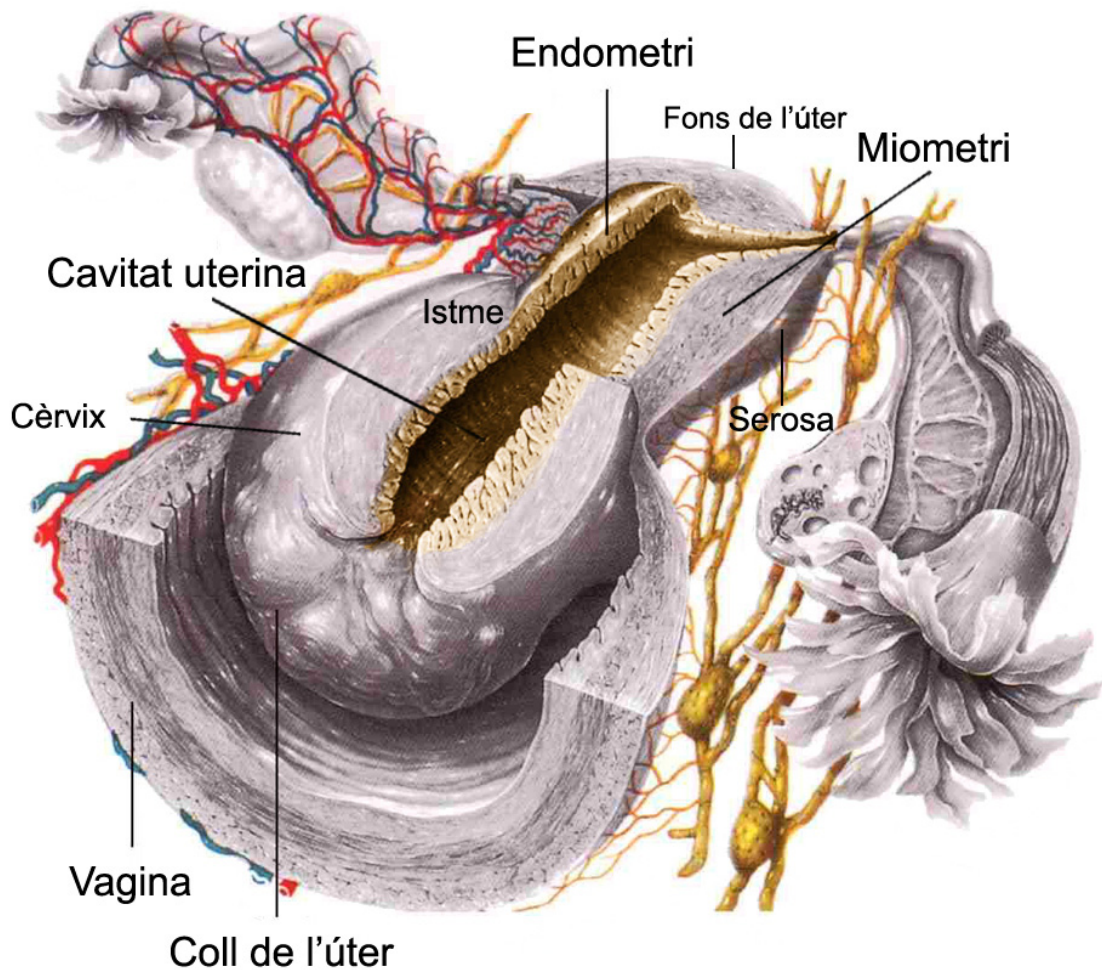


Figura 8, esquema de l'úter: imatge que es detalla l'anatomia de l'úter. L'úter forma una cavitat virtual en el seu interior que es troba revestida pel teixit endometrial. L'endometri es sustenta sobre el miometri, teixit muscular que determina la morfologia de l'úter. A la part inferior l'endometri es troba delimitat pel cèrvix.

La matriu està constituïda per quatre porcions anatòmiques: **1)** cos: és la part central de la matriu en la qual hom pot distingir dues cares, l'anterior o *facies vesicalis* i la posterior o *facies intestinalis*; **2)** fons: porció superior i arrodonida de la matriu, situada a l'extrem i entre les trompes de Fal·lopi; **3)** l'istme: és la part estreta de l'úter, d'uns 2 a 3 cm d'amplada, localitzada entre el cos de la matriu i el cèrvix i **4)** cèrvix: part cilíndrica d'uns 2 a 3 cm de longitud que es troba delimitada per l'istme a la part superior i per la vagina a la inferior.

L'úter està organitzat en tres capes principals, que estructurades de l'interior a l'exterior són: **1)** La mucosa o endometri: capa llisa i suau que constitueix el recobriment intern de l'úter **2)** la muscular o miometri: capa que es troba formada per fibres musculars llises i constitueix la porció principal de la paret uterina i **3)** la serosa o perimetri: consisteix en el teixit peritoneal, que es troba fortament adherit al fons i al cos uteri⁽³⁾.

2.2. Endometri: morfologia i histologia

Etimològicament el terme endometri prové del grec, construït a partir de la forma prefixada del mot grec *éndon* (dins, intern) i la forma sufixada del mot grec *métra* (úter). Hom pot definir l'endometri, doncs, com el teixit que constitueix la paret interna mucosa de la matriu, que es troba delimitada pel component muscular, el miometri. La principal característica de l'endometri és el comportament dinàmic del teixit que radica en la perfecta resposta als estímuls de les hormones ovàriques. Aquesta resposta es tradueix en importants canvis morfològics que condueixen a la seva descamació cada 28 dies. Aquests canvis morfològics constitueixen l'anomenat cicle menstrual⁽¹⁾.

En l'estructura histològica de l'endometri s'han de considerar tres elements constitutius: **1)** L'epiteli columnar simple amb cilis superficial; **2)** Les glàndules tubulars simples; i **3)** El component estromal (Fig. 9).

Atès el caràcter dinàmic d'aquest teixit, com a conseqüència de les variacions dels nivells hormonals hipofisaris ovàrics, cal diferenciar diversos tipus d'endometris segons l'estat del cicle menstrual en: endometri secretor, endometri en la fase descamativa, endometri gestacional, endometri proliferatiu i endometri atròfic.

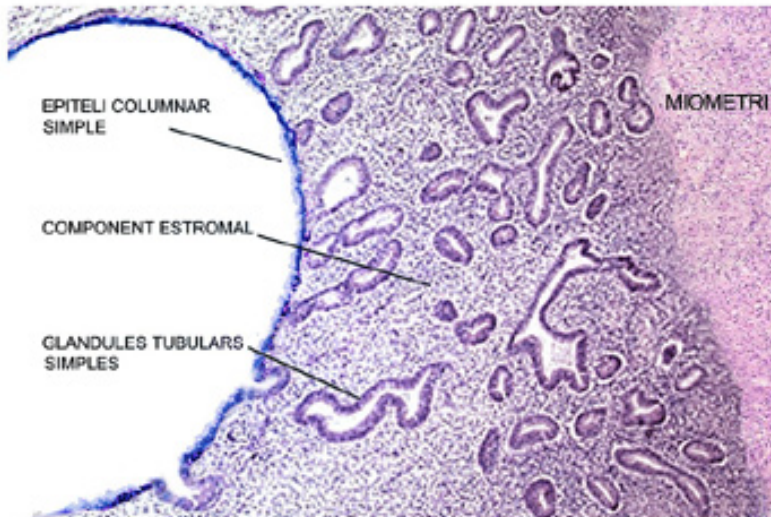


Figura 9, imatge de la histologia de l'endo-metri: tall histològic de teixit endometrial, tenyit amb hematoxilina/eosina, en el qual s'observen tres components: l'epiteli columnar simple a la superfície, el component estromal i les glàndules tubulars simples. L'estroma n'és el component majoritari i sustenta les glàndules i l'epiteli de superfície. El teixit contigu de l'endometri és el miometri, que presenta una morfologia semblant a l'estroma endometrial.

2.2.1. Endometri proliferatiu

Teixit endometrial que té la capacitat de créixer i augmentar el gruix a conseqüència de l'estimulació hormonal, i que es troba present durant el període que correspon a la fase del cicle anterior a l'ovulació (fase fol·licular) (del dia 4 al 14). L'endometri proliferatiu està constituït per glàndules endometrials rectilínies delimitades per cèl·lules que presenten una marcada pseudoestratificació nuclear i figures de mitosi. L'estroma és predominantment dens amb cèl·lules d'escàs citoplasma ⁽²⁾.

2.2.2. Endometri secretor

Teixit endometrial present durant la fase de secreció del cicle menstrual, que correspon a la fase del cicle posterior a l'ovulació (fase lúcia) (del dia 15 al 28). Constituït per glàndules endometrials molt serrades amb secreció luminal i estroma amb transformació predecidual, i que pot arribar a un gruix d'uns 8 mm. El teixit endometrial en aquesta fase presenta un fenomen molt peculiar, que consisteix en l'aparició de vacúols subnuclears al pol basal de les cèl·lules que contenen glucogen i mucopolisacàrids. Durant aquesta fase els vacúols es dirigeixen a la llum de la glàndula, on són secretats. És en aquest tipus de teixit endometrial on es dona la fase denominada finestra d'implantació del blastocist, que s'estén del dia 20 al 24 del cicle, on hi ha la màxima receptivitat endometrial ⁽²⁾. L'estroma dens al principi, esdevé adenomatós i apareixen les anomenades arterioles espirals. Les cèl·lules de l'estroma

augmenten el seu citoplasma i adopten una forma cúbica, en un fenomen anomenat decidualització.

2.2.3. Endometri en la fase descamativa

Les modificacions endometrials descrites tenen com a objectiu final obtenir un bon substrat per la niació del blastocist. Si l'òocit no ha estat fecundat té lloc la descamació menstrual de l'endometri. Histològicament, la descamació no és uniforme. En iniciar-se s'observa una certa dissociació estructural, on també s'observa una marcada infiltració leucocitària, juntament amb hemorràgia i signes de necrosi. La fase descamativa és la fase en la qual s'inicia el cicle menstrual i comprèn del dia 1 al 4. Com a conseqüència dels estímuls hormonals l'endometri es regenera a partir d'un fragment, anomenat basal, que no presenta descamació.

A part dels tipus d'endometri que es poden trobar durant les fases del cicle menstrual, també cal citar dues altres condicions en les quals hom troba un tipus d'endometri histològicament diferent però tanmateix important ⁽²⁾.

2.2.4. Endometri gestacional

En el cas que el blastocist s'implanti a l'endometri i prolifereix, el quadre hipertròfic i secretor, tant glandular com de l'estroma, es fa més destacat. Les glàndules es troben formades per un epitel·li baix i ric en glucogen. Les cèl·lules de l'estroma es tornen grans i poligonals, amb un ampli citoplasma que constitueix les típiques cèl·lules decidues disposades en forma de mosaic ⁽²⁾.

2.2.5. Endometri atròfic

La transició de l'etapa reproductiva de la dona a la no reproductiva s'anomena climateri. Al llarg d'aquesta transició el teixit endometrial pateix importants modificacions histològiques. A més, en aquesta etapa l'endometri perd la capacitat de proliferació. La principal causa d'aquestes modificacions és la disminució de la secreció d'estrògens i progesterona, hormones responsables de l'evolució de l'endometri durant el cicle menstrual. L'endometri atròfic té un gruix d'1 a 3 mm i s'anomena atròfic per la poca activitat mitòtica que presenta. Histològicament l'endometri continua essent constituït per tres components: 1) l'epitel·li columnar simple amb cilis; 2) les glàndules tubulars, on el teixit epitelial queda reduït a un

teixit monocapa, i les glàndules perden la morfologia ramificada organitzant-se de forma esfèrica. Les cèl·lules en aquest teixit tenen una escassa activitat mitòtica amb un nucli reduït i inactiu i 3) el component estromal que esdevé el més abundant presenta una morfologia densa i fibrosa amb cèl·lules fines i allargades, i presenta una coloració blanca característica ⁽²⁾.

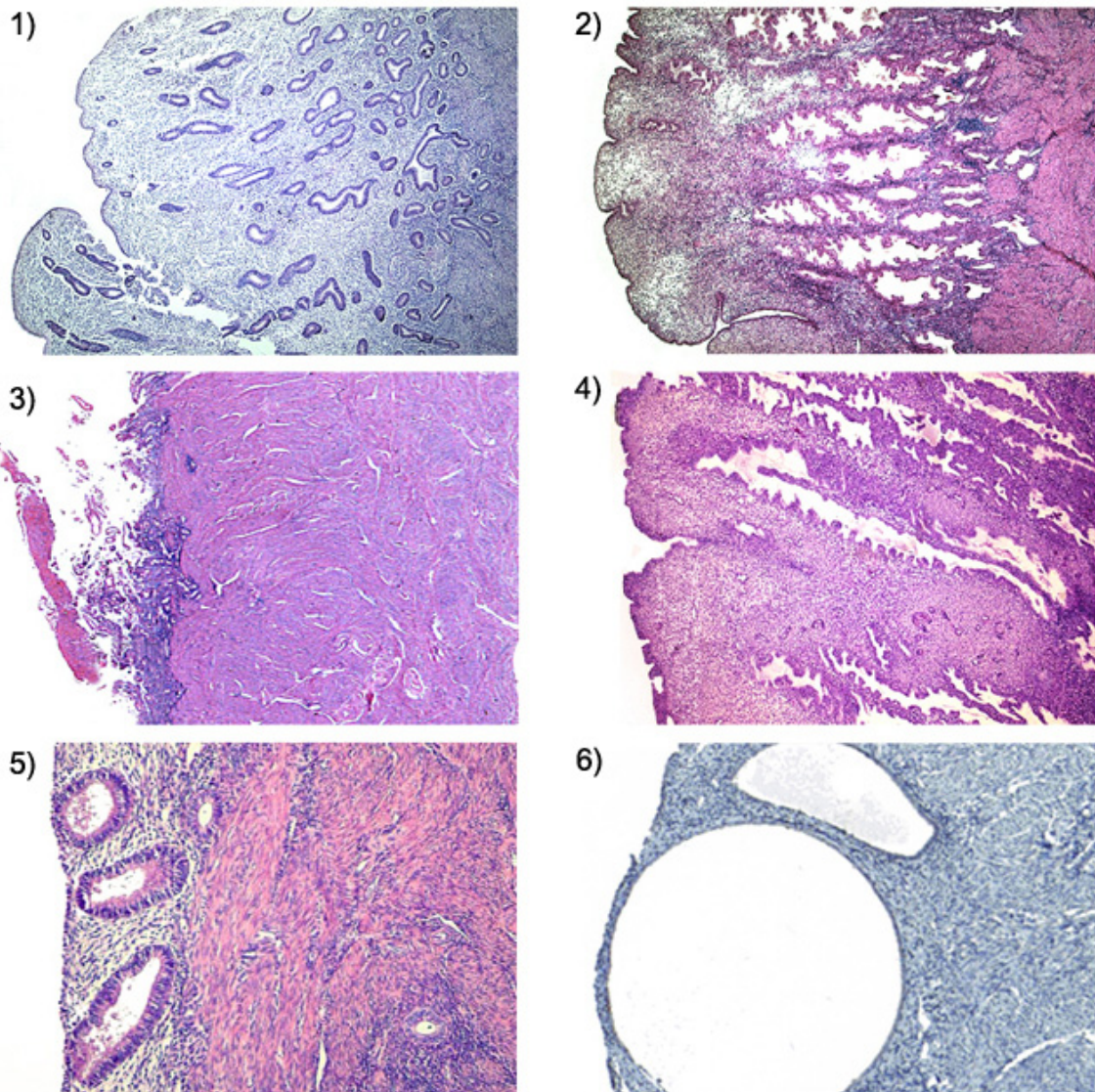


Figura 10, composició d'imatges de diferents tipus d'endometris: la fig. mostra 6 talls histològics de diferents tipus d'endometris, tenyits amb hematoxilina/eosina, en condicions fisiològiques normals. 1) endometri proliferatiu; 2) endometri secretor; 3) endometri en fase descamativa; 4) endometri gestacional; 5) endometri atròfic perimenopàusic; i 6) endometri atròfic.

2.3. Cicle endometrial: funció, fases i regulació

El cicle endometrial va ser descrit per primera vegada el 1908 per Hitschmann i Adler i es caracteritza per una resposta als estímuls hormonals ovàrics per part de l'endometri. Aquesta resposta es tradueix en importants canvis morfològics que condueixen a la seva descamació al cap de 28 dies.

El cicle comprèn tres parts: **1)** proliferativa o preovulatòria, **2)** secretora o postovulatòria i **3)** descamativa, menstrual o hemorràgica. Les tres fases del cicle endometrial es troben altament lligades amb les tres fases del cicle ovàric: la fase fol·licular, l'ovulació i la fase lútea, i mantenen una estreta coordinació que té com a objectiu final poder allotjar el producte de la concepció, és a dir afavorir la consecució del procés de gestació.

La regulació del cicle endometrial està governada per l'acció directa dels esteroides sexuals: els estrògens indueixen creixement i proliferació de les glàndules, l'epiteli i l'estroma en la primera fase del cicle, la fase proliferativa (del dia 5 al 14). El pic d'alliberament d'estrògens es dona al voltant del dia 14, moment en què es produeix el fenomen de l'ovulació. La progesterona determina els canvis secretors de la segona fase del cicle, la fase secretora (del dia 15 al 28), en la qual l'endometri es prepara per ser un teixit altament nutritiu i confortable per tal que es pugui dur a terme la niació de l'oòcit fecundat. Si no es dona el procés de la fecundació i per tant no hi ha implantació de l'oòcit madur (del dia 21 al 24, "finestra d'implantació") hi ha una disminució dels nivells de progesterona que activa la fase descamativa de l'endometri (del dia 0 al 4). Aquesta fase comença amb la vasoconstricció i isquèmia provocades per un augment de l'activitat de les prostaglandines i una descamació del teixit a causa de l'activació de diferents proteases (MMPs) i citoquines ⁽⁵⁾.

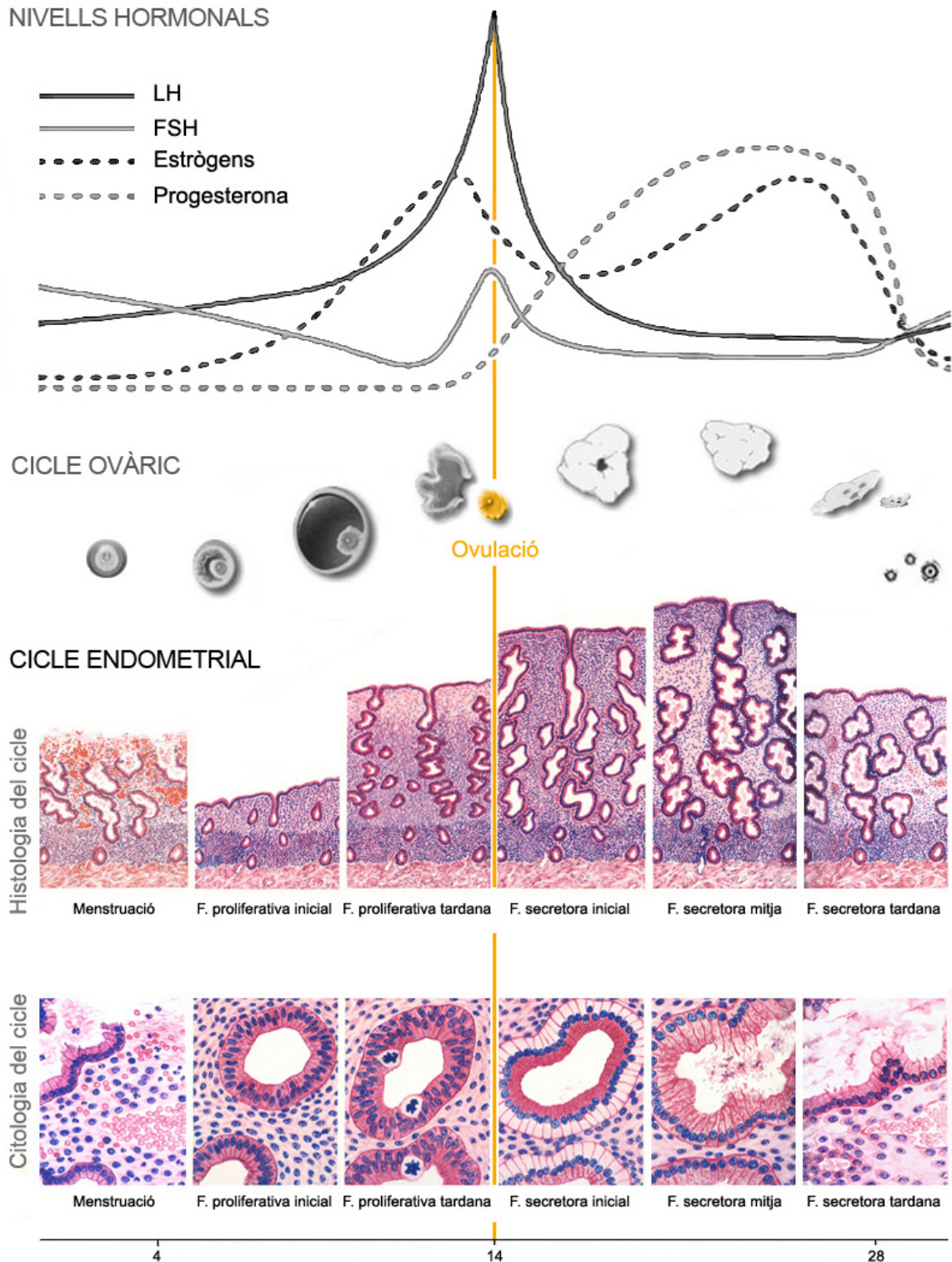


Figura 11, esquema de regulació del cicle endometrial: la regulació del cicle endometrial, està estretament lligada al cicle ovàric. L'inici del cicle endometrial es fixa en la menstruació, seguit per un engruïment del teixit, l'endometri proliferatiu (dia 4-14), i continuant amb la maduració del teixit que forma l'endometri secretor (dia 15-28)., Si no s'ha portat a terme la implantació de l'òocit fecundat, l'endometri secretor es degrada i s'inicia un nou cicle. A la part mitja de la fig. s'observa la histologia de l'endometri en cadascuna de les etapes del cicle. A la part inferior es mostra la citologia corresponent a cadascuna de les etapes. Destaca la formació de vacuòls en l'endometri secretor que es desplacen cap a l'interior de la glàndula.

3. Carcinoma endometrial

El teixit endometrial, per a desenvolupar la seva funció correctament, està sotmès a un procés molt complex de regulació. Aquest procés és el resultat de la coordinació dels diferents tipus cel·lulars que en formen part i de l'equilibri entre els factors reguladors d'estimulació i els factors reguladors d'inhibició, principalment hormones com els estrògens i la progesterona.

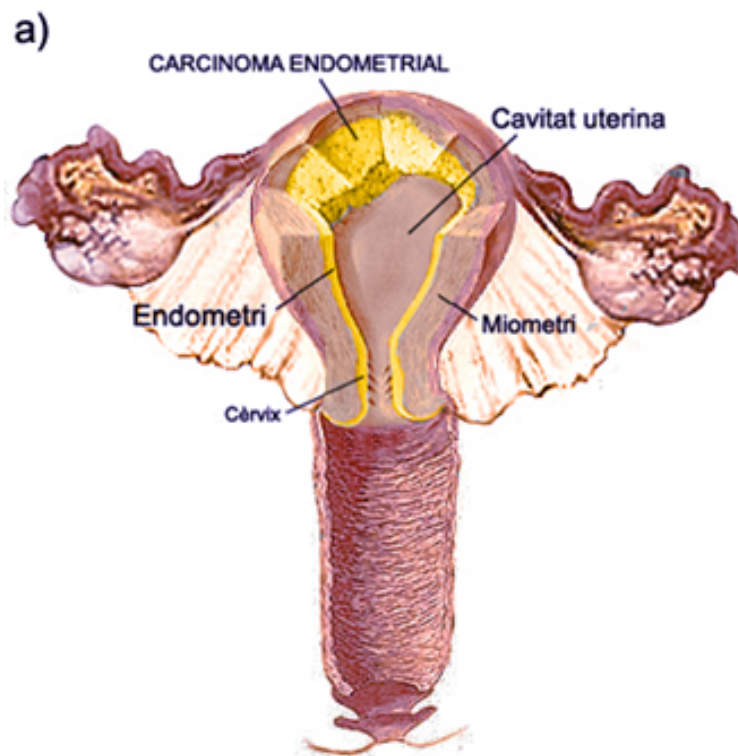
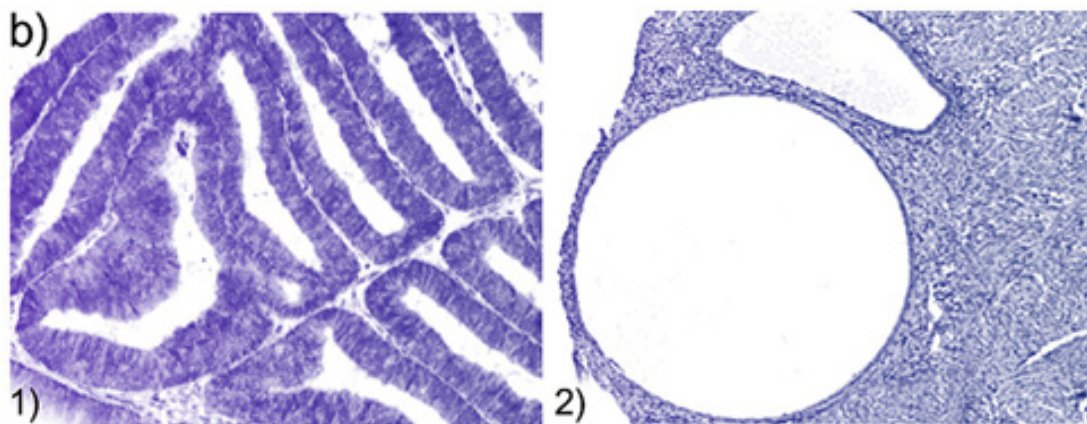


Figura 12a, esquema del càncer endometrial: la fig. mostra l'engruiximent que succeeix en la paret de l'endometri quan es desenvolupa el carcinoma endometrial. És freqüent que el carcinoma endometrial creixi col·lapsant la cavitat endometrial.

Figura 12b, comparació histològica de l'EEC amb l'EA: 1) carcinoma endometrioides (EEC); 2) endometri normal atròfic (EA). La comparació dels talls histològics, tenyits amb hematoxilina, mostra com el carcinoma endometrial envaeix l'estroma, que arriba gairebé a desaparèixer. Cal destacar la morfologia aberrant de les glàndules endometrials tumorals que presenten una forma esfèrica i estan constituïdes per un epitel·li monocapa.



Els elements que modulen el creixement i la proliferació cel·lular poden ser susceptibles de presentar alteracions, ja sigui d'origen genètic o ambiental, les quals poden comportar una alteració del procés normal de regulació del teixit endometrial i, per tant, conduir a l'aparició, establiment i/o desenvolupament de la patologia tumoral.

3.1. Epidemiologia i patogènesi

La primera descripció del càncer uterí de la qual es té constància prové d'un metge bizantí d'Alexandria anomenat Paul d'Aegina (625-690) que va escriure un compendi de set llibres de medicina en què es referia al càncer en general i en particular al càncer d'úter i de mama. Metge avançat als seus temps, va descriure l'extirpació de l'úter com a teràpia contra la patologia tumoral (Fig. 13). Actualment el carcinoma endometrial és la tercera neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats i representa el primer tipus de càncer més comú en el tracte genital femení. La incidència a nivell mundial és d'uns 150.000 nous casos diagnosticats per any ⁽⁶⁾, i a l'estat espanyol la incidència anual és de 7-13 nous casos diagnosticats per cada 100.000 habitants (Societat Espanyola de Ginecologia Oncològica S.E.G.O.) ⁽³⁾. A l'hospital Vall d'Hebron es van diagnosticar i tractar 609 casos en el període comprès entre el 1995 i el 2004 (Servei de Ginecologia de l'hospital Maternoinfantil de la Vall d'Hebron (HMI-VH)). Malgrat l'elevada incidència, la patologia endometrial presenta una baixa mortalitat (16,5% dels casos), principalment a causa de la seva detecció precoç, que en molts casos ve associada a metrorràgia i al fet que s'origina en la cavitat del cos uterí, amb la qual cosa el carcinoma queda delimitat per un receptacle de fàcil extracció quirúrgica per histerectomia ⁽⁷⁾. L'edat més freqüent d'aparició del carcinoma endometrial és entre els 55 i els 59 anys i només un 20% dels casos es diagnostiquen en la premenopausa, essent excepcionals abans dels 40 anys ⁽⁸⁾. El 97% de tots els càncers uterins s'originen a partir de les glàndules de l'endometri, raó per la qual rep el nom de carcinoma ⁽⁹⁾. El carcinoma endometrial es pot subdividir segons el tipus histològic en carcinomes endometrioides o de tipus I, amb una incidència del 85% dels casos, i els no endometrioides o de tipus II, dins el qual s'agrupen la resta dels tipus histològics (el carcinoma papil·lar serós i el de cèl·lules clares en són els tipus principals) ⁽¹⁰⁾. Cal destacar que el carcinoma de tipus endometrioides és hormonodependent i normalment ve precedit per una hiperplàsia simple i complexa, tot fent que els factors relacionats amb la hiperplàsia esdevinguin rellevants per a l'epidemiologia del carcinoma endometrial. El carcinoma no endometrioides o de tipus II, menys freqüent que el

de tipus I, no és hormonodependent ni està precedit per lesions preneoplàsiques precursors. Per això cada vegada pren més cos la teoria que parla d'un model genètic dualístic que explicaria els diferents tipus de carcinomes endometrials ⁽¹¹⁾.



