

Marta MONGE I AZEMAR

“Caracterització del factor de transcripció ERM/ETV5 durant la infiltració miometrial i aproximacions proteòmiques al procés d’invasió en càncer d’endometri”

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

CARACTERITZACIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ ETV5 DURANT LA INFILTRACIÓ MIOMETRIAL I APROXIMACIONS PROTEÒMIQUES AL PROCÉS D'INVASIÓ EN CÀNCER D'ENDOMETRI

Memòria presentada per

Marta Monge i Azemar

per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral realitzada a la Unitat de Recerca Biomèdica, de l'Institut de Recerca de l'Hospital
Universitari Vall d'Hebrón, sota la direcció del Dr. Jaume Reventós i Puigjaner i el Dr. Miguel
Abal Posada

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia de la
Universitat de Barcelona, en el programa de doctorat de Biomedicina, Bienni 2003-2005
Tutor: Dr. Antonio Zorzano Olarte

Barcelona, Març 2009

Dr. Jaume Reventós i Puigjaner
(director)

Dr. Miguel Abal Posada
(director)

Dr. Antonio Zorzano Olarte
(tutor)

Marta Monge i Azemar

Aprenent de vosaltres, pares

Amb el vostre suport, germans

Compartint el camí, Albert

LA VIDA ES UNA OPORTUNIDAD, aprovéchala

LA VIDA ES BELLEZA, admírala.

LA VIDA ES BIENAVENRURANZA, saboréala.

LA VIDA ES UN SUEÑO, hazlo realidad.

LA VIDA ES UN DESAFIO, enfréntalo.

LA VIDA ES UN DEBER, cúmplo.

LA VIDA ES UN JUEGO, júgalo.

LA VIDA ES UN TESORO, cuídalo.

LA VIDA ES UNA RIQUEZA, consérvala.

LA VIDA ES AMOR, gózalo.

LA VIDA ES UN MISTERIO, descúbrela.

LA VIDA ES UNA PROMESA, realízala.

LA VIDA ES TRISTEZA, supérala.

LA VIDA ES UN HIMNO, cántalo

LA VIDA ES UNA LUCHA, acéptala.

LA VIDA ES UNA AVENTURA, arriésgate.

LA VIDA ES FELICIDAD, merécela.

LA VIDA ES VIDA, defiéndela.

Madre Teresa de Calcuta

Ha arribat la part que considero més difícil. Si, estrany que fer els agraïments pugui resultar el més complicat, no? No ho haurien de ser la discussió o les conclusions d'uns resultats obtinguts després de 5 anys de feina? Dons no. Al principi creia que els agraïments havien d'introduir-se amb la referència als avenços mèdics que s'estan duent a terme, a com ara es passa del diagnòstic de la malaltia a intentar pronosticar-la abans que aparegui. Però després em vaig adonar que aquesta tesi no només ha estat aprenentatge científic sinó que també m'ha aportat coneixement i creixement personal. I això ha estat possible gràcies a un gran nombre de persones amb les que he compartit el camí aquests cinc anys. És per això que els agraïments em resulten una part tant difícil, perquè és posar-me davant del paper en blanc i expressar els meus sentiments, donar-vos les gràcies a tots vosaltres. Ja per endavant, disculpeu si oblidó algú.

En primer lloc vull tenir present els meus directors de tesi, el Dr. Jaume Reventós i el Dr. Miguel Abal, agrair-vos haver tingut l'oportunitat de treballar amb vosaltres i que hagueu cregut en les meves possibilitats. Gràcies Jaume per fer-me un lloc a la Unitat de Recerca Biomèdica i donar-me les eines i mitjans necessaris per a poder continuar el projecte d'endometri, un projecte apassionant, en contacte directe amb els clínics i pacients, amb tant per fer.... Però especialment agrair-te les converses que hem anat tenint durant aquests anys, en que, tot i viure-ho des de perspectives diferents, hi havia un fons comú. Les he batejat com els "debats de vida", hem compartit la necessitat de ser coherents amb la nostra opció de vida, la importància de no passar per aquest món de puntetes, sinó trepitjant a fons i sense deixar res a mitges i, si és possible, i com diuen els Escoltes, intentant deixar aquest món una mica millor de com l'hem trobat. Y a ti, Miguel, que te voy a decir que no nos hayamos dicho ya? Mil gracias por tu energía, por tus consejos prácticos, por tu paciencia, por tu tranquilidad ("gallega"), por tu cercanía, por tu sencillez, por tus ganas de motivarme, de hacer que aprendiera a espabilarme pero a la vez estando a mi lado, codo con codo, para sacar adelante el trabajo. Pero sobre todo gracias por tu optimismo, por creer y hacerme creer que de un buen resultado sacaremos otro mejor y que un mal resultado conseguiremos sortearlo. También gracias a Sonia, por sus palabras de apoyo y ánimo.

