

## Resum

El carcinoma endometrial és el tumor maligne del tracte genital femení més freqüent en els països industrialitzats. Aproximadament el 80% dels casos corresponen a adenocarcinomes endometrioides, de moderats a ben diferenciats, confinats al còs uterí en el moment de la diagnosi, i normalment amb un pronòstic favorable acompanyat d'una teràpia adient. Els tumors es classifiquen com a tipus I carcinoma endometrial endometrioide (EECs) i representen la branca majoritària en el model dualístic de tumorigènesi endometrial amplament acceptat. Els tumors EEC són de baix grau i estrogen dependents, normalment es desenvolupen en dones perimenopàusiques i postmenopàusiques recents, i coexisteixen o venen precedits per hiperplàsia endometrial complexa i atípica. En contrast amb els EECs hi ha els carcinomes de tipus II carcinomes endometrials no endometrioides (NEECs), els quals representen del 10-20% dels carcinomes endometrials, són carcinomes d'alt grau que normalment es desenvolupen en dones postmenopàusiques, seguint una via estrogen independent i originant-se a partir de l'endometri atrofíic. Els estudis moleculars han proporcionat proves a favor d'aquest esquema de classificació mostrant els processos genètics que podrien estar involucrats en el desenvolupament i progressió d'ambdós tipus de carcinomes. La inestabilitat de microsatèl·lits i les mutacions de PTEN, K-ras,  $\beta$ -catenina i dels gens de reparació dels aparellaments erronis del DNA s'ha associat amb l'EEC, mentre que l'aneuploidia, les mutacions de p53 i l'amplificació de her2/neu s'ha identificat en el NEEC. No obstant els esdeveniments moleculars precisos que succeeixen durant el desenvolupament del carcinoma endometrial romanen sense caracteritzar i se'n té un escàs coneixement. En el present treball, s'ha intentat identificar nous gens, els quals podrien provocar la transformació cel·lular en l'EEC. Es van analitzar els perfils d'expressió diferencial entre endometris de tipus tumoral i no tumoral emprant la hibridació d'*arrays* de cDNA. Del conjunt dels 53 gens, amb expressió alterada en l'EEC, el protooncogen *acute myeloid leukemia 1*, *RUNX1/AML1* i el factor de transcripció *ets variant gene 5*, *ETV5/ERM*, van ser els gens més altament sobreexpressats. Els nivells d'expressió gènica de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM*, es van quantificar per PCR quantitativa a temps real (RT-Q-PCR), i el nivell d'expressió proteica es van caracteritzar per immunohistoquímica sobre *arrays* de teixit (TMA). La RT-Q-PCR va validar la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* en l'EEC i va mostrar una forta sobreexpressió específica i significativa en aquells estadis tumorals associats amb la invasió miometrial. A més, el TMA va mostrar que la sobreexpressió de

RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM correlacionava amb el procés de tumorigènesi, des del teixit normal atròfic, passant per la hiperplàsia simple i complexa fins arribar al carcinoma. Aquests resultats demostren per primera vegada la sobreexpressió de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* en l'EEC en correlació amb el procés inicial d'infiltració miometrial. Així mateix, la sobrepressió de RUNX1/AML1 correlaciona amb la sobrepressió d'ETV5/ERM. Aquest conjunt de resultats permeten proposar un rol cooperatiu entre RUNX1/AML1 i ETV5/ERM durant els primers esdeveniments de tumorigènesi endometrial, els quals es poden associar al procés inicial de infiltració miometrial. Finalment s'han començat a analitzar gens dianes de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM per tal d'explicar la possible via de regulació de la sobreexpressió de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en l'EEC. S'ha analitzat l'expressió de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a partir de RT-Q-PCR i TMA, en un ampli panell de mostres d'EEC i avaluat el grau en el qual RUNX1/AML1 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup> cooperen en el càncer endometrial. La estreta correlació trobada entre RUNX1/AML1 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup> suggereix un rol cooperatiu durant el procés inicial de disseminació tumoral de l'EEC, possiblement mitjançant la infiltració miometrial i/o la promoció dels fenotips invasius.

## Abstract

Endometrial carcinoma is the most common malignant tumor of the female genital tract in the industrialized countries. Approximately 80% of the cases are well to moderately differentiated endometrioid adenocarcinomas, confined to the uterine corpus at diagnosis, and they usually have a favorable prognosis with appropriate therapy. They are classified as type I endometrioid endometrial carcinomas (EECs) and represent the major branch in the widely accepted dualistic model of endometrial tumorigenesis. EEC tumors are low-grade and oestrogen-related, usually developing in peri- and early post-menopausal women, and they coexist with or are preceded by complex and atypical endometrial hyperplasia. In contrast to EECs are type II non-endometrioid endometrial carcinomas (NEECs), which represent about 10-20% of endometrial carcinomas, and are high-grade tumors that usually develop in older post-menopausal women, following an oestrogen unrelated pathway and arising from a background of atrophic endometrium. Molecular studies have provided further insights into this classification scheme by elucidating the genetic events that could be involved in the development and progression of both types of endometrial carcinomas. Microsatellite instability and mutations in PTEN, K-Ras,  $\beta$ -catenin and DNA-mismatch repair genes have been associated with EEC, while aneuploidy, p53 mutations and her2/neu amplification have been identified in the NEEC. Nevertheless, the precise molecular events that occur during the development of endometrial carcinoma are largely uncharacterized and are still relatively poorly understood. In the present work, has been attempted to identify new genes, which could trigger cell transformation in EEC. It has been analyzed the differential gene expression profile between tumoral and non-tumoral endometrial specimens using cDNA array hybridization. Among the 53 genes, where expression was found to be altered in EEC, the *acute myeloid leukemia 1* proto-oncogene, RUNX1/AML1 and the *ets variant gene 5* transcription factor, ETV5, were the most highly up-regulated genes. The gene expression levels of RUNX1/AML1 and ETV5/ERM were quantified by real time quantitative PCR (RT-Q-PCR), and protein levels were characterized by tissue array immunohistochemistry (TMA). RT-Q-PCR validated RUNX1/AML1 and ETV5/ERM up-regulation in EEC and demonstrated a specific and significantly stronger up-regulation in those tumor stages associated with myometrial invasion. Furthermore, TMA showed that RUNX1/AML1 and ETV5/ERM up-regulation correlates to the process of tumorigenesis, from normal atrophic endometrium to simple and complex hyperplasia and then, on to carcinoma. These

results demonstrate for the first time the up-regulation of RUNX1/AML1 and ETV5/ERM in EEC correlating with the initial steps of myometrial infiltration. Moreover, RUNX1/AML1 up-regulation correlated to that of ERM/ETV5. All these results lead to propose a cooperative role between RUNX1/AML1 and ERM/ETV5 during the early events of endometrial tumorigenesis, which may be associated with an initial switch to myometrial infiltration. Finally, has been begun to analyze targets genes of RUNX1/AML1 and ERM/ETV5 to elucidate the possible regulation pathways of RUNX1/AML1 and ERM/ETV5 overexpression in EEC. Has been analyzed p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression using RT-Q-PCR and TMA, in a large panel of EEC samples and evaluated the extent to which RUNX1/AML1 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> cooperate in endometrioid endometrial cancer. The strong correlation found between RUNX1/AML1 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> suggest a cooperatively role during the initial steps of tumor dissemination in EEC, possibly by mediating myometrial infiltration and/or the promotion of invasive phenotypes.