Figura 13, escrits de Paul d'Aegina: Paul d'Aegina (620-690) metge bizantí que escrigué el tractat *Epitomes iatrikes biblio hepta*, més conegut en llatí com *Epitomae medicae libri septem* (Compendi mèdic de set llibres). Durant molts anys aquest tractat va contenir la totalitat del coneixement mèdic que es tenia fins aleshores a l'imperi Bizantí. El llibre de cirurgia, en particular, va esdevenir un referent a Europa i al món Àrab durant l'edat mitja. En els seus escrits es referia per primera vegada a la patologia del càncer uterí i en determinava l'extirpació com a teràpia eficaç. En el llibre de cirurgia es descriu en detall el mètode d'extirpació de l'úter. La imatge mostra una plana dels escrits originals en grec del llibre de cirurgia (Biblioteca de Modena).

3.2. Etiologia i aspectes genètics

L'etiologia del carcinoma endometrial no és del tot clara. Fins ara se sap que el carcinoma endometrial de tipus I o endometrioide, el més comú dels carcinomes endometrials, té el seu origen en la proliferació anormal de les cèl·lules de l'epiteli columnar de les glàndules, com a resposta a una estimulació estrogènica excessiva. Així doncs, es dedueix que un dels principals factors causants d'aquesta patologia és una descompensació dels nivells d'estrògens, que estimulen de manera excessiva l'endometri tot provocant una hiperplàsia que pot desencadenar una proliferació tumoral ⁽⁹⁾.

3.2.1. Factors de risc

Principals factors de risc relacionats amb la descompensació dels estrògens vers la progesterona: Factors relacionats amb un elevat índex de massa corporal, factors reproductius i de contracepció i factors relacionats amb la teràpia hormonal.

3.2.1.1. Factors relacionats amb un elevat índex de massa corporal (IMC)

La **obesitat**; si hi ha una acumulació excessiva de lípids en el teixit adipós es produeix una conversió interna, per part de l'aromatasa, d'androstendiona a estrona, que és un precursor biològicament actiu de la ruta biosintètica dels estrògens ⁽¹²⁾. Hi ha dos altres factors de risc, la **diabetis** i la **hipertensió**, molt relacionats amb la obesitat. S'ha hipotetitzat un possible efecte sinèrgic entre la obesitat i la diabetis gràcies a l'acció conjunta dels estrògens i la insulina, factors endocrins amb un paper important en altres càncers d'origen hormonal ⁽¹³⁾. La hipertensió no sembla un factor de risc independent en el carcinoma endometrioide però pot incrementar el risc conjuntament amb la obesitat ⁽¹⁴⁾.

3.2.1.2. Factors reproductius i de contracepció

Menarquia precoç i menopausa tardana; aquest dos fets comporten una exposició més llarga de l'endometri a l'acció dels estrògens durant l'edat reproductiva de la dona. L'**anovulació**; la manca d'ovulació comporta que l'endometri estigui menys exposat a l'efecte de la progesterona que interromp la proliferació de l'endometri; per tant, histològicament l'endometri roman en l'etapa proliferativa del cicle menstrual; etapa on hi ha els màxims nivells d'estrògens (síndrome d'Stein-Leventhal). La **nul·liparitat**; durant la gestació s'interromp la síntesi d'estrògens i augmenta la síntesi de progesterona. La nul·liparitat impedeix la interrupció temporal de la síntesi d'estrògens. Els **anticonceptius orals**; productes rics en estrògens, el risc depèn de la dosi, segons la quantitat i duració del període d'administració ⁽¹⁵⁾.

3.2.1.3. Factors relacionats amb la teràpia hormonal

Tractaments hormonals terapèutics; el tamoxifè s'utilitza com a tractament adjuvant en càncers de mama. Aquest fàrmac és un agent antiestrogènic sintètic, però té uns efectes semblants als dels estrògens a l'endometri, estimulant la proliferació.

Tractaments hormonals substituïtoris; fàrmacs rics en estrògens que s'utilitzen per suplir el decrement hormonal que comporta la menopausa ⁽¹⁶⁾.

L'etiologia del carcinoma endometrial no endometriode (hormonoindependent) encara roman desconeguda; recentment s'ha demostrat una probabilitat més alta d'aneuploïdia en aquest tipus de carcinomes que en els de tipus endometriode ⁽¹⁷⁾.

Tot aquest conjunt de factors de risc potencia un augment dels nivells hormonals d'estrògens que estimulen la proliferació de l'endometri. Per tant la sobreexposició estrogènica que té lloc a l'endometri augmenta la possibilitat de desenvolupar càncer endometrial. Aquesta teoria, però, no explica tots els casos, i a més hi ha tot el grup de càncers hormonoindependents. Així, doncs, calen nous estudis que complementin aquesta teoria o proposar noves teories alternatives.

3.2.2. Factors hereditaris

Durant els darrers 10 anys ha estat identificat un component hereditari en certs carcinomes endometrials. Molts dels carcinomes endometrials hereditaris es donen en famílies amb càncer colorectal no polipòsic hereditari (HNPCC) o síndrome de Lynch II ⁽¹⁸⁾. S'ha trobat que el càncer d'endometri és el segon càncer més freqüent en dones que presenten mutacions en els gens de l'HNPCC, gens relacionats amb la correcció d'aparellaments erronis del DNA (MMR) amb una afectació de més del 40% dels casos ^(19, 20).

En les revisions més recents s'ha proposat que el carcinoma endometrial s'hauria de dividir en dos subtipus patogenètics diferents: els dependents d'estrògens, endometrioides o de tipus I i els independents d'estrògens, no endometrioides o de tipus II, amb pronòstics diferenciats. S'ha suggerit que el carcinoma endometrial en dones que presenten una predisposició genètica s'hauria de classificar en un tercer subtipus, el qual es diagnostica a edats joves i pot estar relacionat o no amb els estrògens ^(1, 21-23).

3.3. Història natural del carcinoma d'endometri

El carcinoma endometrial és un tipus de carcinoma amb una tumorigènesi complexa ja que pot originar-se en un endometri normal, en un endometri atrofic o en un endometri amb hiperplàsia (lesió premaligna). Diversos estudis suggereixen almenys dos mecanismes relacionats amb l'aparició de la carcinogènesi endometrial. En moltes pacients existeix una

història de sobreexposició a estrògens; els tumors en aquestes pacients comencen com una hiperplàsia endometrial i progressen a carcinoma ⁽²³⁾. En altres dones, el carcinoma apareix espontàniament sobre un endometri atròfic, sense una relació clara amb la transició d'hiperplàsia a carcinoma. Aquestes presentacions clíniques diferents reflecteixen dos grups de carcinomes endometrials: carcinomes de tipus endometriode, clarament relacionats amb l'estimulació estrògena (carcinomes endometrials dependents d'estrògen), que presenten una diferenciació i pronòstic millors i els carcinomes no endometriodes, que no tenen relació amb l'estimulació estrogènica (carcinomes endometrials independents d'estrògens) i que estan menys diferenciats i presenten un pronòstic pitjor ^(24, 25). El coneixement actual que no tots els carcinomes endometrials deriven d'hiperplàsia i que no totes les hiperplàsies progressen a neoplàsia origina noves perspectives en l'estudi d'aquesta patologia. No obstant això, la hiperplàsia endometrial continua essent considerada com un important precursor del carcinoma endometrial.

3.3.1. Lesions precursors (Hiperplàsies endometrials)

El concepte d'hiperplàsia endometrial implica la presència d'una proliferació anormal de l'endometri, tant del component estromal com del glandular, encara que el que predomina és clarament aquest últim. L'estudi histològic de la hiperplàsia en permet el diagnòstic i la classificació, que es basa en la complexitat arquitectural de la proliferació endometrial i la presència o absència d'atípies. L'estudi del patró arquitectural diferencia dos grans grups: hiperplàsia simple i hiperplàsia complexa. A aquesta classificació cal afegir-li un segon criteri morfològic que determina la presència o absència d'atípia.

3.3.1.1. Hiperplàsia simple (HS)

Es produeix quan existeix una relació glanduloestromal augmentada. L'endometri és més gruixut que en condicions normals amb glàndules més dilatades i agrupades i amb majors invaginacions i projeccions. L'estroma presenta una densitat cel·lular més gran que habitualment i algunes cèl·lules espumoses, però és escàs en relació a la superfície ocupada per les glàndules (Fig. 14).

3.3.1.2. Hiperplàsia complexa (HC)

Aquest tipus d'hiperplàsia presenta dues característiques que la diferencien de l'HS: per una banda la morfologia de la glàndula, arquitecturalment complexa, amb una disposició d'esquena contra esquena (*back to back*) i per l'altra l'aparició de papil·les intraluminals. És freqüent la pseudoestratificació, amb una estructura de dues a quatre capes cel·lulars (Fig. 14).

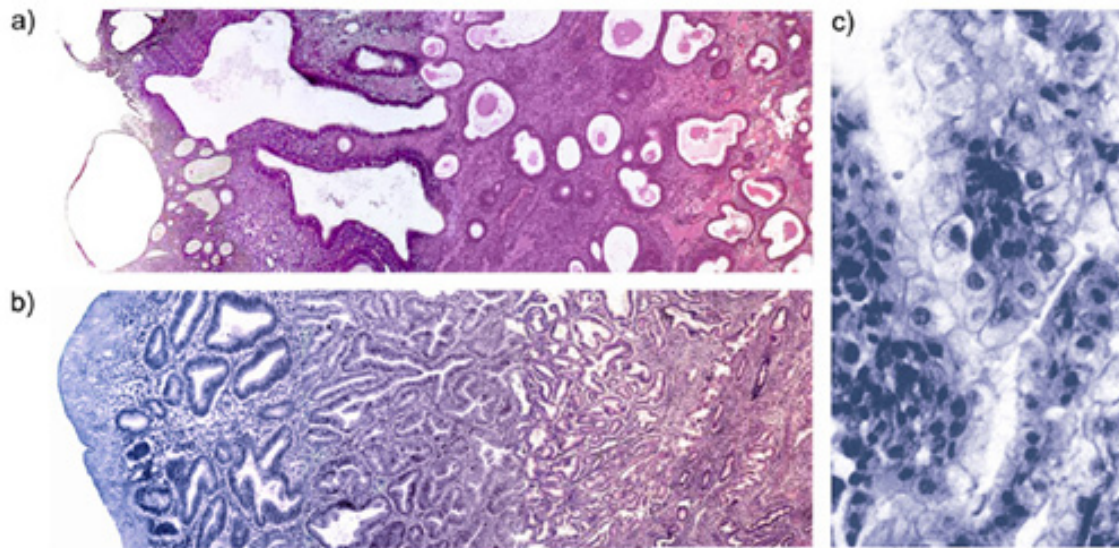


Figura 14, composició d'imatges d'HS, HC i HA: talls histològics de lesions preneoplàsiques d'endometri tenyits amb hematoxilina/eosina. 1) hiperplàsia endometrial simple; 2) hiperplàsia endometrial complexa; i 3) hiperplàsia amb atípia. Observi's la similitud de les glàndules endometrials de l'HC amb el carcinoma endometrial.

3.3.1.3. Hiperplàsia amb presència d'atípies

L'estudi de la presència d'atípia cel·lular és l'altre criteri clínic pel qual hom agrupa les hiperplàsies. L'aparició d'atípies a les hiperplàsies és independent de llur patró arquitectural. La hiperplàsia atípica es caracteritza per la presència d'atípies citològiques a les glàndules endometrials. Pot trobar-se associada a un patró d'hiperplàsia simple tot i que habitualment l'arquitectura histològica és complexa. Les cèl·lules atípiques que tamisen les glàndules endometrials són més grans, presenten hiperchromatisme nuclear, tenen un nucli irregular quant a la mida i a la forma, llur membrana nuclear és més gruixuda i presenten acumulacions

de cromatina ⁽²⁾. D'aquesta manera la classificació histològica de la hiperplàsia acceptada per l'O.M.S. distingeix quatre categories: 1) hiperplàsia simple sense atípia (HS), 2) hiperplàsia simple amb atípia (HSA), 3) hiperplàsia complexa sense atípia (HC), 4) hiperplàsia complexa amb atípia (HCA) ⁽²⁶⁾ (Fig. 14).

El risc de progressió fins a neoplàsia endometrial de cadascuna de les hiperplàsies és diferent (Taula 1). Tant la hiperplàsia simple com la complexa, sense presència d'atípia, normalment reverteixen si es retira l'excés exogen d'estrògens. A més, només un 1% d'hiperplàsies simples i menys d'un 2% de les complexes progressen fins a carcinoma. La mitjana de progressió a carcinoma en aquests casos és de més de 10 anys. Per altra banda la progressió de les hiperplàsies amb atípia a carcinoma és molt major, i arriba a un 23% dels casos amb una mitjana de duració de 4 anys ⁽²⁷⁾.

ESTUDI DE PROGRESSIÓ DE LES HIPERPLÀSIES ENDOMETRIALS			
PATOLOGIA	REGRESSIONS	PERSISTÈNCIA	PROGRESSIÓ A CARCINOMA
HS	80%	19%	1%
HC	80%	17%	3%
HSA	69%	23%	8%
HCA	57%	14%	29%

Taula 1. Comparació de l'evolució de les diferents hiperplàsies endometrials ⁽²⁷⁾.

La hiperplàsia endometrial majoritàriament es diagnostica clínicament per un sagnat uterí. No obstant, la incidència d'hiperplàsies diagnosticades de pacients amb hemorràgia uterina és d'un 15% ⁽²⁸⁾. La coexistència d'hiperplàsia endometrial i carcinoma és un fet conegut. Ocasionalment, però, pot ser difícil diferenciar entre la hiperplàsia amb atípia i el carcinoma endometrial per les marcades distorsions arquitecturals i la seva semblança. Aquestes dificultats són especialment rellevants quan el teixit d'estudi procedeix d'una biòpsia amb poca representativitat. Actualment la classificació de les hiperplàsies està en debat. Hi ha un corrent que és partidari de crear dos grups, un amb les hiperplàsies sense atípia i un altre que inclouria les hiperplàsies amb atípia i els carcinomes endometrials ben diferenciats ⁽²⁹⁾. Un

estudi recent emprant aquests criteris mostra una major capacitat diagnòstica que la de la classificació de l'O.M.S. a l'hora d'identificar el risc de progressió fins a carcinoma ⁽³⁰⁾. D'altres autors, però, es mostren contraris a aquesta classificació conjunta d'hiperplasia atípica i carcinoma endometrial ben diferenciat ⁽³¹⁾. Els estudis en desenvolupament de la patologia molecular mostren que la hiperplàsia atípica amb risc d'evolució a neoplàsia presenta moltes de les alteracions descrites en la tumorigènesi endometrial: acumulació d'alteracions epigenètiques de determinats oncògens, en determinats supressors tumorals i en gens implicats en la reparació del DNA. El millor coneixement d'aquests factors permetrà diferenciar de forma més precisa les lesions preneoplàsiques d'aquelles sense risc de progressió a neoplàsia.

3.4. Presentació clínica i diagnòstic

3.4.1. Presentació clínica

La manifestació clínica més freqüent del càncer d'endometri és la metrorràgia o hemorràgia uterina. Les dones postmenopàusiques que presenten hemorràgia uterina han de ser avaluades per poder descartar la presència de càncer endometrial, tot que aproximadament només un 30% dels casos esdevenen neoplàsies genitals malignes ⁽³²⁾. Cal tenir en compte diferents factors associats a la metrorràgia però no relacionats amb les neoplàsies genitals malignes: en dones premenopàusiques pot ésser degut a altres problemes associats com l'endometriosis o la infertilitat. L'hemorràgia uterina s'ha trobat associada freqüentment als tractaments hormonals substituïtoris en dones perimenopàusiques i postmenopàusiques ⁽³³⁾. Poden trobar-se d'altres manifestacions clíniques, com la presència de leucorrea fosca, associada a una mala sentor. També cal destacar dues característiques comunes en un alt percentatge de les pacients a les quals es diagnostica una neoplàsia endometrial: la obesitat i la presència de cicles anovulatoris. El dolor en el carcinoma endometrial no és un símptoma constant ⁽³⁴⁾. Tot i que s'han buscat mètodes d'exploració efectius per al diagnòstic precoç del càncer d'endometri, encara no se n'ha trobat cap de definitiu.

3.4.2. Tècniques de diagnòstic emprades en la detecció del carcinoma endometrial

3.4.2.1. Citologia cervical

La citologia cervical és una tècnica rutinàriament emprada en el diagnòstic del carcinoma endometrial. Tot i així, no ha donat tan bons resultats com els que té per la detecció del carcinoma cervical precoç. Quan la preparació citològica s'obté directament de la cavitat endometrial apareixen cèl·lules malignes en una proporció major. Encara que sigui d'escassa utilitat com a mètode d'exploració, la citologia cervicovaginal pot donar proves indirectes de la patologia endometrial ⁽³⁵⁾.

3.4.2.2. Avaluació de l'endometri per ultrasons

Aquesta tècnica ha experimentat un notable desenvolupament en els darrers anys. Consisteix en l'ús d'ultrasons per via vaginal per tal d'avaluar l'endometri, aconseguint millorar notablement els resultats del mètode. En general s'accepta que un gruix endometrial menor o igual a 4 mm representa un risc molt baix de tenir la patologia endometrial. Tanmateix, quan la mesura no sobrepassa els 4 mm, existeix patologia endometrial en l'1% de les pacients ⁽³⁶⁾. Com a part de l'estudi ultrasònic, cada vegada s'utilitza més la valoració del flux sanguini endometrial per ecoDoppler. Les arteries radials i espirals internes son poc perceptibles en el miometri de dones postmenopausiques, però poden esdevenir prominents per ecoDoppler transvaginal, en pacients portadores de hiperplàsia o carcinoma, per tant els índexs de resistència (IR) baixos signifiquen un major gruix arterial i per tant s'associen a un major risc de neoplàsia ⁽³⁷⁾.

3.4.2.3. Biòpsia endometrial

S'han dissenyat diversos dispositius per aconseguir mostres representatives de l'endometri amb la menor dificultat possible. Actualment en la majoria de les pacients és possible la presa de teixit endometrial de forma ambulatoria. Hi ha dos mètodes d'obtenció de la biòpsia endometrial: per raspat o per aspiració mitjançant un catèter (Pipelle[®]). Però aquest mètode de diagnòstic és poc sensible i només detecta amb fiabilitat neoplàsies que ocupin > 50% de la cavitat endometrial ⁽³⁸⁾.

3.4.2.4. Histeroscòpia

La histeroscòpia és una tècnica molt potent de diagnòstic que permet la valoració de la cavitat endometrial, del canal endocervical i la presa dirigida de la biòpsia gràcies a l'òptica de l'aparell que proporciona el visionat d'aquesta cavitat a temps real. Els rols potencials de la histeroscòpia són: un acurat diagnòstic de la malignitat de les lesions endometrials i la determinació de l'origen de la lesió i la identificació de la possible extensió de la patologia endometrial cap al cèrvix. A més, la tècnica, acompanyada d'una biòpsia endometrial, permet una especificitat de diagnòstic del 100%. La histeroscòpia també pot ser utilitzada de forma ambulatoria. Aquest conjunt de característiques converteixen la histeroscòpia en la principal eina de diagnòstic del carcinoma endometrial ^(39, 40).

3.4.2.5. Altres tècniques de diagnòstic

També s'han utilitzat altres procediments en el procés de diagnòstic de la malaltia tumoral, però tenen més valor per a determinar l'estadi i la planificació del tractament que no pas per ser utilitzats com a mètodes de detecció de la neoplàsia. Entre aquest hi ha la ressonància magnètica nuclear (RMN) i la tomografia axial computeritzada (TAC) ⁽⁴¹⁾. Amb ells es pot visualitzar directament la massa de teixit endometrial.

3.5. Anatomia patològica del carcinoma endometrial

3.5.1. Característiques macroscòpiques generals del carcinoma d'endometri

S'ha observat una àmplia variació en les característiques de la morfologia del carcinoma endometrial: l'endometri pot estar revestit en part o totalment per un teixit irregular i granulós. En d'altres casos poden presentar masses de pòlips que poden projectar-se cap a l'interior o arribar a omplir la cavitat endometrial. El teixit tumoral es típicament pàl·lid i carnós però ocasionalment presenta una textura sorrosa i sòlida. També són freqüents els focus d'hemorràgia i necrosi. En certs casos el carcinoma endometrial és multifocal i està precedit per una hiperplàsia endometrial, però en d'altres casos el tumor ve precedit per atròfia endometrial. En molts casos la simple inspecció visual de la mostra permet la identificació del carcinoma endometrial, però generalment la identificació del tumor es fa microscòpicament per tal de descartar els possibles falsos negatius i/o positius. L'avaluació

macroscòpica del tumor és important per determinar si el tumor és primari o no en l'espai uterí ^(42, 43).

3.5.2. Progressió del càncer endometrial

El carcinoma d'endometri pot presentar-se com a lesió focal o difusa, tot afectant àrees diferents o la totalitat de la superfície endometrial. Localment la malaltia s'estén cap al miometri, pot envair la serosa uterina, estendre's cap al cèrvix tot afectant la mucosa



Figura 15, esquema de progressió tumoral i metastasi: imatge de les principals zones afectades per la metastasi d'origen endometrial.

endocervical i l'estroma, i pot arribar a envair les trompes; en fases més avançades fins hi tot pot afectar la vagina, els ovaris i la cavitat peritoneal. El carcinoma d'endometri també presenta capacitat de disseminació limfàtica i vascular. La disseminació tumoral a través dels espais limfovasculars causa afectació dels ganglis limfàtics regionals (pelvians) i més distants (paraaòrtics). També hi pot haver afectació d'altres òrgans a través de disseminació transperitoneal, transtubària i hematògena ⁽¹⁾.

3.5.3. Classificació del carcinoma endometrial

Els principals paràmetres anatomopatològics que defineixen el carcinoma endometrial permeten la seva classificació en dos gran grups: segons la dependència hormonal a estrògens i segons la

histologia en funció del tipus cel·lular. (Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia (F.I.G.O.), Organització Mundial de la Salut (O.M.S.)).

3.5.3.1. Classificació del carcinoma endometrial segons la dependència hormonal

L'any 1983 Bokhman proposà la diferenciació del carcinoma endometrial en dos tipus etiopatogènics segons les diferències que es troben en la seva epidemiologia, presentació i comportament:

1) una forma generalment ben diferenciada que s'origina en dones perimenopàusiques amb dependència als estímuls estrogènics, precedida per hiperplàsia simple seguida de complexa i amb tendència a ser de baix grau, que representa un 80% dels casos.

2) una segona forma, més agressiva, que apareix en dones postmenopàusiques més grans sense relació amb l'estimulació estrogènica i sense estar precedida per hiperplàsia, que representa el 20% dels casos. Hom designa el primer com a carcinoma endometrial de tipus Tipus I, depenent d'estrògens o endometriode i el darrer com a carcinoma endometrial Tipus II, independent d'estrògens o no endometriode (Taula 2) ^(1, 24, 44).

CARCINOMA ENDOMETRIAL		
CARACTERÍSTIQUES	TIPUS I	TIPUS II
Estrògens	Presentes	Absents
Estat menopàusic	Pre i Perimenopàusiques	Postmenopàusiques
Hiperplàsia	Present	Absent
Grau	Baix	Alt
Invasió miometrial	Mínima	Profunda
Comportament	Estable	Progressiu
Tipus histològic	Endometriode	Serós Cèl·lules clares

Taula 2. Característiques principals dels dos tipus de carcinomes ⁽²⁴⁾.

3.5.3.2. Classificació del carcinoma endometrial segons el tipus histològic

La classificació histopatològica del carcinoma endometrial proposada per l'*International Society of Gynecological Pathology* (I.S.G.Y.P.), amb l'aprovació de l'O.M.S., es basa en la diferenciació dels tipus histològics en funció del tipus cel·lular present a l'àrea tumoral (Taula 3) ⁽⁴²⁾.

CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Carcinoma endometriode

Carcinoma serós

Carcinoma de cèl·lules clares

Carcinoma mucinos

Carcinoma escatós

Carcinoma transicional

Carcinoma indiferenciat

Carcinoma de tipus mixt

Taula 3. Classificació histològica del carcinoma en funció del tipus cel·lular ⁽⁴²⁾.

1) El **carcinoma endometriode** és el tipus histològic més freqüent de carcinoma endometrial, amb una incidència de més del 80% dels casos ⁽¹⁰⁾. Cal fer un esment especial al carcinoma endometriode per la importància en la freqüència de diagnòstic. I per haber estat el tipus histològic en el que s'ha centrat aquest estudi. Per això es descriu detalladament en el següent punt (Fig. 16).

2) El **carcinoma serós** és el següent en incidència malgrat que en la literatura el percentatge oscil·la entre el 3 i el 10% a causa de la dificultat per distingir aquest carcinoma de les altres variants papil·lars de carcinoma endometrial. Malgrat tenir una incidència més baixa que l'endometriode, aquest tipus de carcinoma és responsable d'un 25% de totes les morts per carcinoma endometrial. Generalment el teixit tumoral serós cobreix parcialment o totalment la cavitat uterina, amb una textura granular acompanyada per diferents graus d'hemorràgia. El carcinoma serós no presenta un guix destacable, amb una mida que en certs casos no es distingeix de l'endometri normal ^(45,46) (Fig. 16).

3) El **carcinoma de cèl·lules clares** representa aproximadament l'1% dels carcinomes endometrials. Aquest tipus de carcinoma és molt similar al carcinoma endometriode però presenta un patró de tipus papil·lar com el carcinoma serós ⁽⁴⁷⁾ i conjuntament amb el

carcinoma serós encapçalen el grup de carcinomes independents d'estrògens o de tipus II. El carcinoma de cèl·lules clares no presenta un gruix distintiu i es caracteritza a nivell microscòpic per patrons de cèl·lules amb un citoplasma clar destacat, patrons papil·lars i patrons sòlids ⁽⁴⁶⁾(Fig. 16).

4) El **carcinoma mucinós** és relativament comú però sempre com a component minoritari (menys del 10% de l'àrea tumoral). S'ha vist associat freqüentment al carcinoma endometriode. Però el carcinoma mucinós pur és rar i representa aproximadament menys de l'1% dels carcinomes endometrials ^(48, 49). Es caracteritza per presentar cèl·lules columnars amb un citoplasma ric en mucina d'un to pàl·lid ⁽⁴⁶⁾ (Fig. 16).

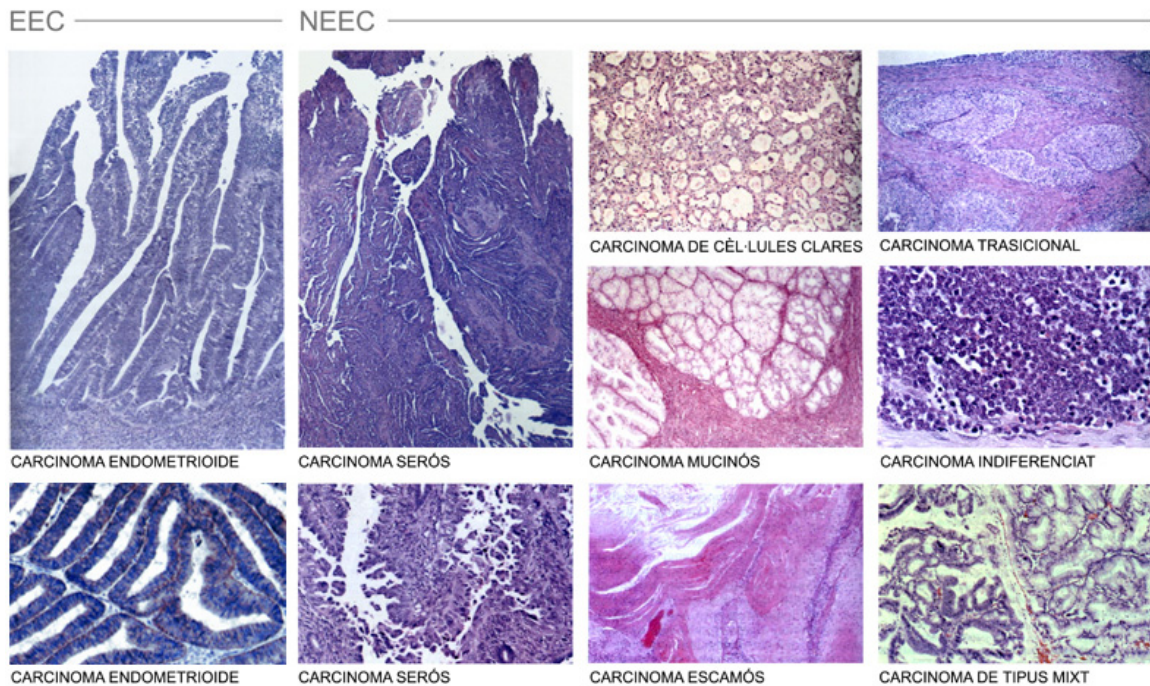


Figura 16, composició d'imatges dels tipus histològics de carcinoma endometrial: imatges de talls histològics dels diversos tipus de carcinomes endometrials tenyits amb hematoxilina/eosina. En la fig. es diferencien els dos grups de carcinomes endometrials: el carcinoma endometrial endometriode (EEC), i els carcinomes endometrials no endometriode (NEEC), amb les seues 7 tipus diferents. A l'esquerra de la fig. es destaquen els dos majors representants de cadascun dels grups; el carcinoma endometriode (EEC) i el carcinoma serós (NEEC).

5) El **carcinoma escamós** presenta una incidència del 0,25-0,5% dels carcinomes endometrials. Aquest tipus de tumors acostumen a estar ben diferenciats i associats a una abundant producció de queratina ⁽⁵⁰⁾. El tumor macroscòpicament presenta una aparença blanca uniforme, normalment es troba associat amb una abundant producció de queratina ⁽⁴⁶⁾ (Fig. 16).

6) El **carcinoma transicional** correspon a un altre histiotip minoritari, ja que se n'han descrit molt pocs casos. Un tumor primari i pur de carcinoma transicional és molt estrany, ja que normalment el carcinoma transicional està associat a un carcinoma d'un altre tipus cel·lular, tot desplaçant aquest tipus de carcinoma a la categoria dels mixts ⁽⁵¹⁾. Aquest tipus de carcinoma presenta focus papil·lars formats per cèl·lules amb morfologia transicional, les quals presenten un destacable nucli longitudinal ⁽⁴⁶⁾ (Fig. 16).