Han estat molts els companys de camí i hem compartit moltes vivències. Em sento afortunada, no només per la feina que he pogut fer, sinó per què he trobat bons companys i fantàstiques amistats. I crec que això és un regal pel que n'haig de donar gràcies. En primer lloc a vosaltres, Floretes, gràcies per la vostra alegria, per les vostres atencions, per haver pogut compartir no només estones de feina, sinó també del que som cada una, per ser com sou. No hi ha un ordre en el meu cor, així que us enumero cronològicament. Gràcies Marta (Tec) per la teva motivació, per l'entusiasme que contagies, per les ganes de saber més, per la teva bogeria, com t'hem trobat a faltar!! Gràcies Núria (Colomé) per la teva paciència, per la teva ajuda sempre a punt, deixant de banda el que estaves fent per donar-me un cop de mà, per tantes converses compartides i les que ens queden per fer!!, pels teus consells professionals i personals, per tenir sempre una estona per escoltar-me. Gràcies Marina per ser com ets, tant dolça i carinyosa, la mimosin del grup, per la teva entrega i responsabilitat. Gracias Eva (corason

colasor!!!) per l'alegria que escampes, per estar sempre amb el somriure als llavis, un somriure que contagies, pel teu optimisme i ganes de superar les adversitats, per la teva força en cercar nous reptes. Gràcies Llauri (Marta) per ser la part reflexiva del grup, per la teva manera de ser, per la teva curiositat en aprendre algo nou, en anar més enllà del que aparentment sembla, per ser tant "payasete", amb no res ja ens tens a tots rient, és un do, no el perdis!!! I és clar, entre tanta noia no puc oblidar al noi. Gràcies Ramon per tantes estones plegats, des de la planta 14 a l'Institut, quantes converses!! Com he enyorat aquelles tardes amb el Miguel, la radio i una bona cançó!! Gràcies per la teva visió pràctica de la vida, per ajudar-me a veure-ho més clar quan no sabia com sortir-me'n, per l'amistat que compartim amb tu i la Gloria.

Gràcies Anna pels teus consells (científics i en aquesta nova etapa, la maternitat). Gràcies Francesc (Blasco) per què, tot i que no he tingut la sort de coincidir amb tu al laboratori, transmetes molta energia i ganes de fer les coses ben fetes. Tampoc he tingut la sort de compartir espai amb tu Sílvia, quina llàstima, amb la Llauri formeu un bon tàndem on la gresca i el riure estan 100% assegurats. Gràcies Hafid pels esmorzars compartits, per tenir sempre una paraula amable.

I també agrair el suport i les converses de passadissos amb els antics, que encara correu per l'Institut o bé ja heu iniciat una nova etapa. En primer lloc al Jesús, el punt de partida del projecte d'endometri, vas trobar ETV5 i aquesta ha estat la teva herència en el meu pas per l'URB. Gràcies també al Tomàs el mestre del cinema i les PCR, l'Albert i el Valentí, la quinta amb qui vaig començar aquesta aventura i l'acabarem plegats, el Jordi, amb qui vaig compartir bons bikinis del general, en Pep l'investigador proper, la Sara, la secretària més esbojarrada que ha tingut la URB, la Tònia l'al·lota que és pur nervi, la Sandra, l'Eli, el Guillermo, la Marta (Puigmolé), el Toni, oblidat algú? I també un record per les incorporacions més recents la Lide i Tais, el nou tàndem inseparable, Ariadna, Neus, Marta (García), Núria (Pedrola), Andreas, Irene, Lorena i les tècnics.