7) Els **carcinomes indiferenciats** reben el nom de aquells tumors que estan massa poc diferenciats per poder pertànyer a algun dels grups anteriorment descrits. La proporció d'aquest tipus de carcinoma és de l'1,5% dels carcinomes endometrials ⁽⁵²⁾. Les cèl·lules tumorals presenten un citoplasma apreciable i un nucli gran amb un nuclèol prominent ⁽⁴⁶⁾(Fig. 16).

8) Els **carcinomes de tipus mixt** són tumors que presenten dos o més tipus cel·lulars aberrants, però, sempre i quan el segon component cel·lular superi el 10% de l'àrea del tumor. Si el percentatge del segon component és més baix del 10%, el tumor es classifica segons el primer component però s'ha de citar a l'informe patològic per la possible significació pronòstica. (I.S.G.Y.P.) ⁽⁴⁶⁾ (Fig. 16).

3.5.4. Carcinoma endometriode

És la forma més comuna de carcinoma endometrial i representa més de les tres quartes parts de tots els casos. L'afectació d'aquest tipus de carcinoma comprèn un rang d'edat que oscil·la de la segona a la vuitena dècada, amb una mitjana d'edat de presentació de 59 anys ⁽⁵³⁾. La majoria de les pacients són premenopàusiques i perimenopàusiques, essent molt poc freqüent en dones joves ⁽⁵⁴⁾. El carcinoma endometriode es troba freqüentment precedit per hiperplàsia. Recentment s'ha descrit una alta relació, àdhuc compartint alteracions genètiques comunes, entre el carcinoma endometriode i la hiperplàsia endometrial, concretament la de

tipus atípica ⁽⁵⁵⁾. Una de les característiques més importants del carcinoma endometriode és la seva dependència hormonal dels estrògens, cosa que permet que hom el classifiqui com a carcinoma endometrial de tipus I ⁽²⁴⁾. L'I.S.G.Y.P./O.M.S. proposa una diferenciació del carcinoma endometriode en cinc subtipus histològics principals (Taula 4):

CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA DEL CARCINOMA ENDOMETRIOIDE

- Carcinoma endometriode típic
 - Carcinoma endometriode amb diferenciació escatosa
 - Carcinoma endometriode secretor
 - Carcinoma endometriode villoglandular
 - Carcinoma endometriode amb cèl·lules ciliades
-

Taula 4. Classificació en funció del subtipus histològics de l'EEC (I.S.G.Y.P.).

3.5.4.1. Carcinoma endometriode típic

Correspon al tipus histològic majoritari. Macroscòpicament el carcinoma endometriode típic presenta la superfície pàl·lida, brillant i focalment hemorràgica. Pot ser focal o difús i pot estar format per masses poliploides separades. La necrosi normalment no és evident de forma macroscòpica però pot ser vista en tumors mal diferenciats. La invasió del miometri és mínima però es pot veure com un teixit gris ben demarcat o com a nòduls blancs, múltiples, amb àrees grogues de necrosi. L'extensió al cèrvix és freqüent. L'aparença microscòpica del tumor està determinada pel grau de diferenciació del tumor que es basa en el patró arquitectural i les característiques nuclears. El tumor presenta formacions glandulars generalment amb la vora luminal regular, amb cèl·lules cilíndriques de citoplasma dens i estratificació nuclear ⁽¹⁾ (Fig. 17).

3.5.4.2. Carcinoma endometrioides amb diferenciació escatosa

Aproximadament una quarta part dels carcinomes endometrioides presenten focus de diferenciació escatosa de manera focal o extensiva. Cèl·lules escatoses immadures formen la clàssica mòrula que s'observa en aquest tipus histològic de carcinoma ⁽⁵⁶⁾ (Fig. 17).

3.5.4.3. Carcinoma endometrioides secretor

Tipus de carcinoma endometrioides poc comú però normalment ben diferenciat la principal característica del qual és la presència de cèl·lules que contenen vacúols de glicogen subnuclears i supranuclears semblants a l'endometri secretor ⁽⁵⁷⁾ (Fig. 17).

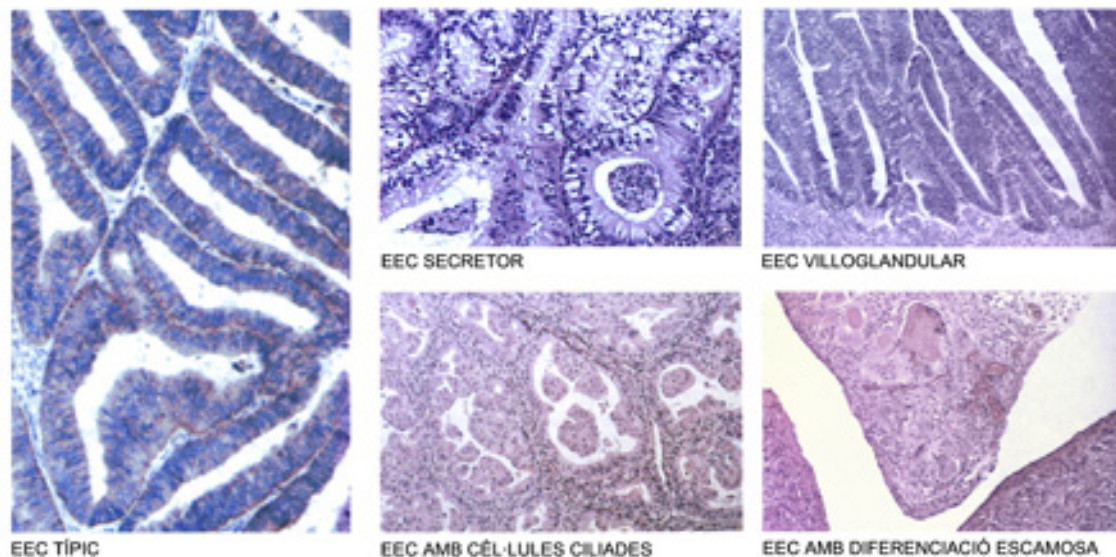


Figura 17, composició d'imatges dels tipus histològics d'EEC: imatges de talls histològics dels diversos tipus de carcinomes endometrioides tenyits amb hematoxilina/eosina. L'EEC típic n'és el major representant amb una incidència de més del 80% dels casos diagnosticats ⁽¹⁰⁾.

3.5.4.4. Carcinoma endometrioides villoglandular

Representa el 10% dels carcinomes endometrioides i es caracteritza per la presència de papil·les digiformes que presenten nuclis fibrovasculars. Aproximadament el 40% dels tumors d'aquest subtipus histològic són purs; la resta normalment es troba acompanyada d'un carcinoma endometrioides típic ⁽⁵⁸⁾ (Fig. 17).

3.5.4.5. Carcinoma endometriode amb cèl·lules ciliades

Aquest subtipus histològic ha estat recentment descrit. El seu diagnòstic difícil fa que hom el pugui confondre fàcilment amb el carcinoma serós. Representa un 8% dels casos de carcinoma endometriode i es caracteritza per la presència de cèl·lules ciliades entre les glàndules endometrials ⁽⁵⁹⁾ (Fig. 17).

4. Bases Moleculares del carcinoma endometrial

El concepte de bases moleculares de la progressió maligne de les neoplàsies va ser introduït per Vogelstein i col·laboradors basant-se en la progressió de l'adenoma colorrectal fins al carcinoma ⁽⁶⁰⁾. Segons aquest model, la progressió tumoral és conseqüència de l'adquisició progressiva de diverses alteracions genètiques incloent-hi alteracions d'oncògens, supressors tumorals i un increment de la inestabilitat genètica ⁽⁶¹⁾.

4.1. Model dualístic de carcinogènesis endometrial

Al llarg dels darrers anys, s'han postulat dos tipus diferencials d'alteracions genètiques en la gènesi i desenvolupament dels processos tumorals malignes; per una banda la inestabilitat cromosòmica (CIN) i per l'altra la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) ⁽⁶²⁾. El mecanisme de la CIN, de l'anglès *chromosomal instability*, es caracteritza per l'aparició de grans alteracions genètiques, en particular, guanys i/o pèrdues de braços de cromosomes o fins i tot de cromosomes sencers ⁽⁶³⁾. Aquestes grans alteracions genètiques molt sovint van acompanyades de la inactivació, a través de mutació gènica, d'importants proteïnes reguladores com p53. El segon mecanisme, anomenat inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) es caracteritza per un increment de formes cromosòmiques aberrants des de les lesions premalignes fins a les invasives. No obstant això, aquest mecanisme va acompanyat d'alteracions gèniques menors, en particular patrons de mutacions en seqüències repetitives del genoma, anomenades microsatèl·lits ^(64, 65). Normalment, les mutacions en seqüències repetitives són reparades pel sistema de reparació d'aparellaments erronis. Aquest sistema consta d'un conjunt de proteïnes capaces d'eliminar els aparellaments incorrectes de DNA i corregir-los per la base pertinent ⁽⁶⁶⁾. Aquestes proteïnes poden ser inactivades per mecanismes diversos, els més comuns dels quals són la metilació del promotor o la mutació ⁽⁶⁷⁾. L'MSI també pot afectar

seqüències repetitives que codifiquin gens importants en diversos processos com l'apoptosi, la reparació del DNA o el creixement cel·lular, que són consegüentment inactivats ⁽⁶⁸⁾. Per tant, es pot donar la inactivació de gens similars tant en el cas de l'MSI com de la CIN, però per vies diferents. En els darrers anys s'han mostrat proves clares que les alteracions moleculars involucrades en el desenvolupament dels carcinomes de tipus I (EEC) difereixen significativament dels carcinomes de tipus II (NEEC). Sembla ser que els carcinomes de tipus I s'originarien a partir de la via genètica molecular de la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i els carcinomes de tipus II pel mecanisme de la inestabilitat cromosòmica (CIN) ⁽²³⁾. A partir d'aquests fets cada vegada està més acceptat el model dualístic de carcinogènesi endometrial proposat per diversos autors ^(1, 25, 69). Desafortunadament, no s'ha realitzat cap estudi exhaustiu amb els diferents tipus de carcinomes endometrials incloent la immunohistoquímica per a diverses proteïnes, anàlisi de ploïdia, de mutacions, de microsatèl·lits, de cromosomes i d'expressió gènica. Per tant el coneixement molecular que tenim d'aquest tipus de patologia fins a l'actualitat prové d'una recopilació de dades derivades de diversos estudis amb diferents grups de tumors.

CARCINOMA ENDOMETRIAL		
ALTERACIONS GENÈTIQUES	TIPUS I (MSI)	TIPUS II (CIN)
Inestabilitat de microsatèl·lits	20-40%	0-5%
Mutació <i>p53</i>	10-20%	90%
Inactivació PTEN	35-50%	10%
Inactivació <i>p16^{INK4a}</i>	10%	45%
Mutació <i>β-Catenina</i>	25-40%	0-5%
Alteració E-cadherina	10-20%	80-90%
Mutació <i>K-ras</i>	15-30%	0-5%
Amplificació <i>HER2/neu</i>	10-30%	80%

Taula 5. Principals alteracions genètiques proposades pel carcinoma endometrial tenint en compte les dues vies de carcinogènesi descrites: MSI i CIN ^(23, 46, 69).

4.2. Alteracions moleculars en l'EEC (Via genètica de l'MSI)

Com s'ha citat anteriorment, el carcinoma endometrial de tipus I o EEC ve normalment precedit per una lesió preneoplàsica (la hiperplàsia). La progressió d'aquesta via genètica des de les lesions preneoplàsiques fins al carcinoma endometrial és molt poc eficient, ja que implica interaccions complexes entre múltiples successos genètics com la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI), la inactivació del supressor tumoral PTEN, mutacions en el protooncogen *K-ras*, i mutacions en el gen de la *β-catenina*, a més d'un ambient hormonal desbalancejat pel que fa als estrògens.

4.2.1. Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)

Els microsatèl·lits o seqüències de DNA curtes repetides en tàndem es troben distribuïdes a través de tot el genoma. La seqüència de microsatèl·lits més comuna en els eucariotes són els dinucleòtids (CA)_n. Aquesta seqüència es troba repetida de 50.000 a 100.000 vegades per tot el genoma humà ⁽⁷⁰⁾. La instauració en una cèl·lula de la via MSI, també darrerament anomenada fenotip mutador, té importants implicacions moleculars. El procés consisteix en la tendència a acumular milers de mutacions en seqüències codificants i no codificants. Els microsatèl·lits són seqüències particularment susceptibles de patir alteracions d'aquest tipus, però afortunadament es troben localitzades majoritàriament en regions de DNA no codificants i la presència de mutacions no té conseqüències importants per la cèl·lula. No obstant això, ocasionalment hi ha seqüències repetides en tàndem, localitzades dins de regions codificadores d'importants gens, alguns dels quals codifiquen proteïnes involucrades en l'apoptosi (BAX)^(71, 72), receptors de factors de creixement (TGFB-R2, IGF2R)⁽⁷³⁾ o proteïnes que intervenen en la correcció dels errors de replicació del DNA (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6)⁽⁷⁴⁻⁷⁸⁾. Les mutacions en els gens de reparació són molt importants, ja que alteren la capacitat de la cèl·lula de corregir els errors produïts en la replicació. Per tant les cèl·lules amb els gens de correcció mutats repliquen els errors del DNA més freqüentment que les cèl·lules normals, convertint-se així en dianes potencials de la progressió tumoral. Les mutacions en aquestes seqüències són interpretades com a successos secundaris en la via de l'MSI o del fenotip mutador i normalment alteren la pauta de lectura d'aquests gens tot donant lloc a proteïnes truncades amb funcions alterades. Molts investigadors han aportat

proves que les mutacions que es produeixen en aquests gens diana són molt freqüents en els EEC ⁽⁷⁹⁻⁸³⁾.

Com ja ha estat prèviament esmentat, inicialment l'MSI es va identificar en càncers de còlon de pacients amb la síndrome HNPCC (així com en alguns càncers de còlon esporàdics). L'MSI s'ha trobat en més d'un 30% dels carcinomes endometrials, concretament els de tipus endometriode ⁽⁸¹⁾. Tanmateix, la freqüència de mutacions dels gens de reparació de la replicació en els carcinomes esporàdics de còlon, gàstrics i endometrials amb MSI és molt baixa ^(84, 85), la qual cosa suggereix que hi ha implicat un altre mecanisme d'inactivació gènica.

Recentment s'ha demostrat que la hipermetilació del DNA pot ser un important mecanisme de silenciament gènica en el desenvolupament i/o progressió tumoral ⁽⁸⁶⁾. La metilació anormal de les illes CpG en les regions promotores dels gens pot provocar-ne una inactivació epigenètica progressiva que pot afectar gens importants com ara gens d'inhibició del creixement (supressors tumorals) o de reparació del DNA. Efectivament, en els darrers anys s'ha demostrat que el promotor del gen *hMLH1m* està hipermetilat en la majoria de carcinomes endometrials amb presència d'MSI ⁽⁸⁷⁾. Aquest fet permet suggerir que la metilació anormal és el primer graó en l'adquisició del fenotip mutador en la carcinogènesi endometrial ⁽⁸⁸⁾. Recentment, a més, s'ha suggerit que la hipermetilació del promotor *hMLH1* s'esdevé en la transició d'hiperplàsia a carcinoma i que addicionalment els gens de reparació pateixen mutacions, accelerant així la inestabilitat genètica i l'acumulació de canvis genètics addicionals com oncògens o supressors tumorals que es troben involucrats en l'origen de la carcinogènesi ^(25, 89, 90).

4.2.2. Inactivació del supressor tumoral *PTEN*

La inactivació del supressor tumoral *PTEN*, formalment conegut com a *MMAC1*, és el defecte genètic més comú en el carcinoma endometrial. Més d'un 83% dels carcinomes endometrials, amb antecedents de lesió premaligna, presenten *PTEN* alterat; caracteritzat per una pèrdua de la seva expressió ⁽⁹¹⁾. La proteïna que codifica *PTEN* és una fosfatasa d'especificitat dual, que actua bloquejant el cicle cel·lular i permet l'activació de l'apoptosi a través de la via dependent de PI3K/AKT. És lògic pensar que els gens que codifiquen per fosfatases, com *PTEN*, actuïn com a supressors tumorals ja que el producte que codifiquen té la capacitat de contrarestar l'efecte de les proteïnes codificades pel grup d'oncògens proteïna cinases ^(92, 93). Els mecanismes d'inactivació de *PTEN* inclouen la mutació, la deleció o pèrdua

d'heterozigozitat (LOH) ⁽⁹⁴⁾ i la hipermetilació del promotor ⁽⁹⁵⁾. La mutació germinal de *PTEN* va ser descrita en la malaltia autosòmica dominant de Cowden ⁽⁹⁶⁾. També s'han identificat mutacions somàtiques del gen *PTEN* en un gran nombre de càncers humans ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. En el carcinoma endometrial esporàdic, la pèrdua d'heterozigozitat (LOH) en el cromosoma 10q23 va ser identificada inicialment en el 40% dels carcinomes endometrials ⁽¹⁰⁰⁾. Posteriorment les mutacions de *PTEN* es van trobar fins al 61% dels carcinomes endometrials ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. Comparant carcinomes endometrials amb i sense MSI, s'ha demostrat que els que presenten MSI tenen una freqüència de mutació més alta (78-88%) que els que no presenten MSI (30%). Per tant sembla ser que els errors de replicació podrien predisposar a la cèl·lula a patir mutacions en el gen *PTEN* ⁽¹⁰⁴⁾. A més s'han trobat mutacions en les hiperplàsies endometrials en un 55% dels casos i en el teixit endometrial normal amb sobreexposició estrogènica ^(105, 106). Per tant aquest fet permet especular que la inactivació de *PTEN* representa un dels primers esdeveniments en la complexa cadena de progressió en la carcinogènesi endometrial. Una altra prova a favor de la inactivació de *PTEN* en la gènesi endometrial ha estat l'establiment de ratolins *knockout* per aquest gen. La inactivació en heterozigosi de *PTEN* produeix un fenotip endometrial anormal amb una progressió del 100% dels ratolins a lesions hiperplàsiques i del 20% fins a carcinoma endometrial ⁽¹⁰⁷⁾. Aproximadament una tercera part dels al·lels de *PTEN* inactivats en els carcinomes endometrials esporàdics són delecions cromosòmiques localitzades en la regió 10q23. Un mapatge detallat del braç llarg del cromosoma 10 en els carcinomes endometrials suggereix la possibilitat que un segon supressor tumoral estretament lligat es podria deleccionar conjuntament amb *PTEN* ⁽¹⁰⁸⁾. L'homeodomini que conté el gen *EMX2* és un potent candidat a ser aquest gen ⁽¹⁰⁹⁾. L'increment nadiu d'*EMX2* està associat a la disminució de l'activitat proliferativa endometrial. A més seva delecio ha estat descrita en diversos carcinomes endometrials ⁽¹⁰⁹⁾.

4.2.3. Mutacions en el protooncogen *K-ras*

Oncogen més amplament estudiat en el carcinoma endometrial i una de les primeres alteracions descrites en aquesta patologia. És membre de la família ras de les proteïnes G, i s'ha vist que juga un paper important en la regulació de la proliferació cel·lular. La família ras consisteix en tres gens estretament relacionats *H*, *K* i *N-ras* que codifiquen proteïnes de 21 kDa localitzades en la membrana citoplasmàtica interna, les quals presenten activitat GTPasa.

Aquestes proteïnes actuen d'interruptors moleculars en una llarga xarxa de senyalització que té per objectiu controlar el creixement i la diferenciació cel·lular ⁽¹¹⁰⁾. S'han descrit alteracions de *K-ras* en nombroses patologies oncològiques. El carcinoma endometrial presenta mutacions puntuals en el protooncogen *K-ras* fins al 30% dels casos ⁽¹¹¹⁾, principalment en els codons 12, 13 (Exó 1) i rarament en el 61 (Exó 2) ⁽¹¹²⁾. Aquestes mutacions puntuals alteren els productes de *ras* a través de la inhibició de la capacitat GTPasa intrínseca que resulta en una activació constitutiva de la proteïna, tot afavorint el creixement de manera autònoma i contribuint al desenvolupament neoplàsic ⁽¹¹³⁾. Sembla ser que hi ha una variabilitat regional respecte les mutacions de *K-ras* amb una alta prevalença al Japó en contra d'una prevalença molt baixa als Estats Units, segurament a causa d'una exposició diferencial als carcinògens ⁽¹¹⁴⁾. Aquest fet podria explicar els resultats poc clarificadors que relacionen les mutacions de *K-ras* amb la prognosi endometrial, per una possible inclusió de casos en els estudis de diferents grups regionals de pacients ⁽⁹⁰⁾. La mutació puntual de *K-ras* també ha estat demostrada en el 15% de les hiperplàsies endometrials ⁽¹¹⁵⁾, i la freqüència és molt similar a la trobada pels carcinomes endometrials, cosa que suggereix un rol destacable de *K-ras* en les etapes inicials de la carcinogènesi endometrial ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. Un altre resultat en aquest sentit és la correlació entre les mutacions de *K-ras* i els tumors MSI positius, cosa que apunta al fet que les mutacions puntuals de *K-ras* són adquirides abans de l'expansió clonal ^(111, 118).

4.2.4. Mutacions en el gen de la β -catenina

La β -catenina és una proteïna codificada pel gen *CTNNB1* que presenta una funció dual; per una banda té un paper crucial en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula mitjançada per E-cadherina i per altra banda té un rol destacat en la transducció de senyals de la via Wnt (via que regula el contacte cèl·lula-cèl·lula durant l'embriogènesi) ⁽¹¹⁹⁾. La via de la β -catenina pot ser activada a través de mutacions activadores de la β -catenina o de mutacions inhibidores de l'E-cadherina. La mutació de l'exó 3 de la β -catenina dona lloc a una acumulació nuclear i citoplasmàtica d'aquesta proteïna, que ahora provoca una activació de la via Wnt ⁽¹²⁰⁾. Posteriorment es produeix un descontrol de la progressió cel·lular per desregulació de l'expressió de la ciclina D1 ⁽¹²¹⁾. A més, s'ha descrit que la β -catenina pot regular l'expressió de la metal·loproteasa de matriu 7 en el carcinoma colorrectal. Aquest fet podria tenir un paper en l'establiment del microambient necessari per a la iniciació i manteniment del creixement del tumor primari i

de les metàstasis ⁽¹²²⁾. La funció exacta de la β -catenina en el carcinoma endometrial roman encara desconeguda. Sembla ser que la freqüència de mutacions en la β -catenina és independent de la presència d' MSI i de l'estat mutacional de *PTEN* i *K-ras* ⁽¹²³⁾. Per tant la presència de mutacions en el gen de la β -catenina podria reflexar una via de carcinogènesi subjacent ⁽¹²⁴⁾. La presència de mutacions del gen *CTNNB1* en les hiperplàsies endometrials, tot i que a més baix nivell que en el carcinoma endometrial, apunta a tenir un paper en els estadis inicials de la patologia endometrial ⁽¹²⁵⁾. La presència de mutacions del gen en heterozigosi suggereix un paper addicional de l'activació de la β -catenina en la transició de la fase benigna a la fase maligna de la patologia ⁽¹⁰⁴⁾.

4.2.5. Desbalanceig hormonal d'esteroides

Alteracions en el gens dels receptors hormonals esteroidals: els receptors d'estrògens (ER) i progesterona (PR) pertanyen a la superfamília de receptors nuclears. Són factors transcripcionals dependents de lligand que actuen dimeritzant i unint-se al DNA per modular l'expressió de gens específics. Se n'han descrit diferents isoformes amb funcions distintes i localitzacions tissulars diferents ⁽¹²⁶⁾.

4.2.5.1. Alteració del gen de l'ER

Diversos estudis han mostrat que la forma predominant en l'úter és l'ER α i alhora és la responsable de mitjançar la sensibilitat de l'endometri als estrògens ⁽¹²⁷⁾. S'ha descrit una variant de 41 kDa de l'ER α sense l'exó 5 només detectada en el carcinoma endometriode ⁽¹²⁸⁾. S'ha vist que aquesta variant de l'ER α és capaç d'activar constitutivament la transcripció de gens dependent de receptor i en absència d'hormona, suggerint una possible funció en el desenvolupament i progressió del carcinoma endometrial ⁽¹²⁹⁾. També s'ha descrit que aquesta variant està relacionada amb la resistència al tractament amb tamoxifè i amb l'augment d'expressió del PR ⁽¹³⁰⁾. Diversos estudis suggereixen que les alteracions en la via de senyalització dels estrògens sorgeixen durant el procés de tumorigènesi endometrial i existeixen evidències que l'ER α juga un paper important en aquest procés regulant l'expressió del PR ⁽¹³¹⁾. Malgrat els canvis descrits en l'expressió dels dos subtipus d'ER en la tumorigènesi mamària i ovàrica ^(132, 133) els coneixements en el carcinoma endometrial resten encara per resoldre.

4.2.5.2. Alteració del gen del PR

La progesterona actua a través del seu receptor com un regulador negatiu de l'acció dels estrògens a l'endometri. El PR presenta dues isoformes: la PR-A que inhibeix l'activació d'ER α , i la PR-B que actua d'agonista dels estrògens ⁽¹²⁶⁾. Recentment s'ha descrit en el carcinoma endometrial un polimorfisme en el promotor del gen de PR que actua desbalancejant la relació de PR-A i B i per tant el control negatiu del estrògens; aquest polimorfisme també ha estat associat a un increment del risc de patir carcinoma endometrial ⁽¹³⁴⁾.

4.2.6. Model de progressió del carcinoma endometriode

Hi ha proves que el desenvolupament del carcinoma endometriode recorda el model proposat per Vogelstein de la progressió del carcinoma colorectal ⁽⁶¹⁾. Aquesta hipòtesi se sustenta sobre quatre fets:

1) alguna de les lesions que es troben en el carcinoma endometriode també estan presents en la hiperplàsia atípica, la lesió precursora més immediata al carcinoma endometriode; 2) en el carcinoma endometriode ben diferenciat hi ha un increment de les lesions genètiques respecte la hiperplàsia atípica; 3) el nombre de lesions genètiques augmenta amb el grau histopatològic i 4) al carcinoma hi ha un major nombre d'aberracions cromosòmiques respecte la hiperplàsia endometrial atípica ⁽²³⁾.

El model de tumorigènesi proposat per al carcinoma endometriode es desenvolupa a través de la hiperplàsia endometrial atípica. La iniciació i la progressió tumoral es caracteritzen per l'adquisició de diverses alteracions moleculars en un ambient desbalancejat respecte als estrògens, de les quals la més freqüent és la inactivació de PTEN i l'MSI. Tot i que hi ha excepcions, el model partiria de l'endometri normal, desenvoluparia hiperplàsia simple i complexa fins a l'adquisició d'hiperplàsia amb atípia; el següent pas seria l'aparició de l'endometri neoplàsic de menor grau i que amb l'aparició d'altres alteracions moleculars, com les mutacions de *K-ras* i β -catenina, s'arribaria al carcinoma de major grau ^(23, 25, 46, 135, 136).

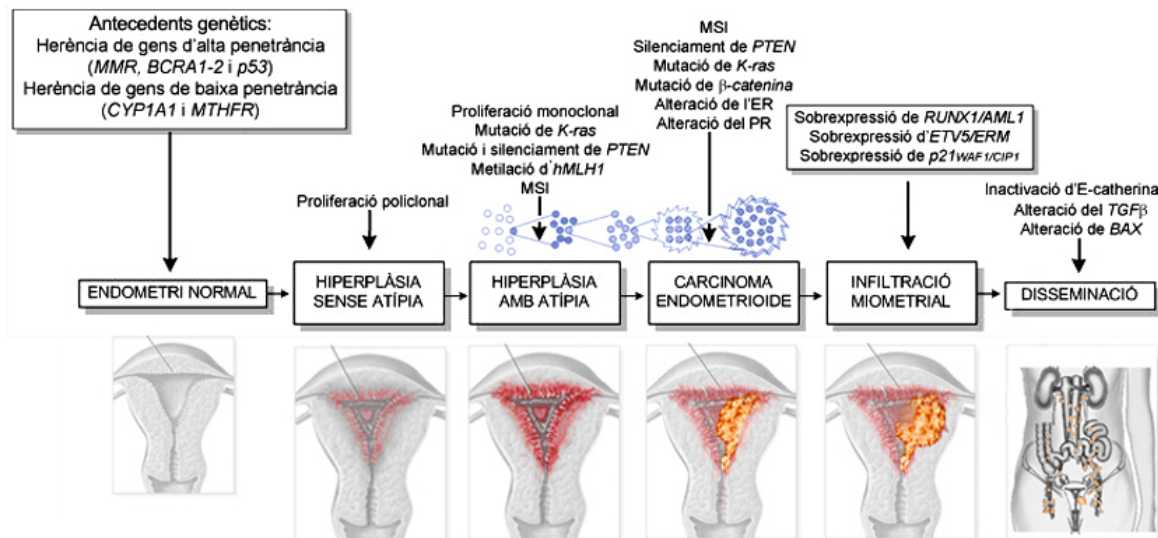


Figura 18, esquema del model de progressió de l'EEC (23, 25, 69, 114, 137, 138): a l'esquema es mostren les principals alteracions genètiques que succeeixen al llarg del procés d'establiment del carcinoma endometrial endometrioides i la seva posterior disseminació. Cal destacar l'actualització d'aquest esquema amb les alteracions trobades en la present tesi; la sobreexpressió dels gens *RUNX1/AML1*, *ETV5/ERM* i *p21^{WAF1/CIP1}* especialment en el procés d'infiltració miometrial.

4.3. Alteracions moleculars en el NEEC (Via genètica de la CIN)

Aquest tipus de carcinomes endometrials, com ja ha estat anteriorment comentat, vénen encapçalats pels histiotips serós i de cèl·lules clares. Els carcinomes no endometrioides es caracteritzen per presentar, majoritàriament, grans alteracions genètiques, que és el que defineix la via de la CIN. Aquestes grans alteracions genètiques definides com aberracions cromosòmiques, normalment vénen acompanyades per la inactivació d'importantes proteïnes reguladores com p53 o p16^{INK4a}. Aquest fet és la raó per la qual els carcinomes no endometrioides estan considerats de mal pronòstic. Les principals alteracions de la via CIN són:

4.3.1. Mutacions en el supressor tumoral p53

p53 és un factor importantíssim, punt central de la regulació del cicle cel·lular i de l'apoptosi, a més d'altres funcions com la de diferenciació i senescència. La proteïna p53 és codificada

pel gen *TP53* que actua com a supressor tumoral. S'ha descrit que aquest gen es troba inactivat en més de la meitat dels tumors malignes humans ⁽¹³⁹⁾. En el càncer endometrial s'han pogut correlacionar les mutacions de p53 amb un tipus específic de carcinoma endometrial (tipus II), no com en molts tumors en què les mutacions es troben repartides estocàsticament en la meitat dels casos. Els carcinomes de tipus II o no endometrioides mostren una freqüència de mutació de p53 de més del 90% dels casos, convertint-se així en l'alteració més destacada d'aquest tipus tumoral ⁽⁹⁾. En el de tipus I la taxa mutacional de p53 és inferior al 10%, fet que converteix p53 en un marcador molecular útil per a distingir entre càncers de tipus I o II ^(140, 141). Com a resultat dels canvis mutacionals de p53, que consisteixen en substitucions puntuals d'aminoàcids, es produeix una acumulació de p53 mutant a la cèl·lula tumoral, ja que aquesta és més estable que la variant salvatge, i que és detectable per immunohistoquímica. A més la proteïna mutant pot actuar com a dominant negatiu tot inhibint la proteïna salvatge, provocant d'aquesta manera el creixement i la supervivència de la cèl·lula maligne ⁽¹⁴²⁾. La majoria dels carcinomes endometrials intraepitelials, precursors putatius del carcinoma serós, presenten un nivell alt de mutacions a *TP53* (>78%), fet que recolza un rol inicial de les alteracions de p53 en la tumorigènesi del carcinoma endometrial serós ⁽¹⁴³⁾. Per contra, les mutacions de *TP53* en el carcinoma endometriode, tot i que es presenten amb una freqüència molt més baixa (20%) que el no endometriode, es troben en els tumors de major grau i rarament es troben en les hiperplàsies, cosa que suggereix que aquestes mutacions estan relacionades amb la diferenciació del carcinoma i, per tant, succeeixen relativament tard en la tumorigènesi endometriode ^(89, 144). La concordança entre les mutacions de *TP53* i la detecció per immunohistoquímica no és absoluta. Això és conseqüència del fet que l'expressió de p53 per immunohistoquímica és un indicador molt emprat en la detecció d'alteracions de p53, però hi ha certs problemes amb els falsos positius i falsos negatius, amb una correlació del (>78%) dels casos ⁽¹⁴³⁾. Aquest fet s'explica per detecció de p53 en condicions no patològiques, o també perquè no totes les mutacions de p53 impliquen l'acumulació de la proteïna. Per tant cal tenir cura amb la interpretació dels resultats immunohistoquímics ⁽¹⁴⁵⁾.

4.3.2. Inactivació del supressor tumoral *p16^{INK4a}*

Una altra de les alteracions que s'esdevé amb més freqüència en aquests tipus de carcinomes és la inactivació de *p16^{INK4a}*. Aquesta alteració s'ha descrit fins a un 45% dels carcinomes no

endometrioides ⁽²³⁾. El gen que codifica p16^{INK4a} (*CDKN2A*) ha estat identificat com a supressor tumoral, ja que el seu producte també anomenat inhibidor de ciclina dependent de cinasa, s'uneix específicament a la ciclina CDK4, inhibint així la seva funció i actuant com a regulador negatiu del cicle cel·lular ⁽¹⁴⁶⁾. Sembla que la mutació o la deleció del gen de p16^{INK4a} es dona amb poca freqüència en el carcinoma endometrial ⁽¹⁴⁷⁾, no obstant la pèrdua d'expressió d'aquest gen és significativa en el tipus de carcinoma no endometrioides ^(148, 149). Una possible explicació d'aquest fet podria ser la hipermetilació del promotor a freq de la identificació d'illes CpG de metilació en el gen *CDKN2A* ^(150, 151). Recentment, però, s'han publicat alguns resultats contradictoris respecte aquest tema. El que s'accepta és que la pèrdua d'expressió de p16^{INK4a} defineix un grup de carcinomes endometrials agressius amb alta activitat proliferativa i pronòstic pobre ⁽¹⁵²⁾.

4.3.3. Inactivació del gen de l'E-cadherina

L'E-cadherina és una proteïna d'adhesió cel·lular codificada pel gen *CDH1*. Les cadherines són glicoproteïnes transmembrana les quals, a banda d'estar relacionades amb l'adhesió cel·lular, també participen en la transmissió del senyal. Hom ha descrit que la variació en l'expressió de les cadherines es troba implicada directament en una ample varietat de processos com la morfogènesi, la supervivència o el desenvolupament tumoral ⁽¹⁵³⁾. En diversos càncers de tipus epitelial s'ha observat que la disminució de l'expressió d'E-cadherina està associada a la pèrdua de diferenciació del tumor, l'augment de la metastasi i la disminució de la vida mitjana del pacient ⁽¹⁵⁴⁾. En el carcinoma endometrial del tipus no endometrioides la inactivació d'aquest gen s'ha descrit fins en un 90% dels casos, vers un 20% en el carcinoma endometrioides ⁽²³⁾. Un treball recent demostra aquesta diferència d'expressió entre els tipus de carcinomes I i II i conclou que la baixa expressió d'E-cadherina tant al carcinoma serós com al de cèl·lules clares podria explicar el fenotip més agressiu d'aquests tipus tumorals ⁽¹⁵⁵⁾. Altres estudis previs també han relacionat la pèrdua d'expressió d'E-cadherina amb la metastasi endometrial ⁽¹⁵⁶⁾.

4.3.4. Amplificació del protooncogen *HER2/neu*

HER-2/neu (*c-erb-B2*) és, conjuntament amb *K-ras*, un dels protooncògens més ben caracteritzats en el carcinoma endometrial. El gen *HER-2/neu* codifica un receptor

transmembrana de 185 kDa molt similar al receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF-R). S'ha vist que HER-2/neu heterodimeritza amb major afinitat amb membres de la família de l'EGF-R. Per tant juga un paper important en coordinar el complex de senyalització ErbB, responsable de la regulació del creixement i la diferenciació cel·lular⁽¹⁵⁷⁾. L'amplificació del protooncogen *HER-2/neu*, tot i que s'esdevé aproximadament en el 40% dels carcinomes endometrials, té una incidència d'un 80% en els carcinomes no endometrioides^(90, 158, 159). Diversos estudis han mostrat que l'amplificació i sobreexpressió de *HER2/neu* està relacionada amb carcinomes endometrials d'alt grau, d'estadi avançat i de pronòstic pobre^(114, 160-162). Altres estudis han suggerit que l'estat d'amplificació de *HER-2/neu* pot tenir un ús potencial en la identificació de pacients amb un alt risc de desenvolupar carcinoma endometrial persistent o recurrent⁽¹⁶³⁾. Aquest estudis citats mostren proves que aquesta alteració és pròpia de la via de la CIN. Tot i així, entorn d'aquest oncogen encara gira certa controvèrsia, ja que també ha estat descrita la seva sobreexpressió en més d'un 15% de mostres d'endometri normal i d'hiperplàsia endometrial, raó per la qual hom creu que també podria tenir algun paper potencial en els estadis inicials de la patologia⁽¹⁶⁴⁾. A més, encara no ha estat ben establert com a factor pronòstic en el carcinoma endometrial⁽⁹⁰⁾. Cal dir, però, que diverses vies d'estudi apunten a la potencialitat futura d'aquest oncogen com a factor pronòstic en la patologia endometrial^(17, 164).

4.3.5. Model de progressió del carcinoma serós

El model de progressió del carcinoma serós, histiotip principal de la via de la CIN, ha estat proposat però escassament estudiat. Fins a l'actualitat s'han hipotetitzat dues explicacions possibles però encara hi ha molts fets a demostrar.

La hipòtesi inicial parteix de la principal alteració descrita en el carcinoma serós, la mutació de p53. La mutació en un dels al·lels de *p53* succeeix aviat durant el desenvolupament del precursor del carcinoma serós, el carcinoma intraepitelial (EIC), mentre que la pèrdua del segon al·lel normal per pèrdua d'heterozigositat (LOH) acompanyaria la progressió cap al carcinoma serós^(23, 165). No és clar si s'esdevenen altres alteracions en el carcinoma serós durant els estadis primerencs de la tumorigènesi ja que no s'han realitzat anàlisis serioses quant a l'EIC⁽²³⁾. Matias-Guiu i col·laboradors hipotetitzen que el carcinoma serós podria esdevenir-se a partir del carcinoma endometrioides a través de les mutacions en p53. Aquest model es basa en la descripció de carcinomes mixts de tipus endometrioides i serós⁽²⁵⁾.

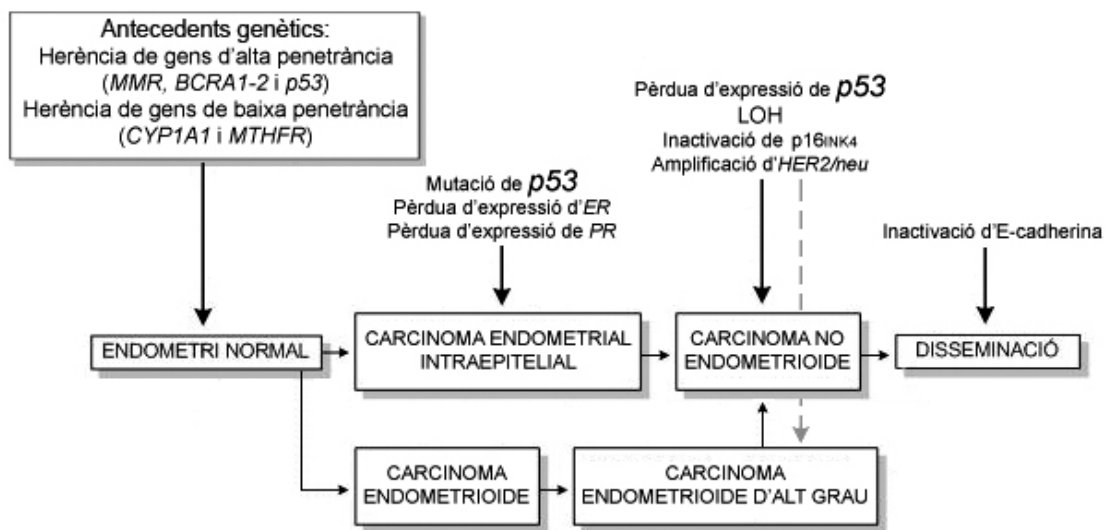


Figura 19, esquema del model de progressió del NEEC ^(23, 25): a l'esquema es mostren les principals alteracions genètiques que succeeixen al llarg del procés d'establiment del carcinoma endometrial no endometrioides i la seva posterior disseminació. Tot i que està acceptat el model dual de carcinogènesi endometrial, com es pot observar en l'esquema, el NEEC també es pot originar a partir de l'EEC d'alt grau.

4.4. Altres alteracions moleculars

Grup d'alteracions moleculars descrites en el carcinoma endometrial sense diferències significatives entre la via genètica de l'MSI i la via genètica de la CIM; és a dir que no poden ser incloses d'una manera majoritària dins d'un dels dos grups d'alteracions que defineixen el model dualístic de tumorigènesi endometrial.

4.4.1. Pèrdua d'heterozigositat (LOH)

La pèrdua d'heterozigositat (LOH) és un mecanisme genètic pel qual una cèl·lula heterozigòtica somàtica esdevé homozigòtica o hemizigòtica a causa de la pèrdua de l'al·lel salvatge. Avui en dia es reconeix l'LOH com una de les majors causes de creixement maligne. En el carcinoma endometrial s'ha descrit un gran nombre de locis cromosòmics diferents afectats per l'LOH. És conegut el fet que hi ha una gran variabilitat de resultats respecte

els diferents estudis realitzats, la qual cosa fa que les comparacions siguin difícils, però aquest fet reflexa l'enorme complexitat genètica de la patologia endometrial ^(66, 88, 166-168). Un gran nombre d'estudis d'LOH han estat realitzats per determinar les regions del genoma que podrien contenir importants supressors tumorals relacionats amb el carcinoma endometrial ^(100, 169-172). Normalment l'LOH és conseqüència de rearranjaments i delecions de gens supressors tumorals en els cromosomes de les cèl·lules tumorals. A través de l'anàlisi de les seqüències dels microsatèl·lits, l'hemizigosi s'observa en aquells tumors amb LOH, comparada amb l'heterozigosi de la línia germinal. S'ha descrit que l'LOH en el carcinoma endometrial afecta un gran nombre de cromosomes. Però sembla que els locis dels cromosomes 3p,10q,17p i 18q són els més importants, ja que han mostrat una significativa LOH en els diversos estudis realitzats ^(100, 169-172). Seguint amb el model dualístic de carcinogènesi endometrial, s'ha observat que l'LOH afectaria diferents supressors tumorals segons la via de carcinogènesi de l'MSI o de la CIN. Diversos treballs han descrit que l'LOH en el cromosoma 10q23, loci del gen *PTEN*, es dona aproximadament en el 40% dels carcinomes endometrioides mentre que en els carcinomes no endometrioides és poc freqüent ^(94, 100, 103). També ha estat descrita la pèrdua d'expressió de la proteïna del retinoblastoma (*Rb*) relacionada amb l'LOH en el 20% dels carcinomes endometrioides ⁽¹⁷³⁾. Pel contrari, en el carcinoma no endometrioide l'LOH de *p53* i *d'E-cadherina* es dona respectivament en el 30% i el 87% dels casos, fet que no s'esdevé en la via MSI ^(23, 69).

4.4.2. Pèrdua d'expressió de p27^{KIP1}

p27^{KIP1} és membre del grup de proteïnes conegudes com inhibidors de ciclins dependents de cinases. La proteïna p27^{KIP1} produeix l'aturada del cicle cel·lular quan se sobreexpressa i actua com a supressor tumoral prevenint l'entrada en fase S del cicle cel·lular quan es produeix un dany al DNA. Els nivells normals de p27^{KIP1} són importants per al control de la progressió cel·lular i l'oposició a la progressió tumoral ⁽¹⁷⁴⁾. S'han realitzat pocs treballs que relacionin p27^{KIP1} amb el carcinoma endometrial. Tanmateix, la pèrdua d'expressió de p27^{KIP1} és una constant que s'ha trobat en diversos estudis ⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁷⁾. A més s'ha descrit una disminució de l'expressió de p27^{KIP1} comparant la hiperplàsia complexa amb atípia i carcinoma, per la qual cosa s'ha suggerit un possible paper diagnòstic de p27^{KIP1} que permetria diferenciar entre aquests dos estadis de la patologia, cosa que avui en dia representa un cert problema ⁽¹⁷⁷⁾.

4.4.3. Pèrdua d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$

El gen *CDKN1A* codifica el supressor tumoral $p21^{WAF1/CIP1}$, relacionat amb el control de la regulació del cicle cel·lular. p53 regula l'activació transcripcional de gens com $p21^{WAF1/CIP1}$, seguit de la inactivació de ciclines dependents de cinases ⁽¹⁷⁸⁾. Així doncs, $p21^{WAF1/CIP1}$ és un important efector de la via de p53 específica del control cel·lular, i la seva inactivació pot tenir un paper potencial en la progressió tumoral ⁽¹⁷⁹⁾. S'ha descrit que $p21^{WAF1/CIP1}$ pot estar infraexpressat en tumors sense alteracions de p53, cosa que indica un possible mecanisme alternatiu en la inactivació de $p21^{WAF1/CIP1}$ ⁽¹⁸⁰⁾. S'ha descrit el decrement de l'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$, comparant mostres normals amb tumorals ⁽¹⁸¹⁾. A més s'han trobat alteracions en el gen de $p21^{WAF1/CIP1}$ fins a un 40% dels carcinomes endometrials ⁽⁶⁹⁾.

4.4.4. Pèrdua de funció de les molècules de control apoptòtic *Bcl-2* i *BAX*

L'apoptosi o mort cel·lular programada és un procés fisiològic altament regulat per l'equilibri de factors proapoptòtics i antiapoptòtics, que afavoreixen una o altra condició. Bcl-2 està considerat com a factor antiapoptòtic mentre que BAX és un factor proapoptòtic. En el carcinoma endometrial s'ha descrit una pèrdua de funció tant de Bcl-2 com de BAX en més d'un 65% dels casos per Bcl-2 i d'un 43% per BAX; no obstant això, no s'ha trobat correlació entre la pèrdua de funció d'aquests dos factors en la patologia endometrial ⁽¹⁴¹⁾.

4.5. Dubtes del model dualístic, mixtura d'EEC i NEEC

Bokhman i col·laboradors descriueren el 1983 els dos tipus patogènics de carcinoma endometrial ⁽²⁴⁾. Durant els anys següents molts grups han anat aportant proves que han permès fer més sòlida la hipòtesi del model dualístic de carcinogènesi endometrial ^(1, 22, 23, 25, 46, 69, 90, 114, 172). Tanmateix, una certa ombra de dubte recau, encara, sobre aquest model, ja que han aparegut algunes contradiccions en la literatura. La detecció d'MSI en el NEEC, la falta de correlació inversa entre p53 i MSI, i la freqüent existència de tumors que mostren unes característiques morfològiques, immunològiques i moleculars solapades i/o barrejades, resten força a aquest model dualístic i indiquen que els tumors individuals no segueixen invariablement aquest model ^(23, 25, 69, 81). No obstant això, Matias-Guiu i col·laboradors suggereixen que el NEEC es pot desenvolupar per dues vies diferents: 1) de novo a partir de mutacions a p53, LOH en diferents locis i altres alteracions genètiques encara per determinar

o 2) a partir de la diferenciació d'un EEC preexistent ⁽²⁵⁾. Aquest segon model explicaria l'existència de carcinomes mixtes i la presència d'alteracions típiques d'EEC; com MSI, presència d'hiperplàsia o alteracions genètiques de *PTEN*, *K-ras* i *β-catenina* en NEEC. Segons aquesta hipòtesi el NEEC de novo (la situació més comuna) seguiria les característiques de la via CIN, mentre que el NEEC desdiferenciat mostraria característiques solapades amb l'EEC, és a dir la via MSI ⁽²⁵⁾. A més, a part de l'EEC i el NEEC, també s'ha suggerit un altre tipus de carcinoma endometrial que apareix en dones que presenten una predisposició genètica. Hom postula que caldria classificar-lo com si fos un altre subtipus que es diagnostica a edats curtes i pot estar relacionat o no amb els estrògens, i que possiblement explicaria possibles contradiccions del model dual ^(1, 21-23).

5. Factors pronòstic del carcinoma endometrial

Es defineix com a factor pronòstic aquella circumstància que pot ser predictiva del comportament biològic del carcinoma d'endometri. Els factors pronòstic són de gran importància, importància que rau en la possible identificació de grups d'alt risc i en la consegüent evitació de tractaments adjuvants innecessaris en pacients de bon pronòstic, a més de reservar el benefici potencial d'una teràpia més extensiva per aquelles pacients amb major agressivitat tumoral. Diversos estudis realitzats han demostrat que els factors pronòstics pel carcinoma endometrial es poden separar en factors de primera generació i factors de segona generació. Els factors de primera generació es determinen amb un simple examen macroscòpic de la pesa quirúrgica o a través d'hematoxilina/eosina. Els factors de primera generació més importants inclouen l'estadi F.I.G.O. i el grau histològic, a més de la profunditat d'invasió miometrial, l'afectació ganglionar, la invasió de l'espai limfovascular, el tipus histològic i l'edat. Els factors de segona generació requereixen tècniques bioquímiques i moleculars per portar terme la seva determinació. Els factors de segona generació més importants inclouen els receptors hormonals, marcadors de proliferació, ploïdia i alteracions genètiques en oncògens i supressors tumorals ^(182, 183).

5.1. Factors de primera generació

Són factors als quals clàssicament s'ha donat un valor pronòstic, i llur determinació es fa mitjançant un examen morfològic macroscòpic a partir de la peça quirúrgica i un de microscòpic practicant una tinció amb hematoxilina/eosina.

5.1.1. Estadiatge F.I.G.O.

Avui en dia els estadis F.I.G.O. són el paràmetre pronòstic individual més potent per a les dones afectades pel carcinoma endometrial. L'estadi F.I.G.O. va ser revisat el 1988 transformant-se d'un estadiatge clínic a un estadiatge quirúrgic. El nou estadiatge F.I.G.O. requereix histerectomia i avaluació patològica. Els carcinomes, segons aquesta classificació, es divideixen en quatre estadis: (I) tumor limitat al cos uterí, (II) extensió del tumor al cèrvix, (III) extensió als òrgans pèlvics i (IV) extensió més enllà dels òrgans pèlvics. A més dels quatre estadis proposats hi ha una divisió de cadascun en subestadis, tres per l'estadi I, dos per l'estadi II, tres per l'estadi III i dos per l'estadi IV (Taula 6) ⁽¹⁸⁴⁾.

La gran majoria de les pacients a les quals se'ls diagnostica un carcinoma endometrial presenten estadis I (el tumor està delimitat a la cavitat uterina). Els índexs de supervivència descrits després de 5 anys lliures de malaltia mostren un 90% de supervivència per estadis I, un 83% per estadis II i un 43% per estadis III ⁽¹⁸⁵⁾. Els índexs referits a l'estadi I mostren un 93,8% de supervivència per estadis IA, un 95,4% per estadis IB i un 75% per estadis IC ⁽¹⁸⁶⁾. A partir d'aquests resultats es pot considerar que el carcinoma endometrial diagnosticat a estadis inicials és una patologia de bon pronòstic, per tant és molt important l'estudi de marcadors de la patologia endometrial amb valor diagnòstic.

ESTADIFICACIÓ F.I.G.O. DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL		
ESTADI	DEFINICIÓ	CATEGORIA TNM
*	TUMOR 1 ^{ARI} NO COMPROVAT	TX
*	NO EVIDÈNCIA DE TUMOR 1 ^{ARI}	T0
0	CARCINOMA IN SITU (CARCINOMA PREINVASIU)	TIS
I	TUMOR LIMITAT AL COS UTERÍ	T1
IA	Tumor confinat a l'endometri	T1A
IB	Invasió < 1/2 miometri	T1B
IC	Invasió > 1/2 miometri	T1C
II	EXTENSIÓ DEL TUMOR AL CÈRVIX	T2
IIA	Afectació endocervical glandular única	T2A
IIB	Afectació de l'estroma endocervical	T2B
III	EXTENSIÓ ALS ÒRGANS PÈLVICS	T3
IIIA	Afectació de la serosa i/o ovaris i/o citologia peritoneal positiva	T3A
IIIB	Afectació vaginal	T3B
IIIC	Metàstasi a ganglis pèlvics i/o paraòrtics	N1
IV	EXTENSIÓ MÉS ENLLÀ DELS ÒRGANS PÈLVICS	T4
IVA	Invasió de la mucosa intestinal i/o de la bufeta	M0
IVB	Metàstasi a distància	M1

Taula 6. Estadis del carcinoma endometrial establerts per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia ⁽¹⁸⁴⁾. TNM és l'abreviatura de *tumor nodule metastasis*. Es tenen en compte aquests tres factors per determinar: 1) Quina mida té el tumor primari i a on s'ubica (**T**), 2) Si el tumor s'ha disseminat als ganglis o nòduls limfàtics (**N**) i 3) Si el càncer s'ha disseminat altres parts del cos (**M**).

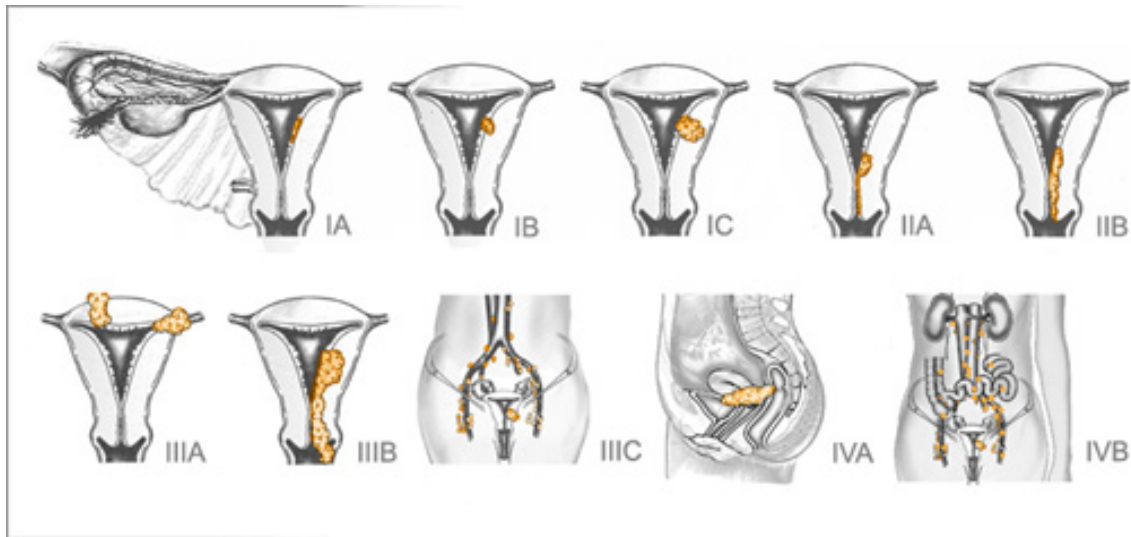


Figura 20, esquema de progressió de l'EEC de l'estadi IA al IVB: l'esquema mostra la progressió del tumor endometrial en cadascun dels estadis estadis F.I.G.O.. L'estadi de carcinogènesi inicial és l'IA en el qual el tumor es troba confinat a l'endometri; el tumor surt de la cavitat endometrial progressivament fins arribar a l'estadi IVB, que es caracteritza per presentar metàstasis a distància.

5.1.2. Grau histològic

Conjuntament amb els estadis F.I.G.O., el grau histològic és un factor molt sensible amb un valor pronòstic amplament reconegut⁽¹⁸⁷⁾. El sistema de gradació que estableix la F.I.G.O. es basa en dos paràmetres que s'han de tenir en compte: el grau arquitectural i el grau nuclear⁽¹⁸⁴⁾.

1) El **grau arquitectural** es determina per l'extensió del tumor, format per masses sòlides de cèl·lules, comparades amb les glàndules ben definides⁽¹⁾. Segons la F.I.G.O. es poden distingir tres graus arquitecturals en el carcinoma endometrial: G1, G2, i G3 (Taula 7).

2) El **grau nuclear** es determina per la variació de la mida i la forma nuclears, la distribució de la cromatina, la mida dels nuclèols i el nivell d'índex mitòtic. Segons la F.I.G.O. es poden distingir tres graus nuclears en el carcinoma endometrial: G1, G2, i G3 (Taula 8). En presència d'atípia nuclear (nuclis polimòrfics) notable s'ha d'augmentar a 1 el grau nuclear⁽¹⁸⁸⁾.

Estudis citomètrics han demostrat una bona correlació entre el grau nuclear obtingut a partir de la classificació basada en la gradació F.I.G.O., mètode relativament subjectiu, i l'obtingut per morfometria ⁽¹⁸⁹⁾.

GRAU ARQUITECTURAL DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

GRAU	ÀREA D'AFECTACIÓ
G1	5% o menys del tumor format per masses sòlides
G2	Entre 6 i 50 % del tumor format per masses sòlides
G3	Més del 50% del tumor format per masses sòlides

Taula 7. Gradació arquitectural proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia ⁽¹⁸⁴⁾.

GRAU NUCLEAR DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

GRAU	CARACTERÍSTIQUES CEL·LULARS	MITOSIS
G1	Nuclis ovals, nuclèols petits i cromatina dispersa	Escasses
G2	Variabilitat de la mida nuclear, nuclèols grans i cromatina dispersa	Ocasionals
G3	Nuclis amb destacat augment de la mida, pleomòrfics, nuclèols eosinòfils prominents i cromatina irregular	Abundants

Taula 8. Gradació nuclear proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia ⁽¹⁸⁴⁾.

A mesura que el tumor perd la seva diferenciació i augmenta la gradació, les probabilitats de supervivència disminueixen. Estudis de supervivència realitzats després de 5 anys lliures de malaltia mostren un 94% de supervivència en pacients amb grau 1, un 84% pel grau 2 i un 72% pel grau 3. No obstant això, la gradació F.I.G.O. ha patit modificacions recents no formalment adoptades però amb una certa millora pel que fa a la reproduïbilitat ^(190, 191). També s'ha descrit que el grau histològic correlaciona amb altres factors pronòstics com la profunditat d'invasió miometrial o l'afectació ganglionar. Sembla doncs, que el grau histològic no és un pronosticador independent, a més la seva importància decreix en ajustar aquests altres factors. Tanmateix, com suggereixen els treballs de Lax i col·laboradors ⁽¹⁸⁷⁾, fins i tot per pacients d'avançat estat de la patologia, el grau histològic comporta un valor

pronòstic. Cal dir que en l'estadificació de la F.I.G.O., també s'hi contempla el grau histològic, per tant cadascun dels estadis es complementen amb un grau corresponent, dependent de les característiques del tumor.

5.1.3. Profunditat d'invasió miometrial

La profunditat d'invasió miometrial és un factor pronòstic de la virulència tumoral. El sistema proposat es divideix en dos grups: profunditat d'invasió miometrial de $<50\%$ i profunditat d'invasió miometrial de $\geq 50\%$. La profunditat d'invasió miometrial inicial és un factor pronòstic independent. A més s'ha descrit que està directament relacionat amb l'índex de recurrències, així com amb un augment del risc de metàstasis limfàtiques, pèlviques i aòrtiques ⁽¹⁹²⁾. Actualment es considera que la profunditat d'invasió miometrial és el factor predictiu més important de disseminació hematògena ⁽¹⁹³⁾.