Gràcies Dr. Antonio Gil per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat, per oferir-te en tot el que calgui, per la teva manera de ser, tranquil·la i amable. Agrair també a la resta de l'equip de Ginecologia, en especial la Dra. Berta Díaz, l'ajut per tirar endavant els projectes, no ha estat fàcil coordinar-se, però s'ha demostrat que és possible.

Gràcies a tot l'equip d'Anatomia Patològica, l'Assun, la Sílvia, el Paco,...gràcies per la vostra paciència i ajuda cada vegada que he vingut a portar-vos una mostra i l'havíeu de processar. I en especial vull agrair al Dr. Josep Castellví i al Dr. Àngel García la vostra disposició en ensenyar-me, en respondre a les preguntes curioses amb les que us atabalava. Però sobretot agrair-vos la vostra implicació en els projectes i en l'obtenció de resultats. També agrair al Dr. Francesc Alameda haver participat tant activament en els inicis d'aquesta feina, per haver pogut disposar d'una part del teu temps.

Gràcies als membres del tribunal i al meu tutor, el Dr. Antonio Zorzano, pel temps dedicat en la lectura i seguiment d'aquesta feina.

Gràcies a l'equip de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebrón. Gràcies Núria (Prim) i Anna per la vostra disposició en fer que la nostra feina sigui més fàcil. Gràcies a l'equip de la UCTS, sobretot a tu Àlex, quantes estones i converses davant del citòmetre tot just acabava d'arribar a Vall d'Hebrón..... Gràcies Flor, Loli, Montse i els zeladors per tenir sempre una paraula amable. Gràcies Ramiro pels teus ànims i el somriure sempre a punt.

I novament em sento afortunada. Faltava ben poc per acabar aquesta tesi i em donen una nova oportunitat per donar un pas endavant. Gràcies Dr. Francesc Canals per oferir-me entrar a formar part de la petita família proteòmica, gràcies pel tracte proper que em vas donar mentre venia com a usuària i per haver cregut que puc aprofundir en aquest món proteòmic. I gràcies també Joanjo i Cristina per la vostra ajuda.

En resum, gràcies a tots per aquests cinc anys de tesi, on he pogut aprendre molt científicament i del món laboral. Aquestes línies les he volgut introduir tenint presents unes paraules de la Mare Teresa de Calcuta, que són reflex del que han representat aquests anys de tesi. Han estat anys de vida, de camí, d'alegries i tristors, de nous projectes personals, de canvis molt importants, en resum de camí que m'ha enriquit i m'ha fet créixer. Han estat uns anys regal de Déu. I és per això que vull tenir presents a tots els que, fora del món laboral, família i amics, formeu part del que jo sóc, i per tant, també teniu un lloc en aquesta tesi i, tot i no anomenar-vos a tots, heu format part d'aquest projecte.

Primer de tot vull recordar els que ja no sou en aquest món però us porto ben endins en el meu cor.

Vull tenir també molt present a la Dra. Mercè Durfort, nexa entre el món professional i personal. Gràcies per ser el meu àngel de la guarda, per oferir-te sempre a donar-me un cop de mà per salvar els obstacles burocràtics. Però sobretot, gràcies per transmetre'm aquesta estimació tan apassionada per la ciència, el teu entusiasme per la biologia em va empènyer a endinsar-me en aquest món que tant estimes. És gràcies a tu que vaig entrar en contacte amb el grup del Jaume i he pogut dur a terme aquesta tesi.

Gràcies Moni's (Lladó i Tejada) per ser les millors amigues. Per haver estat en el passat, en el present que compartim i el futur que ens espera. Per que, tot i lo diferents que som, com ens comprenem i gaudim estant juntes. Gràcies per la vostra amistat.

Gracias Nani por estar siempre ahí, por tu escucha y energía contagiosa.