5.1.4. Afectació ganglionar

Constitueix un factor pronòstic important però està relacionat amb els altres tres factors anteriorment comentats: els estadis F.I.G.O., el grau histològic i la profunditat d'invasió miometrial. Als estadis F.I.G.O. els carcinomes endometrials amb presència de metàstasis en ganglis pèlvics o paraaòrtics es classifiquen com a tumors IIIC. L'índex de supervivència de les pacients després de 5 anys lliures de malaltia amb ganglis paraaòrtics positius és d'un 36% comparat amb un 85% a les pacients amb ganglis paraaòrtics negatius ⁽¹⁹⁴⁾. En els carcinomes d'estadi clínic I, la presència de metàstasis ganglionars està directament relacionada amb la profunditat d'invasió miometrial. S'ha determinat que un tumor classificat com a grau 1 que envaeix $<50\%$ del miometri no presenta associació amb la metàstasi ganglionar pèlvica, però amb una invasió del miometri de $\geq 50\%$ la metàstasi ganglionar pèlvica es dona en un 25% dels casos ⁽¹⁹⁵⁾.

5.1.5. Invasió de l'espai limfovascular

La presència de cèl·lules tumorals als espais endotelials sembla ser un gran predictor de recurrència i mort per part del tumor endometrial. La invasió de l'espai limfovascular s'ha descrit com a factor pronòstic independent del grau histològic i de la profunditat d'invasió miometrial ⁽¹⁹⁶⁾. La invasió vascular és poc freqüent en carcinomes del tipus endometrioide; s'ha descrit que la freqüència d'invasió vascular incrementa en tipus cel·lulars desfavorables

tot arribant fins a un 95% d'afectació en carcinomes serosos ⁽¹⁹⁷⁾. Ambros i Kurman van demostrar, mitjançant una anàlisi multivariant, que la invasió de l'espai limfovascular es correlacionava significativament amb la supervivència en pacients amb adenocarcinoma d'endometri en estadi I ⁽¹⁹⁸⁾; tot i així, aquest paràmetre no està recollit als estadis F.I.G.O..

5.1.6. Tipus histològic

El tipus cel·lular s'ha identificat com un important marcador de predicció del comportament biològic del carcinoma endometrial. La F.I.G.O./O.M.S. estableix el tipus histològic de tumor en funció del tipus cel·lular present a l'àrea tumoral, subclassificant els carcinomes endometrials en els 2 grups anteriorment comentats: els carcinomes endometrials endometrioides, i els carcinomes endometrials no endometrioides ⁽¹⁾, (Taula 2). A més, durant els darrers anys s'han identificat dues vies moleculars que difereixen pels dos grups de carcinomes endometrials; però en la rutina clínica hom troba els carcinomes mixts, cosa que fa que aquest model no estigui del tot delimitat, ja que no explica el grup de carcinomes no endometrioides que vénen precedits pels carcinomes endometrioides o els carcinomes de tipus mixt ^(23, 197).

5.1.7. Edat

Com en la major part dels processos neoplàsics, l'edat està directament relacionada amb el pronòstic del càncer. Les dones joves tenen millor pronòstic, possiblement perquè presenten tumors més ben diferenciats histològicament. Els carcinomes endometrials de tipus II són de més mal pronòstic que els de tipus I i es caracteritzen pel seu diagnòstic en dones postmenopàusiques d'edat avançada. Diversos estudis han trobat significació estadística entre l'edat avançada i la baixa diferenciació tumoral ⁽¹⁹⁶⁾.

5.2. Factors de segona generació

Factors incorporats més recentment en l'estudi anatomopatològic que requereixen l'ús de tècniques especials (immunohistoquímica, PCR, citometria de flux o anàlisi d'imatge) per a la seva determinació ⁽¹⁹⁹⁾.

5.2.1. Receptors hormonals d'estrògens i progesterona

Tant els receptors d'estrògens (ERs) com els de progesterona (PRs) s'han correlacionat amb el càncer d'endometri; en diversos treballs publicats s'ha descrit la importància de la determinació dels nivells dels receptors hormonals (ERs) i (PRs) com a factor pronòstic significatiu ⁽²⁰⁰⁾, així com una significativa correlació entre l'expressió i quantitat de receptors d'esteroides amb l'estadi F.I.G.O., el grau histològic i la supervivència ⁽²⁰¹⁾. Es considera que la presència de receptors de progesterona és un factor pronòstic favorable, ja que aquells tumors amb menor nombre de receptors de progesterona presenten un major índex de recidives i mortalitat. Sembla doncs justificada l'estimació de la concentració hormonal de receptors en els casos de carcinoma endometrial avançat i recurrent ⁽²⁰²⁾.

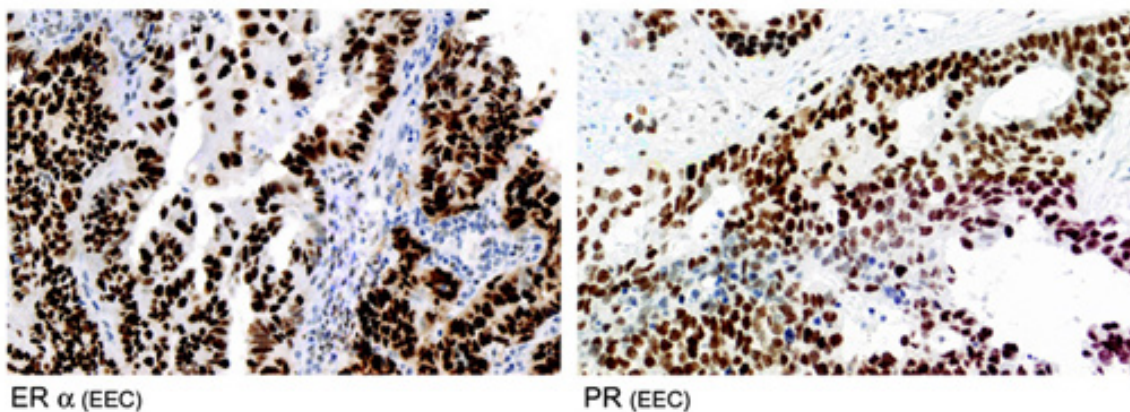


Figura 21, IHQ d'ER i PR: immunohistoquímica dels receptors d'estrògens alpha (ER α) i de progesterona (PR) en talls histològics d'EEC a 200 \times . Destaca el marcatge intens d'ambdós receptors principalment en el nucli de les cèl·lules epitelials.

5.2.2. Ploïdia del DNA

La inestabilitat cromosòmica (estructural o numèrica) és una característica primerenca de transformació maligna. Aquests tipus de canvis són freqüents en diverses patologies dins les quals hom inclou el carcinoma endometrial, del qual s'ha descrit, mitjançant anàlisis de citometria de flux, que l'aneuploïdia es troba entre un 20 i un 35% dels carcinomes endometrials ⁽²⁰³⁾. Les mesures de la ploïdia del DNA en pacients amb carcinoma endometrial s'han correlacionat significativament amb els criteris establerts pels factors pronòstic ⁽²⁰⁴⁾. A

més, a partir d'anàlisis multivariants s'ha pogut correlacionar la ploïdia del DNA amb la supervivència. Diversos autors afirmen que els càncers amb factors pronòstics desfavorables tenen xifres elevades d'aneuploïdia. A partir d'aquestes dades es pot considerar l'aneuploïdia com un factor pronòstic desfavorable ⁽²⁰⁵⁾.

5.2.3. Marcadors de proliferació

La capacitat proliferativa de les cèl·lules tumorals és la característica fonamental del creixement dels tumors ⁽²⁰⁶⁾. Hi ha diversos mètodes de quantificació de la capacitat de proliferar de les cèl·lules ⁽²⁰⁷⁾. **1) Citometria de flux:** La fase S del cicle cel·lular és aquella fase en la qual es produeix la síntesis del DNA. La citometria de flux permet separar la fracció de cèl·lules que es troben en aquesta fase. Diversos estudis han demostrat que la determinació de la fase S té una importància pronòstica destacable ⁽²⁰⁸⁻²¹⁰⁾. **2) Immunohistoquímica:** S'han desenvolupat mètodes immunohistoquímics per a la detecció d'antígens associats a la proliferació cel·lular, que permeten la determinació de l'activitat proliferativa del tumor però en preserven la morfologia. Els antígens de proliferació més freqüentment emprats són el PCNA i el Ki-67 (MIB-1) tissular ⁽²⁰⁷⁾.

1) PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) és una proteïna nuclear de 46 kDa que actua com a cofactor de la DNA polimerasa δ . La síntesi de PCNA ha estat directament correlacionada amb la replicació del DNA i la proliferació cel·lular ⁽²⁰⁷⁾.

2) Ki-67 (MIB-1) és una proteïna d'unió al DNA que s'expressa al llarg del cicle cel·lular en cèl·lules proliferants, però no en les quiescents (G0) ⁽²⁰⁷⁾.

Tant PCNA com Ki-67 són marcadors de proliferació cel·lular. PCNA permet determinar les cèl·lules en la fase S del cicle, mentre que Ki67 indica si les cèl·lules es troben en cicle o no ^(210, 211).

Estudis recents han determinat que l'expressió de PCNA i Ki-67 als carcinomes endometrials d'estadi I es correlaciona amb el grau histològic, la profunditat d'invasió miometrial i el risc de recurrència ^(212, 213). A més, hom ha correlacionat l'expressió de diferents marcadors de proliferació amb la supervivència en els carcinomes de tipus endometriode ⁽²¹⁴⁾.

L'estimació de la proliferació cel·lular en el carcinoma endometrial s'ha trobat significativament associada a l'estadi F.I.G.O., el grau histològic, el tipus histològic i el pronòstic ⁽²¹⁵⁾.

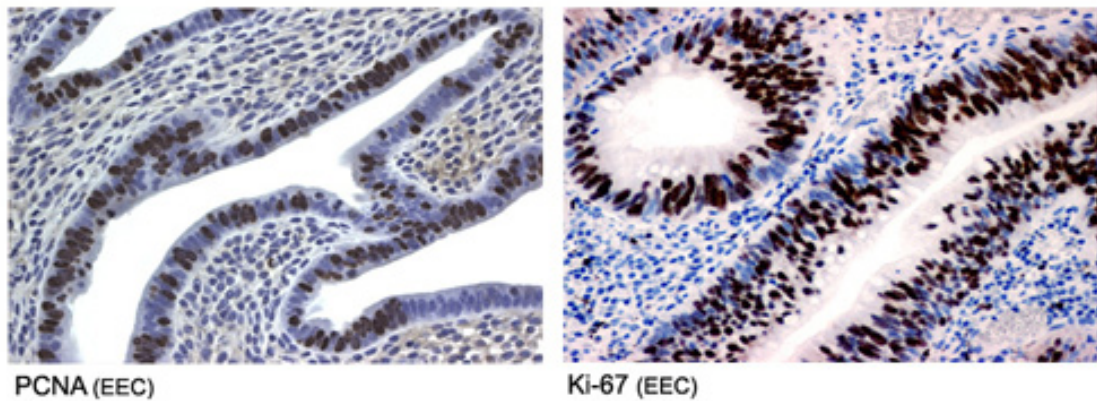


Figura 22, IHQ de PCNA i Ki-67: immunohistoquímica dels marcadors PCNA i Ki67 en talls histològics d'EEC a 200×. Destaca el marcatge intens d'ambdós marcadors principalment en el nucli de les cèl·lules epitelials.

5.2.4. Els protooncògens *HER-2/neu*, *K-ras* i *Bcl-2* com a factors pronòstic

Les cèl·lules per se contenen precursors potencials dels oncògens, designats com a protooncògens. L'activació dels protooncògens a oncògens s'aconsegueix com a mínim a través de cinc mecanismes diferents (inserció, translocació cromosòmica, ampliació gènica i mutació puntual). Els oncògens activats influeixen en la multiplicació cel·lular per pertorbació dels mecanismes normals de control de la proliferació. L'estudi d'aquests elements en la patologia endometrial ha permès la identificació de diversos protooncògens (*HER-2/neu*, *K-ras* o *Bcl-2*) utilitzats com a marcadors pronòstic ^(69, 183).

1) ***HER-2/neu* (*c-erb-B2*):** l'amplificació i sobreexpressió del protooncogen *HER-2/neu* s'esdevé aproximadament del 20% al 40% dels carcinomes endometrials. A més, s'ha descrit com a factor pronòstic negatiu associat a d'altres factors pronòstic adversos com estadis alts, grau alt i baixa supervivència ^(216, 217). No obstant això, altres estudis mostren que *HER-2/neu* no està associat independentment als factors pronòstic adversos, encara que sembla que sí que té influència sobre la supervivència global ⁽²¹⁸⁾. Les implicacions clíniques de les alteracions d'aquest protooncogen no són clares, per tant actualment es pensa que *HER-2/neu* és un paràmetre només d'utilitat potencial ⁽¹⁷⁾.

2) ***K-ras*:** les mutacions en el codó 12 de *K-ras* es troben presents aproximadament entre el 10% i el 30% dels carcinomes endometrials, majoritàriament de tipus endometriode ⁽¹¹¹⁾.

Diversos estudis han indicat que la presència de l'oncogen *K-ras* activat és un factor pronòstic negatiu ⁽²¹⁹⁾, tot i que d'altres estudis no ho han pogut confirmar ^(113, 220).

3) ***Bcl-2***: hom considera *Bcl-2* un factor antiapoptòtic, que impedeix la mort cel·lular programada mitjançant la inhibició de les proteïnes que desencadenen aquest procés, les caspases. Per tant l'activació aberrant de l'oncogen *Bcl-2* confereix a la cèl·lula la capacitat d'evitar l'apoptosi i esdevenir immortal. S'han trobat alts nivells de *Bcl-2* en la hiperplàsia endometrial amb una disminució de l'expressió en els carcinomes ⁽²²¹⁾. La pèrdua d'expressió de *Bcl-2* ha estat associada a carcinomes de pronòstic pobre, d'avançada profunditat d'invasió miometrial, d'estadis F.I.G.O. elevats i amb una alta probabilitat de metàstasis limfàtiques ⁽²²²⁾.

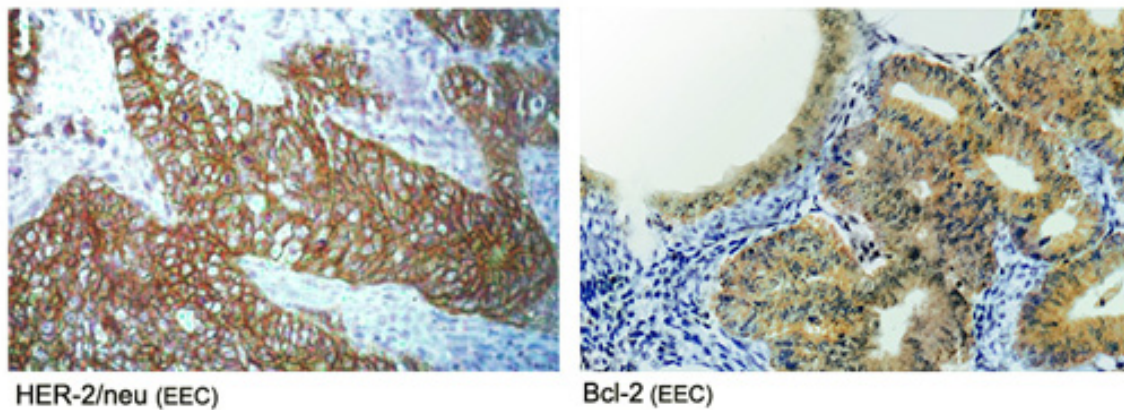


Figura 23, IHQ d'HER-2/neu i Bcl-2: immunohistoquímica dels marcadors HER-2/neu i Bcl-2 en talls histològics d'EEC a 200×. Destaca el marcatge intens d'ambdós marcadors principalment en el citoplasma de les cèl·lules epitelials.

5.2.5. Els supressors tumorals *PTEN*, *p53*, *p21^{WAF1/CIP1}* i *p16^{INK4a}* com a factors pronòstic

Els gens denominats supressors tumorals, antioncògens o dominants negatius en condicions normals prevenen la replicació cel·lular, actuen de fre per poder dur a terme tots els requisits necessaris previs a la divisió cel·lular. L'absència elimina el control normal de la proliferació cel·lular. L'estudi dels supressors tumorals en el carcinoma endometrial ha permès la identificació de diversos gens, entre els quals *PTEN*, *p53*, *p21^{WAF1/CIP1}* o *p16^{INK4a}*, emprats com a marcadors pronòstic ^(69, 183).

1) **PTEN:** s'ha observat que les mutacions a *PTEN* es donen gairebé exclusivament en el carcinoma endometrial. Minaguchi i col·laboradors ⁽²²³⁾ han mostrat que només les mutacions fora dels exons 5 al 7 poden representar un indicador molecular de supervivència favorable, independent de les característiques patològiques o clíniques del tumor. Però el rol de les mutacions de *PTEN* en el càncer d'endometri no és clar. En molts estudis s'ha mostrat que les mutacions de *PTEN* són un factor pronòstic positiu pel carcinoma endometrial associat al tipus histològic endometriode, a estadis inicials i a carcinomes no metastàtics. Altres estudis han correlacionat les mutacions de *PTEN* amb una menor recurrència i una major supervivència en tumors amb *PTEN* mutat en comparació als tumors que no presenten mutacions ^(101, 103, 224). Tanmateix, l'estudi del nivell d'expressió proteic de PTEN en el carcinoma endometrial descriu una associació entre la pèrdua d'expressió de PTEN i la patologia metastàtica sense significació estadística amb la supervivència, la recurrència i el tipus histològic ⁽²²⁵⁾. Una possible explicació podria ser que l'anticòs utilitzat reconegués tant la forma salvatge com les formes inactives o mutades de PTEN, tot combinant així mostres amb expressió de *PTEN* mutant i natiu. Anteriorment el mateix grup havia trobat que la metilació del promotor de *PTEN* estava significativament associada amb la patologia metastàtica i amb la inestabilitat de microsatèl·lits ⁽⁹⁵⁾. Un altre estudi recent indica que la immunopositivitat de PTEN és un indicador de pronòstic favorable per pacients amb carcinoma endometrial avançat ⁽²²⁶⁾.

L'estudi de Minaguchi i col·laboradors en què avaluen el factor pronòstic associat a les mutacions de *PTEN* en exons específics, podria servir per explicar molts dels treballs contradictoris en l'associació de *PTEN* entre el carcinoma endometrial metastàtic i no metastàtic. Les posicions entre els exons 5 al 7 no afecten el centre actiu del supressor tumoral PTEN, per tant mutacions fora d'aquest exons podrien comportar un pronòstic més favorable pel fet que no afecten el centre actiu de PTEN ⁽²²³⁾, tot i que cal dir que aquest model no ha estat demostrat. Calen més estudis en panells amplis de pacients afectades per carcinoma endometrial per determinar el valor pronòstic de les alteracions de *PTEN* a fi i efecte de permetre una bona correlació entre l'alteració del supressor tumoral i el tractament a seguir.

2) **p53:** les alteracions de *TP53* estan pràcticament associades de manera exclusiva amb uns tipus histològics específics, concretament amb els de tipus II, i no estan distribuïdes estocàsticament en tots els casos ⁽²²⁷⁾. La detecció nuclear de *TP53* ha estat associada, en molts estudis, als tipus histològics més agressius (carcinoma serós papil·lar i de cèl·lules

clares), a estadis avançats i a una baixa supervivència ^(211, 213, 228). Anàlisis multivariants mostren que p53 presenta un efecte independent respecte la supervivència ⁽¹⁷⁾. En carcinomes endometrials d'alt grau hi ha un increment de l'expressió de ciclina A associat al nivell d'expressió de p53. Recentment hom ha descrit la immunotinció positiva per ciclina A en un 31% dels carcinomes endometrials com indicador de pronòstic desfavorable ⁽²²⁹⁾. L'anàlisi mutacional de p53 respecte al pronòstic no es coneix tant bé, però hom ha descrit que les mutacions de p53 tenen un cert impacte en el pronòstic ⁽²³⁰⁾.

3) **p21^{WAF1/CIP1}**: la pèrdua d'expressió de p21^{WAF1/CIP1} s'ha associat a una supervivència reduïda en anàlisis de supervivència univariants, però en anàlisis de supervivència multivariants no s'ha trobat influència pronòstica ⁽²¹³⁾.

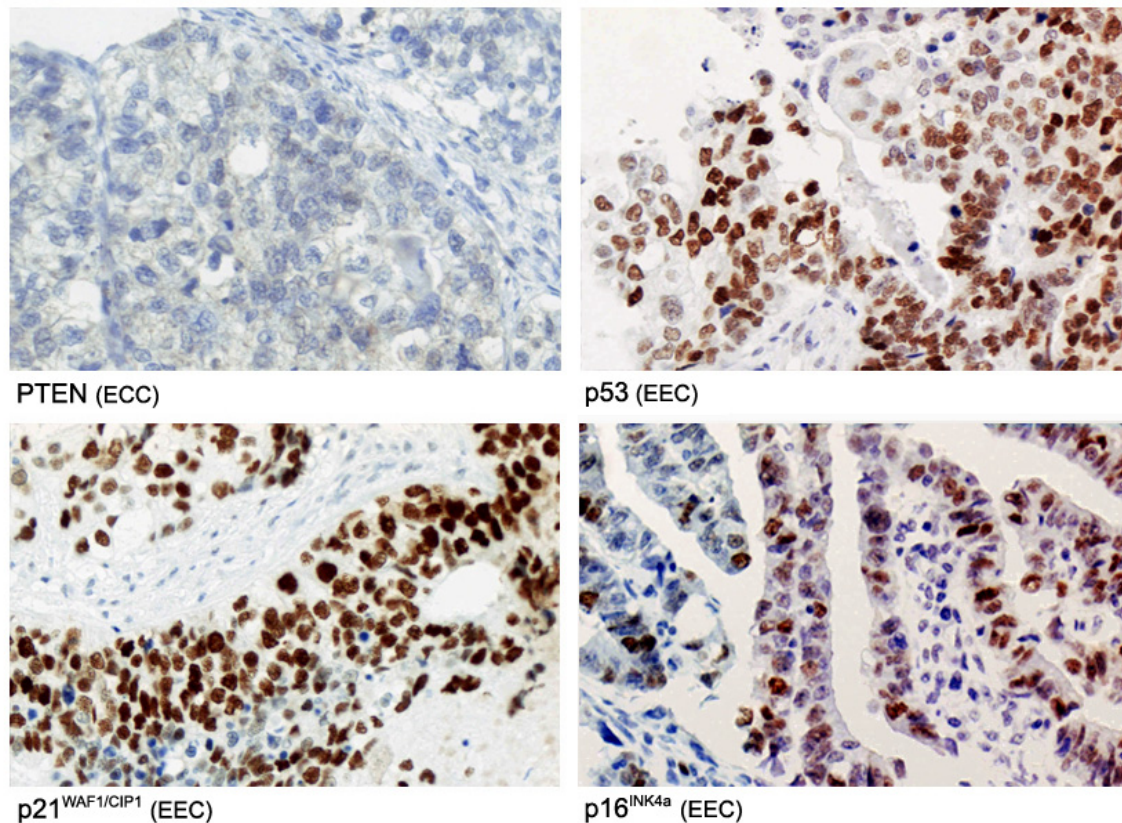


Figura 24, IHQ de PTEN, p53, p21^{WAF1/CIP1} i p16^{INK4a}: immunohistoquímica dels marcadors PTEN, p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a} en talls histològics d'EEC a 400×. Destaca el dèbil marcatge de PTEN degut a la pèrdua d'expressió en l'EEC. Les proteïnes reguladores del cicle cel·lular, p53, p21^{WAF1/CIP1} i p16^{INK4a}, mostren un marcatge intens, principalment en el nucli de les cèl·lules epitelials.

4) **p16^{INK4a}**: la pèrdua de l'expressió nuclear de la proteïna p16^{INK4a} s'ha trobat associada als carcinomes endometrials més agressius i a l'activitat proliferativa elevada (Ki-67). Per tant l'expressió nuclear de p16^{INK4a} representa un indicador pronòstic potent i independent de la patologia endometrial ⁽¹⁵²⁾.

5.2.6. Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) en la prognosi endometrial

Els gens responsables de l'MSI codifiquen proteïnes implicades en la correcció dels aparellaments erronis del DNA; per tant mutacions o delecions en aquests gens impossibiliten a la cèl·lula la reparació dels errors de replicació, els quals deixen la seva empremta en les seqüències repetitives. Malgrat que l'MSI es va trobar inicialment en pacients amb síndrome de càncer de còlon hereditari no polipòsic (HNPCC) ⁽²³¹⁾ també s'ha trobat en càncers esporàdics, entre els que figura el carcinoma endometrial. Tot i així molts dels carcinomes endometrials esporàdics amb MSI no presenten mutacions en els gens de reparació dels errors de replicació del DNA. En aquest càncers el fenomen s'explica per una hipermetilació del promotor d'alguns d'aquests gens, provocant-ne una inactivació epigenètica ⁽⁸⁷⁾. La inestabilitat de microsatèl·lits és detectada electroforèticament a partir de canvis de pes en els al·lels de les seqüències dels microsatèl·lits. En seccions anteriors s'ha comentat que estudis realitzats en panells amplis de mostres han identificat l'MSI en un 30% dels carcinomes endometrials, particularment en aquells de tipus endometriode ⁽⁸¹⁾. Malgrat aquest considerable percentatge de tumors amb MSI hi ha controvèrsia en l'efecte que pot tenir sobre el pronòstic. Per una banda hi ha grups que relacionen l'MSI amb un pronòstic favorable, amb una taxa de supervivència major d'un 20% en pacients amb carcinoma endometriode amb MSI o amb una supervivència, després de 5 anys lliures de malaltia, d'un 34% major en els casos amb afectació d'MSI als dos al·lels respecte l'afectació d'un sol al·lel ⁽²³²⁻²³⁴⁾. Tanmateix hi ha certes crítiques pel que fa al nombre de pacients incloses o als curts períodes documentats en els estudis. Per altra banda hi ha un gran nombre d'estudis realitzats, en panells més amplis de mostres, en què no s'ha trobat correlació entre l'MSI i l'edat, el grau histològic, l'estadi, la profunditat d'invasió miometrial o fins i tot amb la supervivència, i s'ha etiquetat l'MSI com a factor sense impacte en el pronòstic ^(233, 235-237). Malgrat les diverses contradiccions, l'MSI sembla un factor interessant ja que associat al tipus histològic endometriode podria explicar-ne el pronòstic favorable. A més, suggereix que la via molecular de carcinogènesi caracteritzada per la inactivació dels gens de reparació de la

transcripció del DNA dóna lloc a un fenotip clínic menys agressiu ⁽²³³⁾. Però per dotar de valor pronòstic significatiu l'MSI calen més estudis amb un nombre més ampli de casos i un major període de documentació.

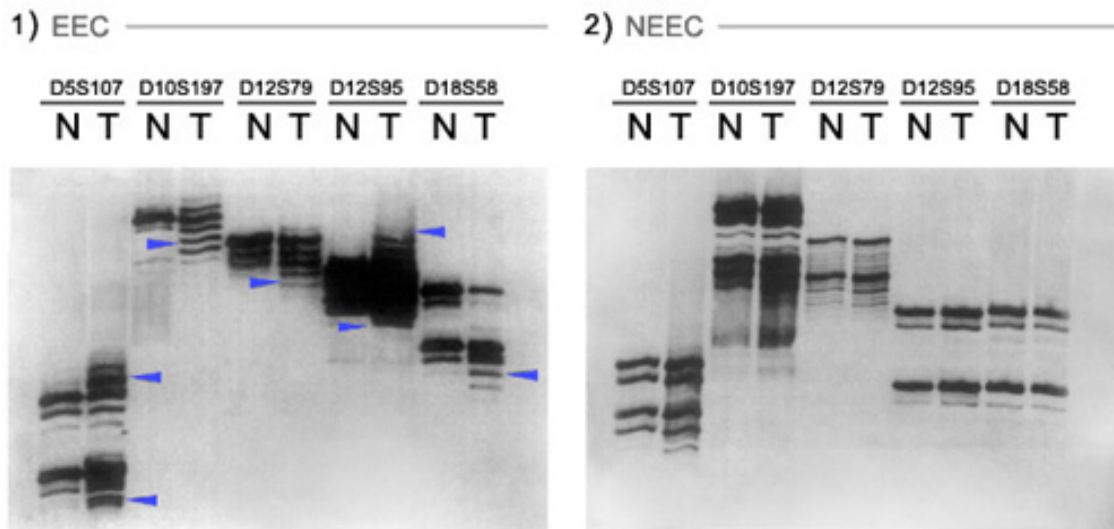


Figura 25, imatge de l'MSI ⁽⁸¹⁾: resultats del grup de Catusas i col·laboradors en els que mostren exemples de la inestabilitat de microsatèl·lits en el carcinoma endometrial. Es van amplificar mostres aparellades de DNA genòmic procedent de teixit normal i tumoral d'endometri per PCR utilitzant els dinucleòtids D5S107, D10S197, D12S79, D12S95 i D18S58. 1) exemple d'MSI en l'EEC. Les fletxes de color blau indiquen les alteracions en la mobilitat electroforètica de les mostres tumorals respecte les mostres normals. 2) el mateix experiment mostra l'absència d'MSI en el NEEC.

5.2.7. β -catenina com a factor pronòstic

Les mutacions en el gen de la β -catenina (CTNNB1) han estat descrites aproximadament en un 15%- 40% dels carcinomes endometrioides de baix grau, cosa que suggereix que les mutacions en aquest gen s'esdevenen en el grup de tumors menys agressius amb un baix potencial metastàtic ^(123, 238). De manera semblant, l'expressió nuclear de la β -catenina ha estat majoritàriament trobada en els carcinomes endometrioides de baix grau ⁽²³⁹⁾. Per tant el conjunt d'estudis realitzats apunten en la direcció de la β -catenina com a factor pronòstic favorable.

5.2.8. Angiogènesi associada a tumor en la prognosi endometrial

L'angiogènesi o formació de vasos *de novo*, és un procés importantíssim en el desenvolupament tumoral. L'estudi de la funció de les molècules que poden ser crítiques en la regulació de l'angiogènesi tumoral constitueix una de les estratègies farmacològiques més importants en la teràpia anticancerosa. L'associació entre la densitat microvascular i l'estadi així com la recurrència semblen indicar una possible importància pronòstica entre les pacients amb carcinoma endometrial ^(240, 241). Estudis més recents han confirmat que una densitat microvascular elevada està associada a un pronòstic pobre en la carcinogènesi endometrial, així com una alta densitat de macròfags associats al tumor està significativament relacionada amb una supervivència reduïda en anàlisis univariants ^(242, 243).