Gràcies Josep Lluís. Mereixes un apartat especial. Quants anys compartint camí, escoltant els teus consells, intentant posar-los en pràctica, discernint la millor opció pels que m'envolten i per mi. Amb tu i el grup CVX he après la necessitat de cercar més endins, d'anar més enllà, d'abandonar la superficialitat per trobar el que és autèntic, de viure els regals que sens donen cada dia.

I no m'oblido de vosaltres, companyes de Bellvitge. És també un regal que, tot i que cada una va emprendre un nou camí, encara és possible tenir estones per trobar-nos i recordar antigues

anècdotes o parlar dels nous projectes. Gràcies Bet, Tiz, Esther, Nussy, Wimar i Ricky pels ànims i empena que m'heu donat durant aquests anys.

Vull acabar aquestes línies d'agraïment pels de casa. Sense vosaltres res tindria sentit, el nucli on tot es fonamenta. En primer lloc gràcies PARE I MARE per ser el pilar on tot s'aguanta, la referència des d'on m'oriento. Aquestes paraules les heu sentit en d'altres ocasions molt importants en la meua vida, però són tant certes..... Gràcies per totes les oportunitats que m'heu donat, arribar fins aquí ha estat possible pel vostre suport incondicional, pel vostre esforç i entrega sense límits, per les vostra renúncia per nosaltres, pels valors que m'heu donat. Gràcies pels germans i la família.

Gràcies germans, Núria, Jordi i Isabel, pel vostre suport, per què junts vam aprendre a compartir, a estimar-nos, a créixer gaudint i animant-nos mútuament en els nostres projectes personals i professionals. Gràcies per la Mireia i l'Anna, la nova vida d'aquesta família. Gràcies també a tu, Rosalia per acollir-me en la meua nova família.

Com deia, durant aquests anys hi ha hagut canvis importants en la meua vida. Segurament, el més important ha estat emprendre la gran aventura del matrimoni. Gràcies ALBERT per donar-me la mà en el camí que compartim, camí per somniar, de compartir projectes i esperances. Gràcies per motivar-me a millorar com a persona i professional, per l'ajuda a superar-me sense oblidar al que tinc al costat. I com diu la cançó,

Dóna'm la mà, dona'm la veu
i proclamem que
tot està per fer, tot és possible avui,
fem sentir arreu
com s'exalta el vell desig d'un món millor

Mai hauria imaginat que el punt i final a aquesta tesi el faria com el faré, amb el repte més gran que podria haver tingut: la maternitat. Laia, encara no estàs aquí però ja has canviat la meua vida. Ets el millor regal per aquest punt i final, i ja t'espero amb totes les ganes i il·lusió, amb moltes pors, perquè negar-ho, però ja ho has vist, hi ha tanta gent al meu costat per recolzar-me.....

Índex

ÍNDEX

Índex de taules i figures	7
Abreviatures	11
Introducció	17
1. L'endometri: anatomia, morfologia i funció	19
1.1 L'úter: òrgan genital femení.....	19
1.1.1. Endometri: morfologia i histologia.....	20
1.2. Regulació hormonal de l'endometri.....	21
1.3. Tipus d'endometris segons l'estat del cicle menstrual.....	21
2. Carcinoma endometrial	24
2.1. Epidemiologia, patogènesi i factors de risc.....	24
2.1.1. Factors de risc.....	25
2.2. Presentació clínica i diagnòstic del carcinoma endometrial.....	28
2.2.1. Tècniques de diagnòstic emprades en la detecció del carcinoma endometrial.....	28
2.3. Lesions precursors del carcinoma endometrial.....	30
2.3.1. Hiperplàsies sense atípia.....	31
2.3.2. Hiperplàsies amb atípia.....	31
2.4. Anatomia patològica del carcinoma endometrial.....	32
2.4.1. Classificació del carcinoma endometrial.....	33
2.4.1.1. Classificació del carcinoma endometrial segons la dependència hormonal.....	33
2.4.1.2. Classificació del carcinoma endometrial segons el tipus histològic.....	34
2.4.2. Carcinoma endometriode.....	36
2.5. Bases moleculars del càncer d'endometri.....	38
2.5.1. Model dualístic del carcinoma endometrial.....	38
2.5.2. Alteracions moleculars del carcinoma endometrial endometriode.....	39
2.5.3. Model de progressió del carcinoma endometrial endometriode.....	46

2.5.4. Alteracions moleculars del carcinoma endometrial no-endometrioide.....	46
2.5.5. Model de progressió del carcinoma endometrial no-endometrioide (el carcinoma serós)	49
2.6. Factors pronòstic del carcinoma endometrial.....	49
2.6.1. Edat.....	50
2.6.2. Tipus histològic.....	50
2.6.3. Grau histològic.....	50
2.6.4. Estadiatge F.I.G.O.	52
2.6.5. Profunditat d'invasió miometrial.....	54
2.6.6. Invasió vascular.....	55
2.6.7. Hiperplàsia endometrial.....	55
2.6.8. Invasió cervical.....	55
2.6.9. Invasió de la serosa, citologia peritoneal i invasió annexial.....	55
2.6.10. Metàstasi a ganglis limfàtics.....	56
2.6.11. Ploïdia del DNA.....	56
2.6.12. Receptors hormonaals d'estrògens i progesterona.....	56
2.6.13. Els protooncogen HER-2/neu, K-ras i Bcl-2 com a factors pronòstic.....	57
2.6.14. Marcadors de proliferació.....	57
2.6.15. Inestabilitat de microsatèl·lits.....	58
2.6.16. Els supressors tumorals PTEN, p53, p21 WAF1/CIP1 i p16INK4a com a factors pronòstic.....	58
2.6.17. β -catenina.....	59
3. Invasió miometrial.....	60
3.1. Bases moleculars de la invasió en el carcinoma endometrial.....	61
3.1.1. Molècules d'adhesió implicades en la invasió en el carcinoma endometrial.....	61
3.1.2. Vies de senyalització alterades durant la invasió en el carcinoma endometrial	63
3.1.3. Factors de transcripció relacionats amb la invasió miometrial.....	64

4. El factor de transcripció ETV5 i la seva implicació en el carcinoma endometrial.....	66
4.1. La família Ets.....	66
4.1.1. Els gens Ets en càncer.....	67
4.2. La subfamília PEA3.....	68
4.3. El gen ETV5.....	69
4.4. ERM/ETV5 en el carcinoma endometrial.....	69
Objectius.....	71
Informe del director del factor d'impacte dels articles publicats.....	75
Resum global.....	81
Conclusions.....	95
Bibliografia.....	99
Publicacions.....	131

Índex de taules i figures

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Comparació de l'evolució de les diferents hiperplàsies endometrials [2]

Taula 2. Tipus càncer endometrial [3]

Taula 3. Classificació histològica del carcinoma en funció del tipus cel·lular [4]

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

Taula 5. Principals alteracions genètiques proposades pel carcinoma endometrial tenint en compte les dues vies de carcinogènesi descrites [5,6,7]

Taula 6. Gradació arquitectural proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8]

Taula 7. Gradació nuclear proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8].

Taula 8. Estadis del carcinoma endometrial establerts per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8]

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. A) Aparell reproductor femení B) Anatomia de l'úter [9]

Figura 2. Imatge de la histologia de l'endometri: tall histològic de teixit endometrial, tenyit amb hematoxilina/eosina

Figura 3. Taxa incidència anual de diferents tipus de carcinomes seleccionats per sexe als Estats Units, període 1975 to 2004 [10].

Figura 4. Model dualístic de la tumorigènesi endometrial [11]

Figura 5. Ruta de PTEN [12]

Figura 6. Ruta de K-ras [12]

Figura 7. Ruta de β -catenina [12]

Figura 8. Apoptosi

Figura 9. Ruta de p53 [12]

Figura 10. Model de progressió del carcinoma serós. Les principals alteracions genètiques són la mutació de p53 i E-cadherina [5]

Figura 11. Classificació per estadis de la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia

Figura 12. Infiltració miometrial en el carcinoma d'endometri

Figura 13. Molècules implicades en la invasió miometrial i metàstasi del carcinoma endometrial [13]

Figura 14. Implicació dels factors de transcripció ETS en càncer [14]