La inhibició de l'angiogènesi està considerada una de les estratègies més prometedores en les noves estratègies per combatre el càncer ^(244, 245). L'ús dels antiangiogènics podria motivar la quantificació de la densitat microvascular tumoral per prendre decisions relacionades amb l'estratègia terapèutica a seguir o fins i tot pel pronòstic ⁽²⁴⁶⁾.

6. Sumari i aspectes futurs

El nou desenvolupament tecnològic ha proporcionat noves perspectives i eines més potents per fer més comprensiu l'estudi del càncer. En particular, la tecnologia dels *microarrays* de cDNA, en combinació amb els nous suports informàtics, permet l'anàlisi de la regulació de milers de gens en un mateix tumor ⁽²⁴⁷⁾. Sens dubte la major contribució dels estudis amb *microarrays* té el seu espai en la taxonomia. Classificar un determinat tumor amb un nom concret el més aproximat possible permet ajustar el diagnòstic i el tractament casi de forma individual. La tecnologia dels *microarrays* es pot utilitzar per obtenir classificacions, establir associacions amb la línia cel·lular d'origen i ajudar al pronòstic, però amb l'avantatge addicional de poder identificar els gens que determinen aquesta classificació. L'aplicació més coneguda dels *microarrays* de cDNA és la determinació de perfils de transcripció. Però els *microarrays* també s'han adaptat a la detecció de polimorfismes puntuals (SNP o *Single Nucleotide Polymorphisms*) i a la de variacions en la dosificació del nombre de còpies gèniques mitjançant *microarrays* d'hibridació genòmica comparada (CGH *microarray*). La tècnica s'ha aplicat extensament durant els últims anys en els més diversos tipus de neoplàsies, mostrant una gran utilitat en la cerca de regions cromosòmiques. Actualment s'està desenvolupant una

tècnica que combina la tecnologia dels *microarrays* amb la CGH i en la que la hibridació es realitza sobre segments de DNA de mida inferior clonats en forma de cromosomes artificials bacterians o plasmidis (BAC o PAC). La tècnica es sustenta amb la gran quantitat de dades aportades pel projecte Genoma Humà sobre la ubicació, seqüència i contingut d'aquest fragments de DNA en bona mesura coneguts. Conjuntament amb eines recentment desenvolupades com la PCR a temps real, els *arrays* de teixit, la microdissecció làser o les noves tècniques de proteòmica, entre d'altres ⁽²⁴⁸⁾, farà possible una anàlisi exhaustiva de la diversitat neoplàsica endometrial. Anàlisis recents entre el carcinoma endometrioides i serós, aplicant aquestes noves tecnologies, han aportat proves sobre el model dualístic de carcinogènesi ^(249, 250). S'estan desenvolupant altres treballs més ambiciosos per trobar patrons d'expressió tenint en compte no només el carcinoma endometrial sinó diversos tipus tumorals ⁽²⁵¹⁾. Tanmateix, encara resta molta feina per fer per poder esclarir i entendre el procés biològic pel qual es desenvolupa el carcinoma endometrial. La recerca futura se centrarà en buscar nous gens rellevants conjuntament amb la descripció de llur repercussió clínica i l'impacte pronòstic, així com a desenvolupar estratègies terapèutiques racionals que tinguin com a diana les vies moleculars identificades en la tumorigènesi endometrial.



OBJECTIUS

OBJECTIUS

7. Objectiu general de la tesi

En els darrers anys s'ha fet cada vegada més evident que per combatre el càncer d'una manera més efectiva cal tenir un coneixement acurat de les seves característiques, no tan sols les referents als canvis morfològics sinó també les alteracions en les bases moleculars, responsables en últim terme dels canvis fenotípics i bioquímics del càncer. Per tant, el coneixement dels mecanismes moleculars a través dels quals un tumor s'estableix, prolifera i s'expandeix permetrà definir els diferents tipus de tumor per tal de facilitar el desenvolupament de tractaments específics per a cada tipus tumoral en funció de les alteracions que presenti.

L'endometri, per a desenvolupar la seva funció, està sotmès a un procés molt complex de regulació que és el resultat de la coordinació dels diferents tipus cel·lulars que en formen part i de l'equilibri entre els factors reguladors d'estimulació i els factors reguladors d'inhibició, com les hormones, els factors de creixement o les citoquines. Aquest conjunt d'elements que modulen el creixement i la proliferació cel·lular poden ser susceptibles de presentar alteracions, ja siguin d'origen genètic o ambiental. Aquestes alteracions modifiquen el procés normal de regulació del teixit endometrial i, per tant, poden conduir a l'aparició, establiment i desenvolupament de la patologia tumoral. Malgrat el coneixement que es té de les diferents alteracions presents en el carcinoma endometrial i els estudis genètics que s'estan duent a terme, les bases moleculars d'aquesta patologia encara romanen per esclarir. Per això es va proposar com a hipòtesi de treball el fet que l'endometri normal i tumoral presenten un comportament diferent degut a que ambdós teixits expressen gens diferents, expressen gens reprimits o deixen d'expressar gens normalment actius. Aquesta diferencialitat d'expressió explicaria el comportament tumoral i el procés de tumorigènesi. Per tant com a objectiu general d'aquest treball es varem plantejar ampliar el coneixement de les bases moleculars del

carcinoma endometrial mitjançant la identificació i caracterització de nous gens amb expressió diferencial potencialment implicats en l'origen i desenvolupament del càncer d'endometri.

7.1. Objectiu desglossat

L'objectiu general es pot desglossar en els següents objectius concrets:

Objectiu 1: cerca de gens que s'expressin de manera diferencial entre l'endometri amb afectació tumoral i l'endometri normal mitjançant la tècnica dels *microarrays* de *cDNA*. Es pretén buscar gens amb potencial ús com a marcadors amb valor diagnòstic o pronòstic del carcinoma endometrial, específicament en el tipus histològic endometriode, que és el carcinoma diagnosticat amb major incidència. De les seqüències aïllades per aquest mètode se'n farà l'anàlisi, identificació i caracterització, així com la comprovació de les diferències d'expressió trobades. Els resultats obtinguts en els *microarrays* de *cDNA* es validaran mitjançant l'ús de la tècnica de la PCR a temps real a nivell gènic i de les tècniques de *western blot* i d'immunohistoquímica a nivell proteic.

Objectiu 2: estudi d'associació entre els nivells d'expressió gènica i proteica dels gens escollits i el fenotip tumoral del teixit endometrial. Aquest estudi es durà a terme mitjançant l'anàlisi de correlació entre els nivells d'expressió gènica obtinguts per PCR a temps real, així com, els nivells d'expressió proteica obtinguts tant per *western blot* com per immunohistoquímica sobre *arrays* de teixit, i els paràmetres clínics i patològics dels tumors.

Objectiu 3: estudi funcional dels mecanismes d'acció dels gens trobats implicats en el desenvolupament i progressió del càncer d'endometri.



MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

8. Mostreig

8.1. Pacients a estudi

En aquest estudi s'ha inclòs un grup de pacients que han estat sotmeses a cirurgia (histerectomia) per carcinoma endometrial en els serveis de Ginecologia dels l'Hospitals Vall d'Hebron i de l'Hospital del Mar de Barcelona. Es tracta de pacients de 50 a 80 anys d'edat, que no han rebut cap tipus de tractament anterior, ni quimioteràpia, ni radioteràpia, ni tractaments hormonals. L'estudi va ser prèviament aprovat pel comitè ètic institucional i es va obtenir el consentiment informat de cadascuna de les pacients a estudi.

8.2. Tipus de mostra i recollida

Immediatament després de la histerectomia practicada a la pacient es va obtenir la mostra d'interès de la peça quirúrgica en condicions estèrils. Les mostres obtingudes d'una mateixa pacient consistiren en: mostra endometrial tumoral i mostra d'epiteli atròfic endometrial de la zona no afectada.

8.2.1. Mostres tumorals

Cada mostra de teixit es va dividir en dues parts una de les quals es va congelar a -80°C i l'altre part es va fixar en formol per generar blocs de parafina per posteriors anàlisis. Tot el material es va desar fins a no tenir l'informe anatomopatològic que confirmés el tipus histològic endometrioide.

8.2.2. Mostres control

Com a teixit control es van incloure dos tipus de mostres: 1) teixit atròfic endometrial de la zona no afectada (endometri atròfic, EA). 2) raspats endometrials de dones sanes premenopàusiques (endometri proliferatiu normal, ENP), aproximadament, en el mateix dia del cicle endometrial per obviar diferències a nivell hormonal.

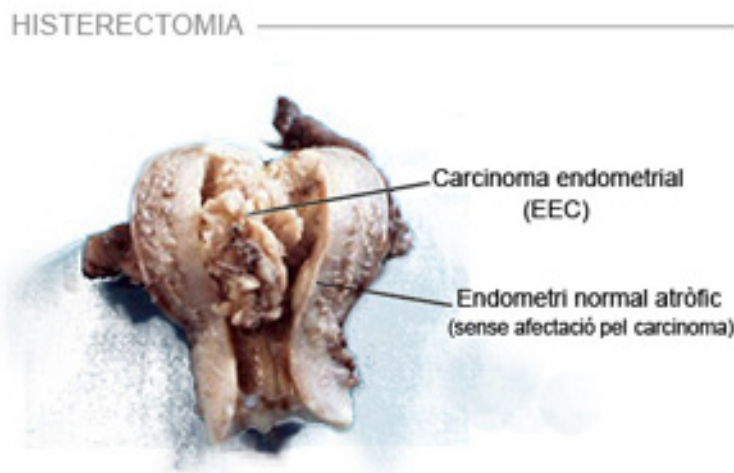


Figura 26, imatge d'obtenció del teixit atròfic i del teixit tumoral: Histerectomia realitzada per la presència de carcinoma endometrial. En la imatge s'observa l'úter obert sagitalment per la cara anterior, i a l'interior de la cavitat uterina es distingeix el carcinoma endometrial. Les mostres per a l'estudi s'obtenien a partir de fragments de teixit tumoral i de teixit normal atròfic no afectat pel carcinoma, les quals es congelaven immediatament a -80°C .

8.3. Processament de les mostres

8.3.1. Establiment de cultius primaris d'endometri proliferatiu

Els raspats obtinguts a partir de pacients, sense presència de patologia tumoral, es van utilitzar per generar explant en cultiu. Aquests explants es van recollir en medi de cultiu DMEM-10% amb sèrum fetal boví (Life Technologies, Inc. Rockville, MD) i es van sembrar en plaques de cultiu de 12 cm de diàmetre a 37°C en una atmosfera amb un 5% de CO_2 . Les cèl·lules van créixer, a partir dels explants, amb el mateix medi fins arribar a confluència, i es van tornar plaquejar per obtenir un cultiu primari i així aconseguir una major quantitat de cèl·lules. Per determinar que, efectivament, les cèl·lules eren de tipus epitelial es va realitzar un assaig d'immunocitofluorescència. Es van sembrar les cèl·lules sobre cobreobjectes rodons fins arribar a la confluència. Finalment es va realitzar l'assaig amb l'anticòs comercial anticitoqueratina 19 (CK19), proteïna característica d'aquesta línia cel·lular, a una dilució

1/100 (Abcam, Ltd., Cambridge, Regne Unit), utilitzant el fluorocrom FITC (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL), lligat a l'anticòs secundari, per diferenciar-ne el marcatge.

8.3.2. Extracció d'RNA total

Per procedir a l'extracció de l'RNA es va triturat el teixit en un morter ple de nitrogen líquid i que reposava sobre neu carbònica. Un cop polvoritzat el teixit i recollit en un tub de tipus eppendorf (1,5ml) (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanya) es va extreure l'RNA total seguint el protocol d'extracció *RNeasy mini kitTM* (Qiagen, Hilden, Alemanya). Els RNAs totals obtinguts es van resuspendre en 80 µl d'aigua tractada amb DEPC (Diètil Pirocarbonat) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO). Per extreure l'RNA total de les cèl·lules en cultiu es va fer un raspall de les plaques i es va aplicar el mateix protocol. L'RNA es va congelar a -80°C fins el moment de la seva utilització.

8.3.3. Anàlisi d'integritat de l'RNA total

La quantificació i determinació de la integritat de l'RNA es van realitzar utilitzant dos mètodes diferents:

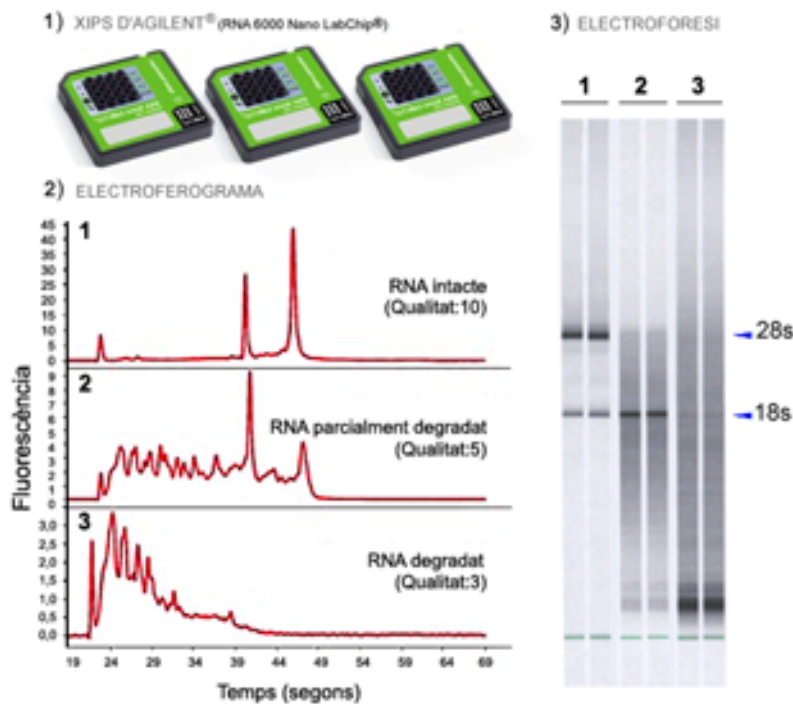


Figura 27, imatge del sistema d'anàlisi de l'integritat de l'RNA d'Agilent: 1) imatge dels xips d'Agilent[®] que permeten la determinació de l'integritat de l'RNA total per electroforesi. 2) imatge de l'electroferograma. A partir del perfil de l'electroferograma es pot determinar la qualitat de l'RNA (perfil 1: RNA de bona qualitat, perfil 2: RNA de qualitat mitja i perfil 3: RNA de mala qualitat). 3) imatge de l'electroforesi on s'observen les dues bandes dels RNAs ribosomals i a partir de la qual es determina l'electroferograma (carril 1: RNA de bona qualitat, carril 2: RNA de qualitat mitja i carril 3: RNA de mala qualitat).

1) determinació de l'absorbància a 260 nm i 280 nm pel cas de les mostres utilitzades en la hibridació dels *microarrays* de cDNA; i 2) pel protocol d'anàlisi *Nano Lab Chip kitTM* (Agilent, Palo Alto, CA) per les mostres utilitzades en l'anàlisi de PCR a temps real. Aquesta anàlisi va permetre obtenir la determinació de la puresa, qualitat i quantitat de l'RNA total obtingut.

8.3.4. Purificació de l'mRNA

L'extracció d'mRNA a partir de l'RNA total es va dur a terme seguint el protocol d'extracció *Oligotex KitTM* (Qiagen).

8.3.5. Anàlisi de Northern Blot

Es va realitzar un control d'integritat de l'mRNA, per *norther blot*, per tal de determinar la qualitat i quantitat d'mRNA necessàries per portar a terme els experiments d'hibridació dels *microarrays* de cDNA. Es van resoldre 3 µg d'RNA total en cada carril d'un gel d'agarosa al 1% en presència de formaldehid i tampó MOPS (1×); seguidament es va transferir a una membrana de nitrocel.lulosa abans de ser hibridada amb la sonda de DNA de 4 kb *KIAA0675* marcada amb [P³²] dATP (3000 Ci/mmol) mitjançant el sistema de *Random Prime-It IITM* (Stratagene, Inc., La Jolla, CA), basat en una *nick translation* produïda per una polimerasa *Exo-Klenow*. Es van utilitzar 50 ng de sonda marcada per a cada hibridació. Per tal de normalitzar la intensitat del senyal es va hibridar també amb una sonda radiomarcada de l'oligonucleòtid ribosomal *18S*.

9. Anàlisi d'expressió gènica diferencial en *microarrays* de cDNA

Per realitzar l'anàlisi d'expressió diferencial gènica entre el teixit endometrial normal i el teixit endometrial tumoral es va utilitzar el sistema d'hibridació de *microarrays LifeGridTM* (Incyte Genomics, Inc., Palo Alto, CA). Els *microarrays*, microxips o filtres d'hibridació són una tecnologia recent que permet determinar diferències d'expressió entre diferents tipus de mostres. El sistema, en concret el d'Incyte Genomics, Inc. amb el tipus de filtres *LifeGridTM*, es basa en la retrotranscripció de l'mRNA, el marcatge del cDNA amb P³³ i la hibridació del cDNA marcat al *microarray*. El *microarray* consisteix en un filtre d'hibridació de (10 × 21 cm) que presenta 8345 seqüències de cDNA per duplicat expressades en genoma humà, ja sigui gens coneguts o *EST*'s (fragments de cDNA seqüenciats que corresponen gens desconeguts).

Aquestes seqüències es troben unides al filtre químicament i alineades de tal manera que a cadascuna li correspon una coordenada concreta. Això permet saber què és el que es troba en cada posició.

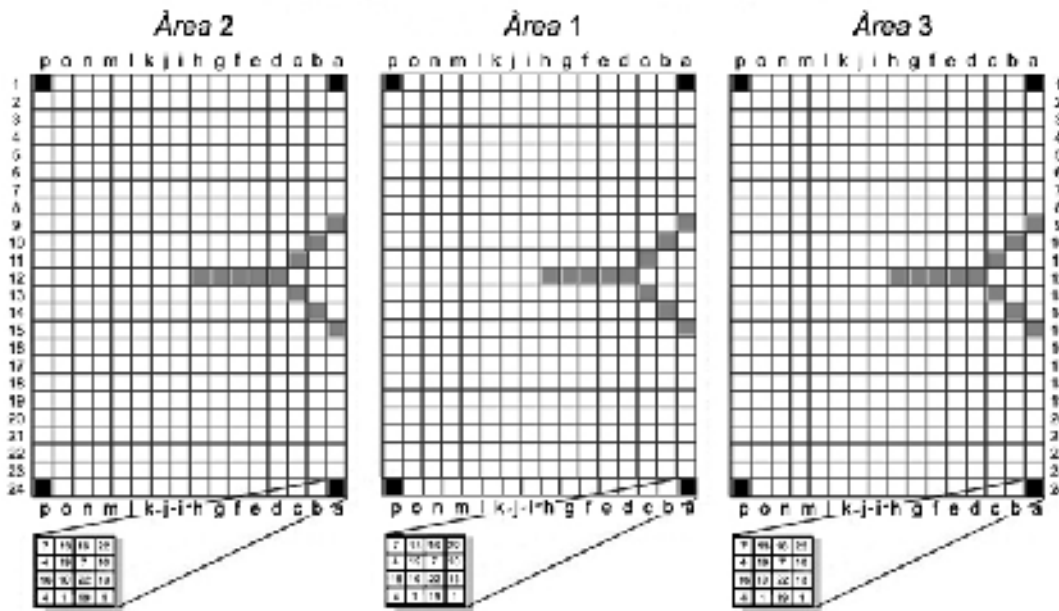


Figura 28, esquema dels filtres LifeGrid™ d'Incyte Genomics, Inc.: representació del *microarray* de nitrocel·lulosa de (10× 21cm) que conté 8345 seqüències de cDNA per duplicat. El filtre està organitzat per 3 àrees quadriculades i presenten unes coordenades concretes. A cadascuna de les coordenades hi ha dipositats, per duplicat, 8 gens enumerats. Les àrees fosques del filtre corresponen a controls de qualitat de la hibridació.

9.1. Preparació de les mostres

Per a realitzar la hibridació dels RNAs als filtres es van preparar dos grups de mostres, el grup de mostres control i el de mostres problema, seguint les següents condicions.

Mostres control: 1) mRNA d'endometri atròfic; es va generar una mescla de 16 mRNAs, d'una banda per obtenir més quantitat de mostra per fer la hibridació i de l'altra per obtenir els nivells d'expressió gènica mitja en el context atròfic. 2) mRNA d'epiteli proliferatiu; es va generar una mescla d'mRNAs procedent de 4 cultius primaris d'epiteli proliferatiu d'endometri sa per tal d'obtenir nivells d'expressió gènica en un context proliferatiu.

Mostres problema: 3) mRNAs de les mostres tumorals; es van mesclar quatre dilucions individuals d'mRNA procedents de pacients amb carcinoma endometrial endometriode.

MOSTRES HIBRIDADES EN EL MICROARRAY DE CDNA				
MOSTRA	TIPUS HISTOLÒGIC	ESTADI	GRAU	RNA
Control atròfica	EA	*	*	Pool (16)
Control proliferativa	ENP (cultiu l'ari)	*	*	Pool (4)
Tumoral 1	EEC	IA	1	ms
Tumoral 2	EEC	IA	2	ms
Tumoral 3	EEC	IA	2	ms
Tumoral 4	EEC	IIB	3	ms

Taula 9. Panell de mostres d'mRNA hibridades en el *microarray* de cDNA amb les seves característiques respectives. (ms: mostra simple).

9.2. Prehibridació dels filtres

La prehibridació dels filtres es va realitzar amb la solució específica *Prehyb/hyb buffer*TM (Nalgene Nunc Intl., Rochester, NY) durant 2 h a 42° C. Aquest procediment s'utilitza per posar a punt els filtres per poder iniciar l'experiment, ja que els filtres han d'estar rehidratats.

9.3. Preparació de la sonda experimental i del control

Es van retrotranscriure 0,5 µg d'mRNA problema i 0,5 µg d'mRNA control procedents de *Human LifeGrid*TM 1.0.Kit (Incyte Genomics, Inc.), utilitzant 2 µl d'encebadors Oligo DT, escalfant la barreja a 70°C 10 minuts i assecant-la a baixa temperatura durant 4 minuts a la centrífuga de buit *Speed Vac*[®] (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY). Per a la retrotranscripció (RT) es va preparar una reacció consistent en 6 µl de la retrotranscriptasa *M-MLVRT* (200u/ml), 7 µl de *Buffer 5× M-MLVRT* i 2 µl de nucleòtids dATP/dGTP/dTTP (10mM) (Incyte Genomics, Inc). També es van afegir 4 µl del nucleòtid dCTP, però aquest marcat amb [α P³³] (2000-4000 Ci/mmol) (PerkinElmer/NEN, Boston, MA). El dCTP marcat amb [α P³³] permet el marcatge radioactiu de la sonda que s'utilitza per hibridar en el

microarray. L'RT es va realitzar a 42°C durant 2 h a un volum final de 60 µl afegint 40 µl d'H₂O *RNasa free*.

9.4. Quantificació de les sondes

Es van agafar 2 µl de cada sonda marcada per a fer la determinació del comptatge radioactiu inicial (*cpm inicials*). La resta es van passar per una columna de resina per tal d'eliminar els nucleòtids no incorporats, i es reservaren 2 µl de l'eluit final de cada sonda per a fer la determinació del comptatge radioactiu final (*cpm finals*). La determinació de (*cpm i*) i (*cpm f*) es va realitzar amb el comptador de centelleig *Liquid Scintillation Counter 1410TM* (Wallac, Turku, Finlàndia) mitjançant l'aplicació del quocient:

$$[cpm\ finals / cpm\ inicials] \times 100 = \% \text{ d'incorporació}$$

(El % d'incorporació del nucleòtid marcat ha de ser més gran del 25% per tenir un marcatge acceptable).

9.5. Hibridació al filtre i rentats

En primer lloc es van desnaturalitzar les sondes escalfant-les a 95°C durant 3 minuts. Es van afegir la sonda desnaturalitzada i 50 µl de DNA d'esperma d'areng (com a solució de bloqueig per evitar unions inespecífiques al filtre) a dues alíquotes de 15 ml de solució d'hibridació. Es va afegir tota la preparació als tubs d'hibridació conjuntament amb els filtres. En un tub la sonda normal i en l'altre la sonda tumoral i es va deixar hibridar la sonda 16 h a 42°C en agitació suau. Els rentats dels filtres es van dur a terme descartant la solució d'hibridació i afegint 200 ml de 2 × SSC a temperatura ambient 5 minuts en agitació, seguit de dos rentats de 30 minuts a 68°C amb solucions detergents de (2 × SSC, 1% SDS) i (2 × SSC, 0,6% SDS) (Sigma-Aldrich, Inc.).

9.6. Exposició dels filtres

Es van muntar els filtres humits a la superfície dels xassís d'exposició *Molecular DynamicsTM* (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) embolicats en plàstic estirable *Saran WrapTM* (SC Johnson Co., Racine, WI) i coberts amb les pantalles de captació d'isòtops radioactius *Molecular DynamicsTM* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La radiació actua sobre les pantalles excitant aquell

punt on es troba situat l'isòtop radioactiu. Moments abans de l'exposició es van anul·lar les pantalles al transil·luminador. Finalment es van exposar els filtres 16 h a temperatura ambient resguardats de la llum. El procediment d'hibridació descrit es va repetir consecutivament amb tres parelles de mostres més, ja que els filtres *LifeGridTM* (Incyte Genomics, Inc.) permetien tornar a fer tres tandes més d'hibridació si es realitzaven uns rentats astringents per deshibridar les sondes antigues.

9.7. Obtenció de les dades

Un vegada realitzada l'exposició es van col·locar les pantalles al *Personal Molecular Imager FXTM* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Es va utilitzar un hardware específic que permet adquirir el que han captat les pantalles, és a dir que capta la radiació transmesa a les pantalles i la converteix en una imatge digital. Per tant, finalment, es va obtenir una imatge digital d'alta resolució en format gràfic (.TIFF) per a cada experiment d'hibridació. Les imatges es van analitzar al departament d'anàlisi bioinformàtica d'Incyte Genomics, Inc. utilitzant el software específic *Molecular Dynamics Storm & Array VisionTM* (Incyte Genomics, Inc.), que va permetre determinar tots els valors d'expressió pels diferent punts del *microarray*. A partir dels valors numèrics obtinguts es va poder confeccionar un llistat de gens d'expressió diferencial entre les mostres analitzades.

9.8. Anàlisi de les dades

La intensitat de marcatge radioactiu per a cada element del *microarray* es va comparar amb el valor de la mitjana aritmètica del soroll de fons o *background* i tots aquells elements amb valors inferiors a la mitjana es van excloure. A més, a partir d'anàlisis estadístiques es van excloure aquells valors amb coeficient de correlació entre les rèpliques fora de l'interval (0,4-2,5). Aquesta anàlisi es va dur a terme utilitzant el paquet informàtic *Molecular Dynamics Storm & Array Vision softwareTM* (Incyte Genomics, Inc.). Finalment, i després d'aplicar aquests filtres, es van avaluar un total de 1064 punts per duplicat als quals es va aplicar la mitjana aritmètica a més de calcular les ràtios entre el control atròfic i totes les altres mostres. Es van seleccionar els gens amb un nivell d'expressió que diferís almenys en un factor que fos de 0,75 a 1,25 ⁽²⁵²⁻²⁵⁵⁾ vegades respecte de la mostra de referència (l'endometri atròfic). La significació de les diferències es va determinar mitjançant l'aplicació del test *F* de dues cues ($p < 0,05$), cosa que va permetre obtenir un total de 53 gens. El grup de 53 gens mostrava una variació dels nivells

d'expressió significativa entre la mostra control (endometri atròfic) i les mostres problema (endometris tumorals). Aquesta anàlisi va permetre assegurar que els gens seleccionats presentaven unes diferències rellevants respecte de la mostra control i que per tant podien ser realment considerats com a gens reprimits o sobreexpressats. El segon bloc d'anàlisi es va portar a terme amb el full de càlcul *Excel*[®] (Microsoft Corp., Redmond, OR).

9.9. Cluster jeràrquic

Amb el conjunt de 53 gens diferencialment expressats es va realitzar l'anàlisi d'agrupació i d'organització o *cluster jeràrquic* aplicant el software d'anàlisi *online Genecluster*TM (<http://research.nhgri.nih.gov/microarray/main.html>) de l'N.H.G.R.I. (National Health Genome Research Institute), òrgan pertanyent a l'N.I.H. (National Institute of Health, Bethesda, MD). Aquest tipus de software bioinformàtic permet l'organització de les dades per tal que hom pugui visualitzar-les i analitzar-les. El programa ordena jeràrquicament els gens en funció de les semblances que presentin els perfils d'expressió utilitzant el coeficient de correlació de Pearson. El programa va construir una matriu de distàncies entre les parelles d'elements. L'algoritme jeràrquic primer comparava les distàncies i en determinava la més petita, fent-ne la mitjana i tornant-la a comparar amb la següent distància més curta. Aquest procediment es va anar repetint fins a tenir un ordre jeràrquic dels tots els elements segons la seva semblança. El *cluster* genètic a més presenta un codi de colors en funció del nivell d'expressió de cada gen. El vermell és per a la sobreexpressió, el negre per a expressions iguals que el control i el verd per a la infraexpressió. Finalment l'anàlisi també permet la representació de dos diagrames en arbre de distàncies que agrupen les mostres i els gens respectivament per la semblança quant als perfils d'expressió.

10. Confirmació de l'expressió gènica diferencial per la tècnica de la PCR a temps real (RT-Q-PCR)

La tècnica de la PCR a temps real consisteix en la detecció i anàlisi de la quantitat de producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA prèvies a l'inici del procés de PCR. Gràcies al mètode de detecció per fluorescència dissenyat pels nous termocicladors de PCR, aquesta tècnica permet

determinar l'acumulació del producte amplificat cycle a cycle, raó per la qual hom l'anomena PCR a temps real.

Per definir el concepte de PCR a temps real cal diferenciar les fases del procés d'amplificació de la PCR:

- 1) **Fase geomètrica:** existeix una alta precisió entre la concentració del DNA i el cycle de la PCR (en aquesta fase parlar de cycles és el mateix que parlar de concentració de DNA).
- 2) **Fase lineal:** no hi ha correlació entre l'amplificació del DNA i el cycle de la PCR.
- 3) **Fase plateau:** saturació dels reactius, amplifcació mínima.

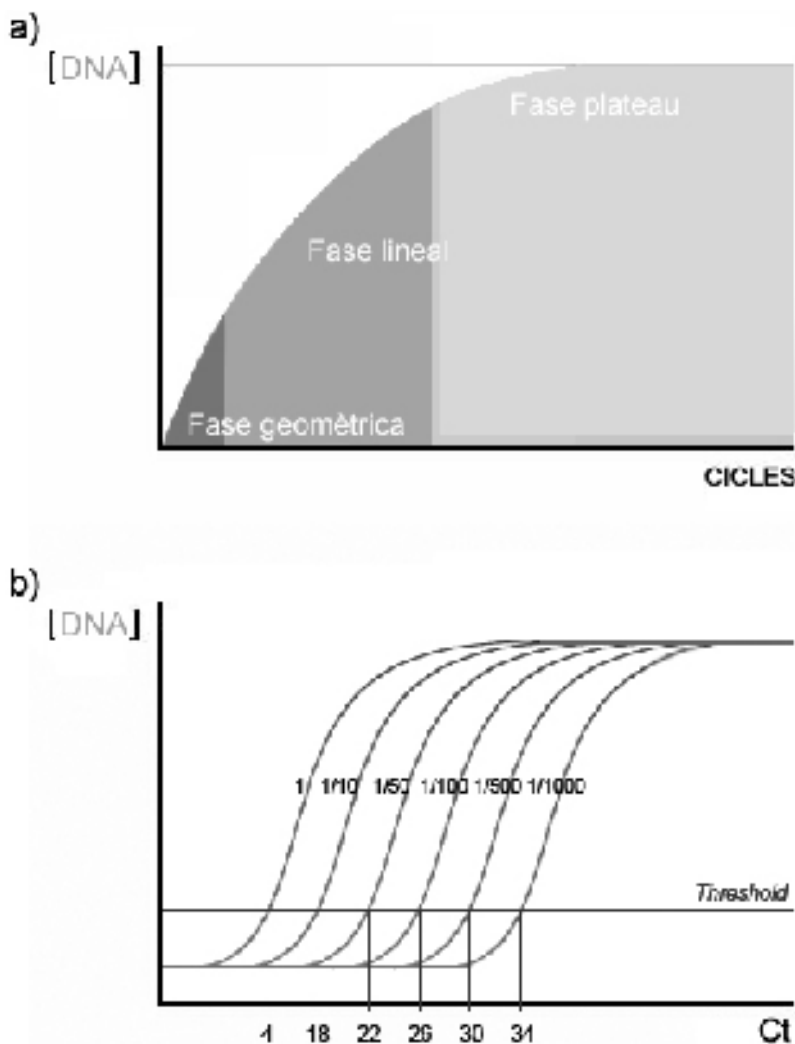


Figura 29a, esquema de les fases de la PCR: l'esquema mostra les diferents fases del procés d'amplificació de la PCR. En la fase geomètrica existeix una perfecta correlació entre la quantitat de DNA i els cycles de la PCR. Per tant és en aquesta fase que es pot extrapolar l'inici d'amplificació.

Figura 29b, esquema d'anàlisi de l'eficiència de la PCR pel mètode de la corba estàndard: l'esquema mostra les corbes d'amplificació d'un banc de dilucions de DNA d'1 fins a 1/1000. El llindar de detecció (*threshold*) situat en la fase geomètrica d'amplificació permet obtenir, per intersecció amb les corbes, el Ct de cadascuna de les dilucions. Amb els diferents Cts s'obté un recta el pendent de la qual permet determinar l'eficiència de la PCR. Un pendent de -3,32 indica que l'eficiència de la PCR és d'un 100%, així doncs es poden determinar amb exactitud el Cts de les mostres problema i per tant la seva quantitat.

L'eficiència de la reacció és màxima quan aquesta es troba a la seva fase geomètrica. Únicament es pot comparar o quantificar amb certesa si un gen s'expressa més que un altre quan la reacció d'amplificació dels dos gens es produeix en cada cas al 100% de les seves possibilitats. Si no fos així podríem estar obtenint resultats artefactuals deguts a les diferents cinètiques d'amplificació de cada gen. Per tant amb l'habilitat de mesurar els productes de la PCR a cada cicle d'amplificació és possible mesurar la quantitat de producte en el moment en què la PCR es troba a la seva fase geomètrica. És en aquest moment en què es pot extrapolar l'inici d'acumulació de les cadenes (Ct), ja que existeix una correlació perfecta entre quantitat de DNA i inici de l'amplificació. Així doncs, construint un banc de dilucions conegudes i obtenint-ne uns Cts es poden extrapolar al Ct d'una mostra problema i obtenir un valor de quantitat absoluta o relativa depenent del banc de dilucions.

10.1. Mostres

En el transcurs de l'estudi es va anar confeccionant un banc de tumors endometrials i les mostres es van anar emmagatzemant a -80°C . En obtenir un nombre de mostres tumorals suficientment representatiu ($n=30$) des dels estadis mes inicials IA fins als estadis metastàtics IIIA, es va extreure l'RNA total seguint el mateix protocol comentat anteriorment a l'apartat 2.1. També es van construir les mostres controls: 1) control de dones premenopàusiques (mesclant 4 mostres d'RNA d'endometri normal proliferatiu); i 2) control de dones postmenopàusiques (mesclant 16 mostres d'RNA d'endometri atròfic) (Taula 10).

10.2. Obtenció del cDNA per retrotranscripció

L'RNA es va retrotranscriure a partir dels oligonucleòtids aleatoris *Random Hexamers* (Life Technologies, Inc.), en un volum total de 20 μl , utilitzant la retrotranscriptasa *SuperScript II*[®] (Life Technologies, Inc.) amb 200 U/reacció, 25mM Tris-Cl, 75mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM ditiotreitol, 0,5 mM de cada dNTP, 150 ng de *Random Hexamers* (Life Technologies, Inc.) i 190 ng d'mRNA per cada reacció. La retrotranscripció es va realitzar en un termociclador *PerkinElmer 2400*[®] (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) amb el següent programa: 10 minuts a 70°C , 10 minuts a 25°C , 50 minuts a 42°C , 15 minuts a 70°C , per acabar el programa a 4°C per temps indefinit. La retrotranscriptasa es va afegir als 2 minuts d'iniciar-se la incubació a 42°C .

PANELL DE MOSTRES PROCESSADES PER RT-Q-PCR					
CODI	MOSTRA	TIPUS HISTOLÒGIC	ESTADI	GRAU	cDNA
01	Control atròfic	EA	*	*	Pool (16)
02	Control proliferatiu	ENP	*	*	Pool (4)
1	Tumoral	EEC	IA	1	ms
2	Tumoral	EEC	IA	1	ms
3	Tumoral	EEC	IA	1	ms
4	Tumoral	EEC	IA	2	ms
5	Tumoral	EEC	IB	3	ms
6	Tumoral	EEC	IB	2	ms
7	Tumoral	EEC	IB	2	ms
8	Tumoral	EEC	IB	2	ms
9	Tumoral	EEC	IB	2	ms
10	Tumoral	EEC	IC	3	ms
11	Tumoral	EEC	IC	2	ms
12	Tumoral	EEC	IC	2	ms
13	Tumoral	EEC	IC	2	ms
14	Tumoral	EEC	IC	2	ms
15	Tumoral	EEC	IC	2	ms
16	Tumoral	EEC	IC	3	ms
17	Tumoral	EEC	IIA	3	ms
18	Tumoral	EEC	IIA	2	ms
19	Tumoral	EEC	IIB	2	ms
20	Tumoral	EEC	IIB	2	ms
21	Tumoral	EEC	IIB	2	ms
22	Tumoral	EEC	IIB	2	ms
23	Tumoral	EEC	IIB	2	ms
24	Tumoral	EEC	IIB	3	ms
25	Tumoral	EEC	IIB	3	ms
26	Tumoral	EEC	IIB	3	ms
27	Tumoral	EEC	IIB	3	ms
28	Tumoral	EEC	IIB	3	ms
29	Tumoral	EEC	IIIA	2	ms
30	Tumoral	EEC	IIIA	2	ms

Taula 10. Panell de mostres de cDNA processades per PCR quantitativa a temps real amb les seves característiques patològiques respectives, d'invasió (estadi) i diferenciació (grau). (ms: mostra simple).

10.3. Oligonucleòtids i sondes TaqMan[®]

L'anàlisi de PCR quantitativa per validar l'expressió diferencial dels gens seleccionats es va realitzar utilitzant la tecnologia de les sondes TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA).

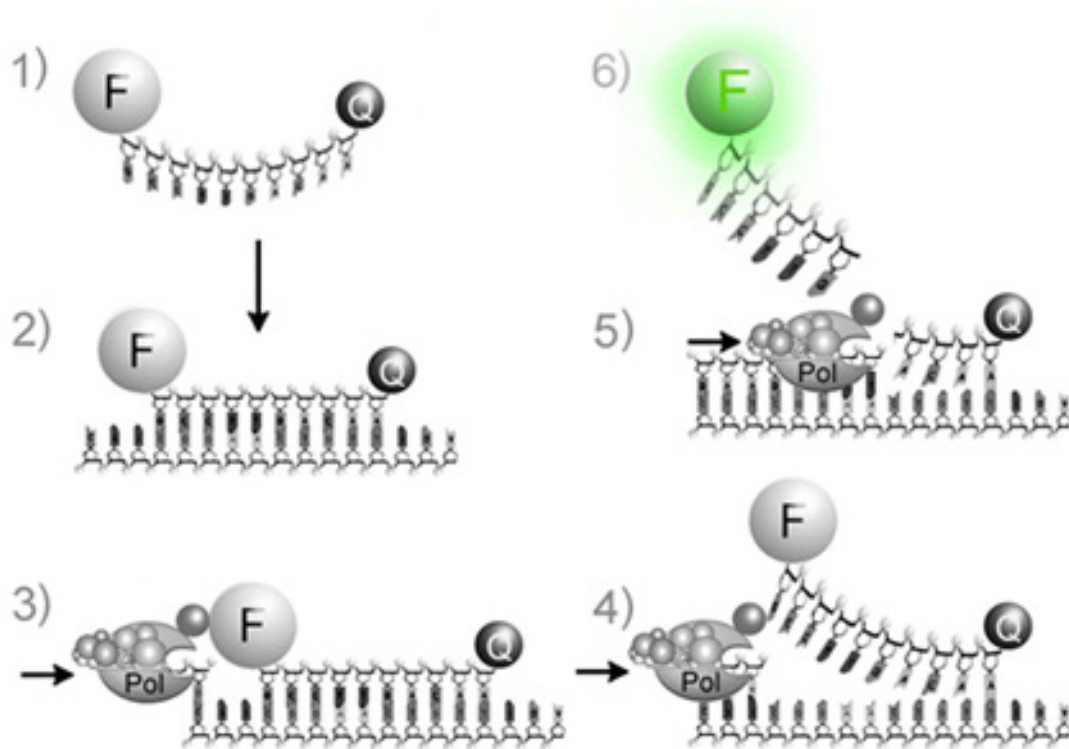


Figura 30, esquema del funcionament de la sonda TaqMan[®]: 1) sonda TaqMan[®] amb el fluorocrom i el quencher a cada extrem; 2) unió de la sonda al DNA; 3) unió de la polimerasa i inici del cicle d'amplificació; 4) la polimerasa desplaça la sonda en el procés d'amplificació; i 6) l'activitat exonucleasa de la polimerasa allibera el fluorocrom. El fluorocrom sense la influència del quencher emet fluorescència, que pot ser captada per un detector. D'aquesta manera es pot mesurar l'acumulació dels productes d'amplificació en cada cicle de PCR.

Aquest sistema de sondes aprofita l'activitat exonucleasa 5' a 3' de la *Taq* polimerasa. Es dissenya una cadena dins la regió flanquejada pels encebadors estàndards. Aquesta cadena actua com a sonda ja que porta un fluorocrom unit a l'extrem 5' i una altra molècula que fa de pantalla (*quencher*, en anglès) situada en l'extrem 3' que per proximitat absorbeix la fluorescència del fluorocrom. Quan la *Taq* polimerasa arriba a l'extrem 5' allibera el fluorocrom mitjançant la seva acció exonucleasa i el distància del *quencher* present a 3', moment en el qual el fluorocrom emet fluorescència. D'aquesta manera el sistema esdevé altament específic ja que el fluorocrom només produeix fluorescència quan s'ha amplificat la cadena d'interès.

Les seqüències dels oligonucleòtids i la sonda *TaqMan*[®] utilitzades en l'anàlisi de validació de l'expressió diferencial tant de *RUNX1/AML1* com d'*ETV5/ERM* es van obtenir de la base de dades *Assays on Demand*[™] (Applied Biosystems). Es van utilitzar les sondes següents: ref. Hs00231079_m1 per *RUNX1/AML1* i ref. Hs00231790_m1 per *ETV5/ERM*. Es va utilitzar

l'rRNA eucariòtic *18S* ref. C6_4308329 (Applied Biosystems) com a control endogen més apropiat per les mostres a estudiar amb expressió ubiqua i escassa variació entre els diferents anàlisis.

10.4. Protocol d'amplificació de la PCR a temps real

L'assaig que es va dur a terme amb la PCR a temps real va consistir en la quantificació relativa entre mostres afectades i mostres control per tal de determinar-ne les diferències d'expressió.

Quantificació relativa: el fonament es basa en comparar una mostra de cDNA del gen d'interès, en aquest cas *RUNX1/AML1* o *ETV5/ERM*, amb un altre gen d'expressió ubiqua a totes les mostres que fa de control, en aquest cas l' rRNA eucariòtic *18S* com a control endogen. La mesura a cada mostra tant del gen problema com del control ens proporciona un nivell de variació que indica la diferència d'expressió del gen que existeix entre cada una de les mostres.

La PCR a temps real es va portar a terme en el termociclador amb detecció de fluorescència *ABI PRISM 7700*[®] (Applied Biosystems) i les dades foren analitzades amb el software *Sequence Detection System*[™] (Applied Biosystems). La reacció va portar-se a un volum total de 20 µl, tot utilitzant 2 µl dels encebadors i les sondes *TaqMan*[®] (Applied Biosystems) de *RUNX1/AML1* o d'*ETV5/ERM* segons l'experiment, 10 µl de solució *Master mix*[™] (Applied Biosystems) que inclou una DNA polimerasa *Hot-Start*, els dNTPs amb dUTP, el MgCl₂ i un marcador de referència ROX que minimitza els errors de pipeteig. Finalment també es van afegir 7 µl d'H₂O destil·lada a la mescla de reacció i 1 µl de cDNA de cada una de les mostres. La reacció d'amplificació es va realitzar en plaques de 96 pous (Applied Biosystems). Es va utilitzar el programa d'amplificació següent: 52°C 2 minuts, 95°C 10 minuts, (95°C 15 segons i 60°C 1 minut) durant 50 cicles, per acabar el programa a 4°C a temps indefinit. Cada reacció es va portar a terme per triplicat amb les dilucions de cDNA de la mostra control atròfica, la mostra control proliferativa i les 30 mostres de carcinoma endometrial de tipus endometriode. El nivell d'expressió tant del gen endogen com dels problemes es va determinar amb la construcció d'una corba estàndard. La corba es va construir en cada una de les repeticions experimentals utilitzant 6 punts d'un banc de dilucions seriades de cDNA (1, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, i 1/1000). Totes les reaccions de PCR es van repetir com a mínim tres vegades, amb la qual cosa es van obtenir un mínim de 9 punts d'expressió per mostra.

10.5. Ajustament i normalització de la PCR a temps real

Per ajustar i normalitzar els diversos experiments de PCR a temps real es va utilitzar el software *ABI PRISM Sequence Detection SystemTM* (Applied Biosystems). Totes les reaccions d'amplificació per a cada mostra es van realitzar per triplicat, de tal manera que es van descartar tots aquells valors de desviació superiors a 0.380. Per altra banda a l'hora de realitzar la corba estàndard es va aplicar el software específic per poder determinar el pendent de cadascun dels experiments de PCR. El valor del pendent permet determinar l'eficiència d'amplificació de la PCR. Un valor de 3,32 significa una eficiència del 100% per tant es van descartar tots aquelles PCR amb valors de pendent no ajustats a 3.32 (± 0.1). Aquestes dues anàlisis van permetre obtenir unes dades fiables i de qualitat a les quals es va aplicar el mètode comparatiu de la corba estàndard, tant pels gens problemes com pels controls, amb la qual cosa es va obtenir el factor d'amplificació.

10.6. Anàlisi de les dades

Tot el conjunt de dades obtingudes de l'anàlisi amb el software específic d'amplificació es van importar a un full de càlcul *Excel[®]* (Microsoft Corp.) on es va realitzar el segon bloc d'anàlisi, que consistí en el càlcul de les ràtios entre els gens control i els gens problema i la representació gràfica dels resultats. La segona part de l'anàlisi estadística es va dur a terme utilitzant el software estadístic *SPSS 12.0[®]* (Statistical Package for Social Science, Inc., Chicago, IL) amb el qual es van poder analitzar la significació i correlació dels resultats obtinguts aplicant els tests estadístics no paramètrics *U* de Mann–Whitney, *Rho* d'Spearman i Wilcoxon per a dades aparellades. El nivell de significació per a l'anàlisi de comparacions múltiples es va ajustar amb el mètode de Bonferroni per assolir l'error de tipus I ($p \leq 0,05$)

11. Anàlisi de l'expressió diferencial proteica per la tècnica de *western blot*

11.1. Mostres

Per a realitzar l'anàlisi de validació de l'expressió diferencial a nivell proteic es van utilitzar mostres d'endometri no afectades (endometri atrofíic) i les seves respectives parelles tumorals. Aquestes mostres corresponien a mostres també utilitzades per l'assaig de PCR a temps real.

Les mostres havien estat prèviament recollides, diagnosticades i congelades a -80°C . Les mostres tumorals comprenien els estadis IC, l'estadi invasiu de major expressió d'ambdós marcadors, tant de RUNX1/AML1 com d'ETV5/ERM, i el IIB per determinar l'evolució en l'expressió dels marcadors al llarg de la tumorigènesi.

MOSTRES PROCESSADES PER WB				
CODI	MOSTRA	TIPUS HISTOLÒGIC	ESTADI	GRAU
1	Control atrofica	EA	*	*
	Tumoral	EEC	IC	2
2	Control atrofica	EA	*	*
	Tumoral	EEC	IC	2
3	Control atrofica	EA	*	*
	Tumoral	EEC	IC	2
4	Control atrofica	EA	*	*
	Tumoral	EEC	IIB	2

Taula 11. Parelles de mostres processades per a l'assaig de *western blot*.

11.2. Assaig de *western blot*

Les mostres congelades d'endometri van ser triturades en un morter de porcellana sobre neu carbònica i immediatament incubades en un tampó de lisi *Laemml*i (100 mM Tris-HCl pH: 6.8, 4% SDS i 20% glicerol) durant 4 minuts a 90°C . La quantitat de proteïna total es va mesurar usant el sistema de quantificació *Bio-Rad Dc Protein AsssayTM* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Després de l'addició d'un 5% de β -mercaptoetanol de 0.001% de blau de bromofenol i de córrer 5 μg de proteïna per carril en un gel de poliacrilamida al 12% es va resoldre l'electroforesi a 100 V durant unes 2 h. El gel es va transferir a 100 V sobre una membrana de PVDF *Immobilon-P[®]* (Millipore Corp., Bedford, MA) durant 1 h i mitja a 100 V. Es van bloquejar les unions inespecífiques submergint les membranes en PBS (1 \times) + 0,1% Tween-20 amb un 2% de llet descremada en pols durant 30 minuts. Les membranes es van incubar tota la nit a 4°C amb els següents anticossos primaris: anticòs policlonal antiRUNX1/AML1 (ab11903) (Abcam, Ltd.) diluït 1/1000; anticòs policlonal antiETV5/ERM (H-100) (sc-

22807) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) diluït 1/100 i l'anticòs monoclonal anti β -actina (RB-9421) diluït 1/400 (Lab Vision-Neomarkers, Fremont, CA) com a control endogen. Seguidament les proteïnes es van incubar amb els anticossos secundaris conjugats a la peroxidasa de rave (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca) a una dilució 1/2500 durant 1 h a temperatura ambient. Els rentats es van fer amb PBS (1 \times)-0,1% Tween-20 i es van revelar les proteïnes utilitzant el substrat de quimioluminiscència *SuperSignal West Dura*[®] (Pierce Biotechnology Inc.). Finalment es van exposar les membranes sobre un film autoradiogràfic *X-Omat-AR*[™] (Kodak Co., Rochester, NY) uns 5 minuts.

11.3. Anàlisi de les dades

L'anàlisi densitomètrica dels films obtinguts en els *western blots* es va fer utilitzant un escàner *Bio-Rad hardware*[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.) vinculat a un *power PC-MAC*[®] (Apple, Cupertino, CA) amb el software *Molecular Analyst*[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Amb aquesta anàlisi es va obtenir un valor numèric de la intensitat de cada banda que va permetre la comparació entre mostres a nivell estadístic.

12. Anàlisi d'expressió diferencial proteica en *arrays* de teixit

Els grans avenços que s'han produït els darrers anys en el camp de la genòmica han comportat l'aparició de tècniques mitjançant les quals es poden obtenir gran quantitat de dades. Els *arrays* de teixit es poden traduir com a matrius de teixits, en què es realitza el procés invers; s'estudia un gen o proteïna però en un gran nombre de mostres. La tècnica de l'*array* de teixit, doncs, és un mètode de recol·locació de teixit procedent d'un bloc histològic de parafina convencional a un altre bloc blanc. Per tant, hom pot observar teixit de múltiples pacients en una mateixa preparació.

La tècnica dels *arrays* de teixit ha experimentat un gran auge en els darrers anys. Els principals motius que poden explicar aquest augment de la utilització dels *arrays* són:

- 1) aplicació d'un volum mínim de mostra, que comporta una mínima destrucció del bloc original.
- 2) anàlisi simultània d'un gran nombre de mostres, amb la consegüent reducció del temps d'assaig.
- 3) important estalvi de reactius, sobretot dels anticossos, cosa que comporta una àmplia reducció dels costos de l'assaig.
- 4) uniformitat experimental perfecta de l'assaig.

Aquest conjunt de raons juntament amb el fet que una petita proporció de teixit aporta informació molt important sobre la biologia del càncer, a nivell clínic, d'investigació i epidemiològic ens van fer decantar per la utilització d'aquesta tecnologia. Així doncs, l'anàlisi de validació de l'expressió diferencial a nivell proteic es va completar amb l'estudi immunohistoquímic sobre *arrays* de teixit (TMA, de l'anglès *tissue microarray*). L'assaig no només va permetre validar l'expressió diferencial proteica entre mostres controls i mostres tumorals, sinó que també va permetre determinar la intensitat, localització i evolució de l'expressió proteica en un context tumoral postmenopàusic. A banda del teixit control atròfic, propi de la perimenopausa i la postmenopausa, també es va incloure teixit procedent de les lesions preneoplàsiques, com la hiperplàsia simple (lesió inicial) i la hiperplàsia complexa (lesió més avançada) i finalment el teixit tumoral.

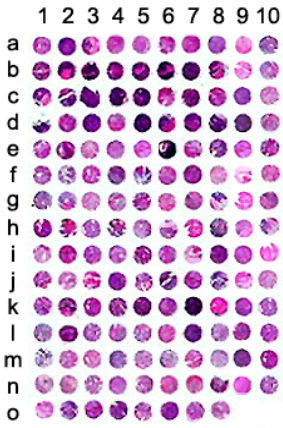
12.1. Disseny dels arrays de teixit

Es van construir tres *arrays* de teixit diferents: un *array* de teixit endometrial atròfic, un *array* de teixit procedent d'hiperplàsies simples i complexes i un darrer *array* amb mostres de carcinoma endometrial de tipus endometriode. Les mostres de teixit parafinades es van obtenir dels departaments de patologia de l'Hospital Vall d'Hebron i de l'Hospital del Mar de Barcelona.

12.2. Selecció de mostres

Per a la construcció de l'*array* de teixit tumoral es van seleccionar 74 àrees representatives per duplicat de carcinoma endometrial endometrioides en les quals es va incloure el rang d'estadis d'IA fins a IIIB, amb 3×2 mostres d'estadi IA, 29×2 d'estadi IB, 20×2 d'estadi IC, 7×2 d'estadi IIA, 6×2 d'estadi IIB, 6×2 d'estadi IIIA i 1×2 d'estadi IIIB. Per a la construcció de l'*array* preneoplàsic es van seleccionar 30 àrees representatives tant d'hiperplàsia simple com de complexa i se'n van fer duplicats. Finalment l'*array* de teixit control es va construir seleccionant 15 mostres d'epiteli normal atròfic també per duplicat. Per dur a terme la selecció de les àrees es van realitzar seccions dels blocs de parafina de cada mostra, les quals es van tenyir amb hematoxilina/eosina i es van marcar en cadascun dels blocs.

MOSTRES PROCESSADES EN ELS TMAS		
TMA	Nº DE MOSTRES	CARACTERÍSTIQUES
EA	15 ×2	Control normal atròfic
HS	30 ×2	Lesió preneoplàsica lleu amb atípia focal
HC	30 ×2	Lesió preneoplàsica greu amb atípia focal
EEC	74 ×2	Carcinoma endometrial endometrioides

COMPOSICIÓ DE L'ARRAY D'EEC	PER ESTADIS	Nº DE MOSTRES
		IA
IB		29 ×2
IC		20 ×2
IIA		7 ×2
IIB		6 ×2
IIIA		6 ×2
IIIB		1 ×2
	PER GRAUS	Nº MOSTRES
	G1	43 ×2
	G2	21 ×2
	G3	10 ×2

Taula 12. Panell de mostres processades per a la construcció dels TMAs. (En la figura insertada s'observa l'hematoxilina/eosina de l'*array* d'EEC així com les coordenades de localització de cadascun dels punts).

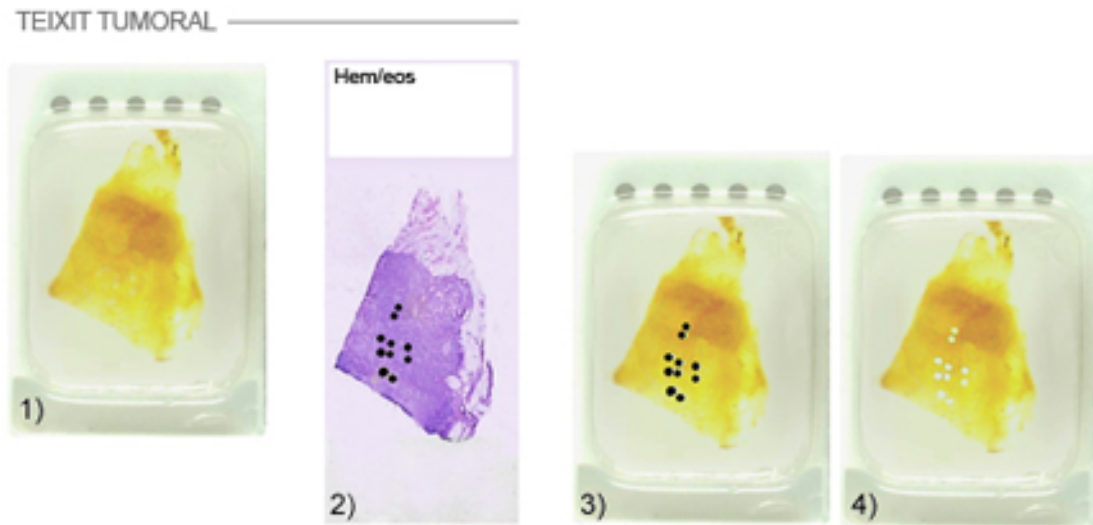


Figura 31, esquema de la selecció dels punts del TMA: 1) bloc de parafina original amb un fragment de teixit tumoral; 2) tall histològic tenyit amb hematoxilina/eosina, en el que s'han seleccionat els punts de la regió tumoral; 3) replicació dels punts del tall histològic en el bloc de parafina; 4) Bloc de parafina punxat amb agulles d'1mm. Notin-se els pocs desperfectes ocasionats al bloc de parafina.

12.3. Disposició de les mostres en matriu

A partir de cadascun dels blocs de parafina marcats es van obtenir 2 cilindres d'1 mm de diàmetre utilitzant les agulles de punció 1 mm *Beecher*[®] (*Beecher Instruments*, Silver Spring, MD) acoblades a l'aparell de construcció de l'*array tissue microarray workstation MTA-1*[®] (*Beecher Instruments*). Les mostres es van anar disposant consecutivament en el bloc de parafina blanc amb una separació d'1 mm entre mostres tot adoptant una disposició matricial.

12.4. Tallat de l'array

El bloc de parafina es va escalfar a 37°C durant 15 minuts per assegurar el soldatge dels diferents cilindres de teixit. Un cop soldat es va tallar el bloc amb el micròtom en seccions de 3 µm de gruix i es van muntar sobre portaobjectes pretractats (*DAKO Cytomation*). A partir dels blocs de parafina originals es van obtenir més de 100 laminetes de 3 µm de cadascun dels *arrays*, que es van desar a 4°C embolicats amb paper de plata fins a la seva utilització.

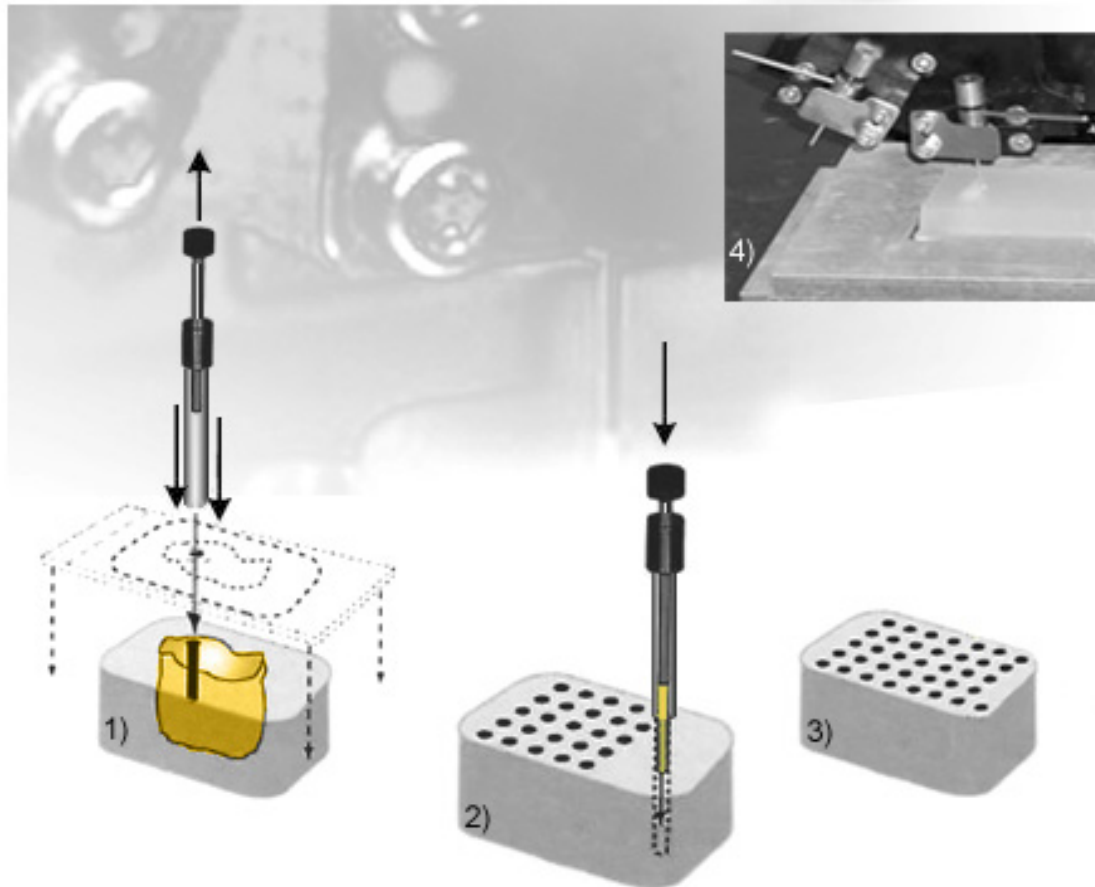


Figura 32, esquema del funcionament de les agulles en la construcció del TMA: 1) imatge de l'agulla perforant el bloc de parafina. En perforar el bloc un cilindre de teixit queda disposat a l'interior de la agulla desplaçant l'èmbol de l'agulla cap amunt; 2) després de perforar el bloc de parafina blanc amb una segona agulla s'introdueix el cilindre de teixit obtingut del bloc original tot desplaçant l'èmbol cap avall; 3) els cilindres de teixit es van disposant a distàncies fixes tot obtenint una matriu de mostres; 4) l'aparell de construcció dels TMAs presenta dues agulles, una per perforar el bloc blanc i una altre per disposar els cilindres de teixit.

12.5. Tinció immunohistoquímica

Les seccions de l'array de teixit de 3 µm de gruix i fixades sobre portes pretractats (DAKO Cytomation) van ser tractades per fer el desemascament antigènic 1 minut a l'autoclau submergides en tampó citrat. Seguidament es va bloquejar l'activitat peroxidasa endògena amb H₂O₂ i es van incubar les seccions durant 1 h amb els següents anticossos primaris: anticòs policlonal antiRUNX1/AML1 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) contra l'extrem N terminal de la proteïna, i l'anticòs policlonal antiETV5/ERM (C-20) (sc-1955) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) contra l'extrem N terminal de la proteïna, ambdós anticossos portats a

una dilució 1/50. Posteriorment, es va incubar l'anticòs secundari amb immunoreacció per l'anticòs primari i conjugat amb peroxidasa *EnVisionTM* (DAKO Cytomation). El sistema està basat en l'activitat peroxidasa sobre el seu substrat (peròxid d'hidrogen, H₂O₂), i amb una reacció acoblada que a partir de la diaminobenzidina (DAB) dóna lloc un precipitat de color marró sobre les parts immunoreactives del teixit. Finalment les seccions es van contratenyir utilitzant el sistema de tinció d'hematoxilina/ eosina.

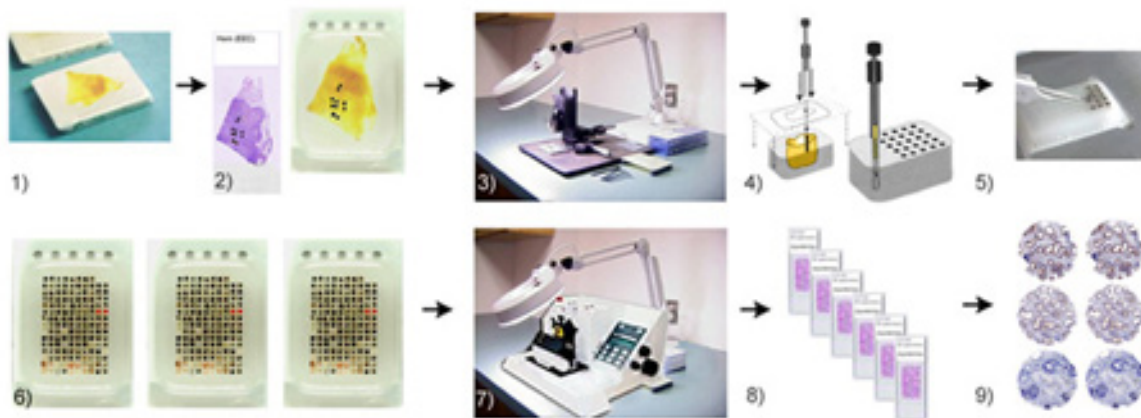


Figura 33, esquema global de construcció del TMA: l'esquema mostra el procés de construcció de l'array de teixit des dels blocs de mostres originals fins a l'obtenció de les laminetes i posterior tinció. 1) mostres en blocs de parafina; 2) selecció de les àrees d'interès; 3) selecció de les agulles, posta a punt de l'arrayer i construcció del bloc blanc; 4) punxat i disposició de les mostres en matriu; 5) correcció dels cilindres de teixit disposats; 6) obtenció dels TMAs; 7) tallat de l'array; 8) muntatge de les laminetes; 9) tinció IHQ.

12.6. Valoració

El marcatge positiu tant per RUNX1/AML1 com per ETV5/ERM va ser avaluat per tres investigadors independents mitjançant el comptatge del nombre de cèl·lules positives pel nombre total de cèl·lules a un augment de ($\times 400$). No obstant això, tots aquells punts que diferien entre les tres valoracions van ser revisats conjuntament fins a arribar a un consens. El criteri de quantificació del marcatge positiu va ser el següent: 0 = negatiu, 1 = marcatge baix, 2 = marcatge mig i 3 = marcatge alt.

12.7. Captació de les imatges

De tot el conjunt d'immunotincions dels diferents *arrays* de teixits es van obtenir imatges a diferents augments ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ i $\times 40$) utilitzant un microscopi amb càmera de vídeo *Olympus*[®] (Olympus Inc., Hamburg, Alemanya) vinculat a un ordinador personal PC i utilitzant el software específic *ViewFinder*TM (Better Light, Inc., San Carlos, CA).

12.8. Anàlisi de les dades

Els resultats obtinguts a partir de la quantificació del nivell d'expressió proteic a l'*array* de teixit es van transferir a un full de càlcul *Excel*[®] (Microsoft Corp.) i l'anàlisi estadística es va portar a terme utilitzant el software estadístic *SPSS 12.0*[®] (Statistical Package for Social Science, Inc.) amb el qual es van analitzar la significació i correlació dels resultats mitjançant l'aplicació dels tests estadístics no paramètrics *U* de Mann-Whitney, *Rho* d'Spearman i Wilcoxon per a dades aparellades. El nivell de significació per a l'anàlisi de comparacions múltiples es va ajustar amb el mètode de Bonferroni per assolir l'error de tipus I ($p \leq 0,05$).

13. Construccions, clonatge i transfecció a la línia cel·lular HEC-IA

13.1. Construccions originals

Les construccions originals de *RUNX1/AML1* en el vector pCMV5, modificació del plasmidi pSG5 de 4.1 kb (Stratagene, Inc.), i d'*ETV5/ERM* en el vector pSVh de 7.8 kb (Promega Biosciences, Inc., Madison, WI) van ser cedides pels grups d'Àngel Corbí (CIB, CSIC, Madrid) i d'Anne Chotteau-Lelièvre (Institut Pasteur de Lille, França) respectivament.

Amb la finalitat de crear proteïnes de fusió conjugades amb la proteïna verda fluorescent (GFP) per tal de poder marcar les proteïnes transfectades es va fer una digestió d'ambdós vectors amb l'enzim de restricció *EcoRI* durant 2 h a 37°C en un volum de 4 μ l. El producte de la digestió es va córrer en un gel d'agarosa al 2% i es va retallar la banda obtinguda per acabar-la eluint amb el mètode de *Concert Gel Extraction System*TM (Life Technologies, Inc.).

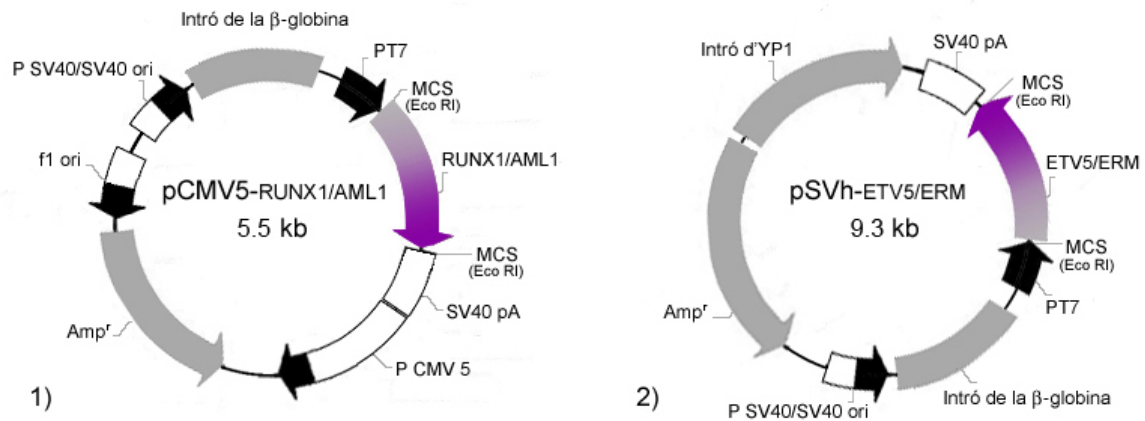


Figura 34, esquema dels plasmidis originals: *pCMV5* i *pSVh* : 1) l'esquema mostra el mapa del plasmidi *pCMV5-RUNX1/AML1*. Cal destacar, en el MCS, les dianes d'inserció de *RUNX1/AML1* (*EcoRI*). 2) l'esquema mostra el mapa del plasmidi *pSVh-ETV5/ERM*. Les dianes d'inserció d'*ETV5/ERM* en el MCS també són (*EcoRI*).

13.2. Clonatge de *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*

Les bandes de *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* van ser clonades en el vector *pCR 2.1*.TM (Invitrogen, Carlsbad, CA). El vector *pCR 2.1*.TM és un plasmidi de 3.9 kb que confereix resistència a kanamicina i a ampicil·lina. La relació entre vector i insert utilitzada va ser en ambdós casos d'1 a 3. En la reacció es va utilitzar 50 ng de vector i 4 U de DNA lligasa T4 (Invitrogen) en un volum final de 10 µl de tampó (1×) (Invitrogen) durant tota la nit a 14°C, les construccions es van desar a -20°C fins a la seva utilització. La transformació bacteriana a *E. Coli* es va portar a terme amb el sistema de *Topo TA Cloning*[®] (Invitrogen). La transformació es va realitzar per xoc tèrmic amb una incubació de les cèl·lules competents en gel durant 30 minuts amb 2 µl de β-mercaptoetanol 5 M i 6 µl del producte final de lligació, seguida d'una incubació a 42°C durant 30 segons. Posteriorment es van dipositar els bacteris en gel durant 2 minuts, moment en el qual es va afegir medi de cultiu LB incubant les cèl·lules a 37°C durant 1 h i a 225 rpm. El volum final es va repartir en plaques amb LB agar + ampicil·lina (50 µg/ml) en què s'havien estès 40 µl d'X-Gal (40 mg/ml) (Bioline, Londres, Regne Unit) i es van incubar 17 h a 37°C. A partir de les colònies obtingudes es va purificar el DNA plasmídic

mitjançant *mini-preps*, amb el mètode de *Wizard Plus SV[®]* (Promega Biosciences, Inc.). Per comprovar la incorporació dels inserts, es van seqüenciar els vectors procedents de 5 colònies diferents de cada una de les bandes amb l'oligonucleòtid *T7 Forward* (Invitrogen) inclòs en el vector, en un seqüenciador *ABI PRISM 310 Genetic AnalyzerTM* (Applied Biosystems). La seqüenciació es va realitzar pel procediment de Sanger, utilitzant dideoxinucleòtids marcats amb el fluorocrom *BigDyeTM* (Applied Biosystems).

13.3. Disseny de la construcció de RUNX1/AML1

Per portar a terme les construccions amb la proteïna de fusió GFP es va decidir incorporar una diana de restricció diferent d'*EcoRI* a l'extrem 5' de *RUNX1/AML1* per tal de controlar l'orientació de l'insert i establir la pauta de lectura. Utilitzant la tècnica de la PCR amb el programa: 94°C 1 minut, (94°C 15 segons, 60°C 10 segons i 72°C 15 segons) durant 30 cicles finalment arribant a 4°C i utilitzant el plasmidi pCR 2.1.-*RUNX1/AML1* com a motlle es va substituir *EcoRI* per *XhoI*. El canvi es va fer dissenyant dos encebadors específics amb el software *Oligo calculationTM* (MCLAB, San Francisco, CA) on en el *Forward* es va incorporar la diana *XhoI*.

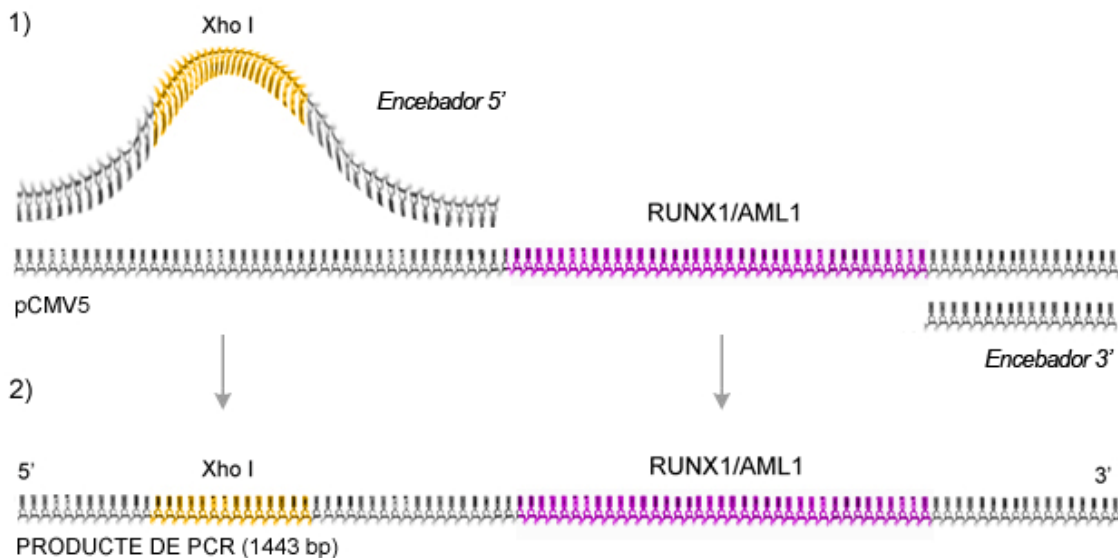


Figura 35, esquema d'inscripció de la diana *XhoI*: 1) l'esquema mostra el disseny de l'encebador 5' en el que s'hi ha afegit la diana de restricció *XhoI* (fragment groc). L'encebador es va dissenyar per reconèixer la part 5' del MCS del plasmidi *pCMV5*. La diana de restricció com que no presenta homologia amb la seqüència del DNA provoca un bucle en l'encebador; 2) el producte de PCR incorpora la diana *XhoI* en la seva seqüència.

Els encebadors utilitzats (Invitrogen) van ser (*En negreta es destaca la diana XhoI incorporada en l'oligonucleòtid Forward*):

*Forward: 5' CCCGT**CTCGAG**CGATGGCTTCAGAGAGCATATTTGAGTC 3'*

Reverse: 3' CCGTGTGGAGGCCCTACTGAGAATTCGGG 5'

El producte de la PCR es va córrer en un gel d'agarosa al 2% i es va purificar amb el sistema *Concert Gel Extraction SystemTM* (Life Technologies, Inc.).

13.4. Construccions amb la proteïna verda fluorescent (GFP)

Tant l'insert purificat de *RUNX1/AML1* de 1443 pb amb les noves dianes com l'insert purificat d'*ETV5/ERM* de 1500 pb, obtingut de la digestió del vector pSVh-*ETV5/ERM*, es van utilitzar per construir les proteïnes de fusió amb el vector pEGFP-C1 i pEGFP-C2 de 4.7 kb (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA) respectivament.

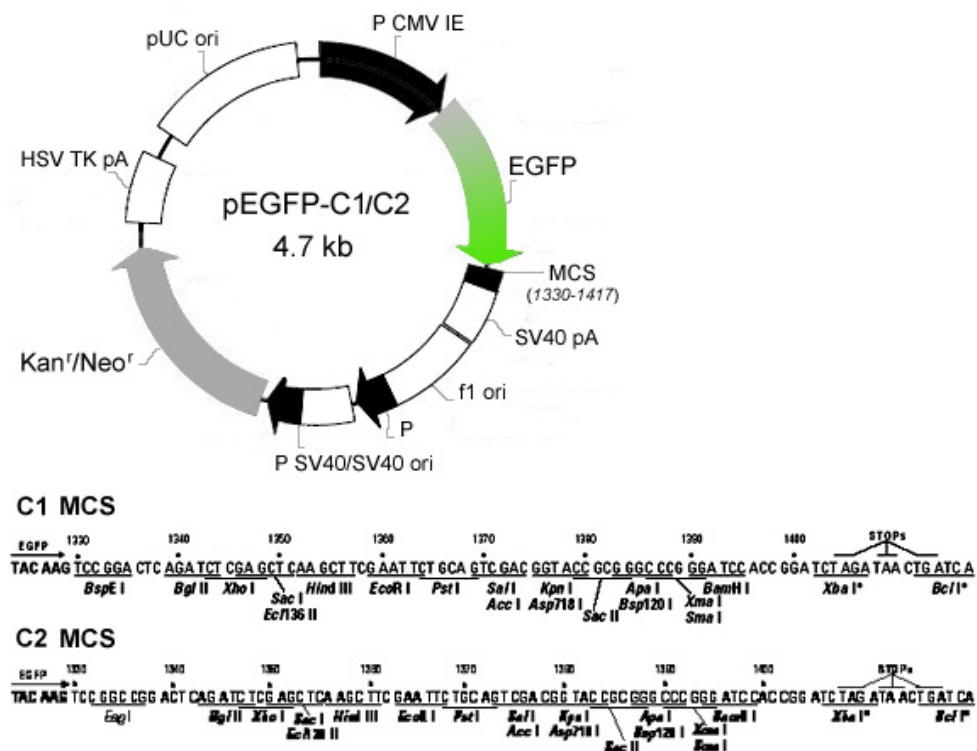


Figura 36, esquema dels plasmidis pEGFP-C1 i C2: l'esquema mostra el mapa dels plasmidis pEGFP-C1 i C2 que porten integrada la proteïna verda fluorescent. La part inferior de la fig. mostra el MCS de pEGFP-C1 i C2, amb dues pautes de lectura oberta diferents que és el que diferencia els dos plasmidis.

El vector es va digerir amb els enzims *XhoI* i *EcoRI* per la construcció amb *RUNX1/AML1* i *EcoRI* per la construcció amb *ETV5/ERM*, seguidament es van defosforilar 10 µl del vector amb 1 U de fosfatasa alcalina CIP (Roche Molecular Biochemicals, Inc.) en 1 µl de tampó (1×) (Roche Molecular Biochemicals, Inc.) 1 h a 37°C i 15 minuts a 65°C afegint 2 ml d'EDTA 0,1 M. Finalment es va portar a terme la lligació amb 4 U de DNA lligasa T4 (Invitrogen) en un volum final de 10 µl de tampó (1×) (Invitrogen) durant tota la nit a 14°C. Per comprovar la incorporació dels inserts es van seqüenciar els vectors amb l'oligonucleòtid *GFP Forward* (Invitrogen) inclòs en el vector, en un seqüenciador *ABI PRISM 310 Genetic AnalyzerTM* (Applied Biosystems).

13.5. Transfecció transitòria en la línia HEC-IA

Per realitzar el procés de transfecció es va utilitzar el mètode de FuGENE 6[®] (Roche Molecular Biochemicals, Inc.). El FuGENE 6[®] és un reactiu que forma complexos amb el DNA i permet que aquest entri a l'interior de la cèl·lula. Es va utilitzar la línia cel·lular HEC-IA (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA), una línia cel·lular establerta a partir d'explants d'una pacient amb carcinoma endometrial del tipus histològic endometrioides, d'estadiatge F.I.G.O. IA i amb un grau de diferenciació de 2. La línia HEC-IA a més presenta receptors de progesterona i d'estrògens α positius. El procés de transfecció va ser el següent: el dia previ a la transfecció es van sembrar les cèl·lules i es van deixar créixer en medi McCoys amb 10% FBS (Invitrogen/Gibco, Carlsbad, CA) però sense antibiòtic. En arribar a un 50-80 % de confluència, es va substituir el medi de cultiu per un medi sense FBS ni antibiòtic. Es va diluir 2 µl de DNA en una proporció 1 a 3 amb el reactiu FuGENE[®] (Roche Molecular Biochemicals, Inc.) 6 µl en 200 µl de medi de cultiu McCoys (Invitrogen/Gibco) sense FBS ni antibiòtic deixant-ho incubat 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps es van afegir 1,8 ml més de medi de cultiu McCoys (Invitrogen/Gibco) sense FBS ni antibiòtic. Es va deixar caure la solució gota a gota sobre les cèl·lules en cultiu i passades 5 h es va canviar el medi de cultiu per un medi amb 10% FBS. Al cap de 48 h les cèl·lules estaven llestes per a ser processades.

13.6. Visualització de la transfecció en la línia HEC-IA

Les cèl·lules es van sembrar sobre cobreobjectes circulars que alhora estaven dipositats sobre plaques de 10 cm. Els cobreobjectes es van muntar sobre portaobjectes amb medi de muntatge *Immuno Floure Mounting MediumTM* (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) per poder visualitzar la transfecció al microscopi de fluorescència confocal *Leica TCS SP2[®]* (Leica, Wetzlar, Alemanya).

13.7. Assajos sobre la línia transfectada HEC-IA

Per validar l'especificitat dels anticossos utilitzats en les immunohistoquímiques sobre els *arrays* de teixit es van realitzar immunocitoquímiques fluorescents fent servir els mateixos anticossos utilitzats en els TMAs. Per dur a terme les immunofluorescències es varen rentar les cèl·lules sembrades en els cobreobjectes amb PBS (1×) i es van fixar 10 minuts amb paraformaldehid al 4% en PBS (1×) (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ), seguidament es varen incubar les cèl·lules amb NH₄Cl 50 mM (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ) i permeabilitzar amb una solució de saponina al 0,1% i BSA al 1% en PBS (1×) (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ). Després d'un rentat amb PBS (1×) es va utilitzar un anticòs primari policlonal antiRUNX1/AML1 (N-20) (sc-8563) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), i un anticòs policlonal antiETV5/ERM (C-20) (sc-1955) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) respectivament, ambdós diluïts a 1/50. El revelat es va realitzar amb l'anticòs secundari, una immunoglobulina acoblada al fluorocrom TRITC (ab-6738) (Abcam, Ltd.), a una dilució 1/250. La visualització es va dur a terme utilitzant un microscopi de fluorescència confocal *Leica TCS SP2[®]* (Leica).

14. Estudi de possibles mecanismes d'acció de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en el carcinoma endometrial

14.1. Estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica i proteica de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM

A partir de les anàlisis d'expressió gènica i proteica realitzades tant per a RUNX1/AML1 com per ETV5/ERM, es va portar a terme un estudi de correlació estadística entre els perfils d'expressió gènica i proteica d'ambdós gens. L'anàlisi estadística es va dur a terme utilitzant el

software estadístic *SPSS 12.0*[®] (Statistical Package for Social Science, Inc.) amb el qual es van aplicar els estadístics de correlació *Rho* d'Spearman, test de Friedman o test de Wilcoxon per a dades aparellades, segons la conveniència de l'anàlisi. El nivell de significació per a l'anàlisi de comparacions múltiples es va ajustar amb el mètode de Bonferroni per assolir l'error de tipus I ($p \leq 0,05$).

14.2. Estudi de dianes de regulació de RUNX1/AML1

A partir d'una rigorosa anàlisi bibliogràfica es va escollir $p21^{WAF1/CIP1}$ com a una de les dianes regulades per RUNX1/AML1 més prometedores per iniciar l'estudi dels mecanismes de regulació de la sobreexpressió i la seva relació amb la carcinogènesi endometrial.

14.2.1. $p21^{WAF1/CIP1}$ diana de regulació de RUNX1/AML1

Partint de $p21^{WAF1/CIP1}$ com a diana regulada per RUNX1/AML1 es van portar a terme els experiments d'anàlisi de l'expressió tant gènica com proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ així com les anàlisis estadístiques de correlació de l'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ amb l'expressió de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM.

14.2.2. Anàlisi del perfil d'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC

L'anàlisi dels nivells d'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ es va realitzar per PCR a temps real amb el mateix grup de mostres de cDNA utilitzades per a determinar l'expressió tant de RUNX1/AML1 com d'ETV5/ERM (Taula 10). Així s'ha obtingut una correlació directa, mostra a mostra, dels resultats. La PCR a temps real es va portar a terme amb les mateixes condicions anteriorment descrites per a l'amplificació de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM utilitzant la sonda de $p21^{WAF1/CIP1}$ ref. Hs00355782_m1 (Applied Biosystems). Així mateix, els resultats d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ es van normalitzar en funció de l'expressió del gen endogen *18S* i es van determinar els nivells d'expressió relativa entre les mostres control i les mostres tumorals pel mètode de la corba estàndard. Els resultats es van exportar a un full de càlcul *Excel*[®] (Microsoft Corp.) on es va realitzar l'anàlisi de les dades.

14.2.3. Anàlisi del perfil d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC

L'estudi del perfil d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ es va analitzar tant amb la tècnica del *western blot* com amb la tècnica d'immunohistoquímica sobre *arrays* de teixit endometrial.

14.2.3.1. Assaig de western blot per a p21^{WAF1/CIP1}

L'experiment de *western blot* es va portar a terme utilitzant 4 parelles de mostres: les mostres 13, 14 i 19 utilitzades en el cas de l'assaig de *western blot* per RUNX1/AML1 i per ETV5/ERM (Taula 11) i la mostra 20 corresponent a la parella d'EEC d'estadiatge IIB i EA.

Les condicions d'extracció proteica, quantificació i resolució del gel van ser idèntiques a les que es van realitzar tant per a RUNX1/AML1 com per a ETV5/ERM. La hibridació dels filtres de PVDF *Inmobilon-P*[®] (Millipore Corp.) es va dur a terme amb l'anticòs monoclonal anti-p21^{WAF1/CIP1} (sc-6246) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a la dilució 1/250 i l'anticòs monoclonal anti β -actina (RB-9421) diluït 1/400 (Lab Vision-Neomarkers). Finalment el revelat i l'exposició dels filtres al film autoradiogràfic ens va permetre obtenir el marcatge de *western blot* per a p21^{WAF1/CIP1}. El marcatge autoradiogràfic es va analitzar amb el software de densitometria *Molecular Analyst*[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

14.2.3.2. Assaig immunohistoquímic de p21^{WAF1/CIP1} en arrays de teixit

L'estudi de l'expressió proteica de p21^{WAF1/CIP1} es va completar amb l'assaig immunohistoquímic sobre l'*array* de teixit tumoral construït, per valorar l'expressió de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM. La immunohistoquímica de p21^{WAF1/CIP1} es va realitzar sobre les laminetes de 5 μ m, procedents de l'*array* de teixit tumoral, amb l'anticòs monoclonal anti-p21^{WAF1/CIP1} (sc-6246) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilució 1/50. La valoració del marcatge positiu i l'obtenció de les imatges es van realitzar seguint el protocol anteriorment descrit. Finalment, es van recollir els resultats en el full de càlcul *Excel*[®] (Microsoft Corp.) on es va portar a terme l'anàlisi de les dades obtingudes.

14.2.4. Anàlisi estadística de correlació de p21^{WAF1/CIP1}, RUNX1/AML1 i ETV5/ERM

L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar amb el software estadístic *SPSS 12.0*[®] (Statistical Package for Social Science, Inc.) amb el qual es van aplicar els tests estadístics de correlació d'Spearman, de Friedman o de Wilcoxon per a dades aparellades, segons la conveniència de l'anàlisi. El nivell de significació per a l'anàlisi de comparacions múltiples es va ajustar amb el mètode de Bonferroni per assolir l'error de tipus I ($p \leq 0,05$).