Figura 15. Imatge dels punts dels TMAs amb marcatge d'ETV5/ERM

Figura 16. Anàlisi imatge

Figura 17. Vies de senyalització alterades per ROS en la progressió tumoral

Abreviatures

ABREVIATURES

2D-DIGE: *Two-dimensional – Differential in gel electrophoresis*

AGEs: *advanced glycation endproducts*

ALDH1A1: *Aldehyde dehydrogenase family 1 member A1*

ALDH7A1: *Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1*

ALDOA: *Fructose-bisphosphate aldolase A*

BLVRB: *Biliverdin reductase B*

CD1: *ciclina D1*

CE: *càncer endometri*

CHAPS: *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium*

CHCA: *α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*

ChIP: *immunoprecipitació de cromatina*

DES: *desmin*

DTT: *dithiothreitol*

EBS: *Ets binding site*

EEC: *carcinoma endometrial endometriode*

EGF-R: *receptor del factor de creixement epidèrmic*

EIC: *carcinoma intraepitelial*

EMT: *transició epiteli-mesènquima*

ER: *receptor estrògens*

ERM: *ETS-related molecule o ETS variant gene 5*

ETV5: *ETS translocation variant 5*

FSCN1: *fascin*

FBS: *Fetal bovine serum*

FIGO: *Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia*

GFP: *proteïna verda fluorescent*

GSK-3-β: *glicogen sintasa kinasa 3-β*

H&E: *hematoxylin and eosin stain*

HEP27: *Dehydrogenase/reductase SDR family member 2*

HER-2/neu: *receptor del factor de creixement epidèrmic tipus II*

HNPCC: *hereditary non polyposis colorectal cancer*

HNRNPs: *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

HTA: *Hipertensi3n arterial*

IC: *interval de confiança*

IEF: *iso-electroenfoc (isoelectrofocusing)*

IGF-I : *insulin-like growth factor-I*

IGFIIR: receptor del *insulin-like growth factor II*

IMC: índex de massa corporal

IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*

IPG: *immobilized pH gradient*

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

LCM: *laser capture microdissection*

LOH: *loss of heterozygosity*

mAb: *monoclonal antibody*

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight*

MMP: proteases degradadores de matriu extracel·lular

MMP-2: metal·loproteasa de matriu 2 o gelatinasa A

MMP-3: metal·loproteasa de matriu 3 o stromelysin-1

MMP-7: metal·loproteasa de matriu 7

MMP-9: metal·loproteasa de matriu 9 o gelatinasa B

MMP-13: metal·loproteasa de matriu 13 o collagenase-1

MMR: *mismatch repair genes*

MRDO: *maximum relative distance to origin*

MS: *mass spectrometry*

MSI: inestabilitat de microsatèl·lits

MSN: moesin

NAC: *N-acetyl-L-cystein*

NEEC: carcinoma endometrial no-endometriode

O.M.S: Organització Mundial de la Salut

OR: odds ràtio

PAK: *p-21 kinase*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

PGK1: *Phosphoglycerate kinase 1*

PKM2: *Pyruvate kinase isozymes M1/M2*

PR: receptor de progesterona

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

PTP: *protein tyrosine phosphates*

RNAi: RNA d'interferència

ROS: espècies reactives d'oxigen

RR: risc relatiu

RT-Q-PCR: *real time-quantitative-polimerase chain reaction*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SDR: *short chain dehydrogenase/reductase*

SERPINH1: Serpin H1 o *Collagen-binding protein*

SMAD: *Mothers against DPP homolog*

SOD1: *Superoxide dismutase 1*

TAC: tomografia axial computeritzada

TCF/LEF-1: factor de cèl·lules T/factor d'unió a limfòcits

TGF- β : *Transforming growth factor beta-1*

TGF- β RII: receptor β tipus II del *transforming growth factor β*

THS: tractament hormonal substitutiu

TMA: *tissue microarray*

TNF: *factor de necrosi tumoral*

TNM: *tumor nodule metastasis.*

TPI1: *Triosephosphate isomerase*

TPM4: *Tropomyosin alpha-4 chain*

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. L'ENDOMETRI: ANATOMIA, MORFOLOGIA I FUNCIÓ

1.1. 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.

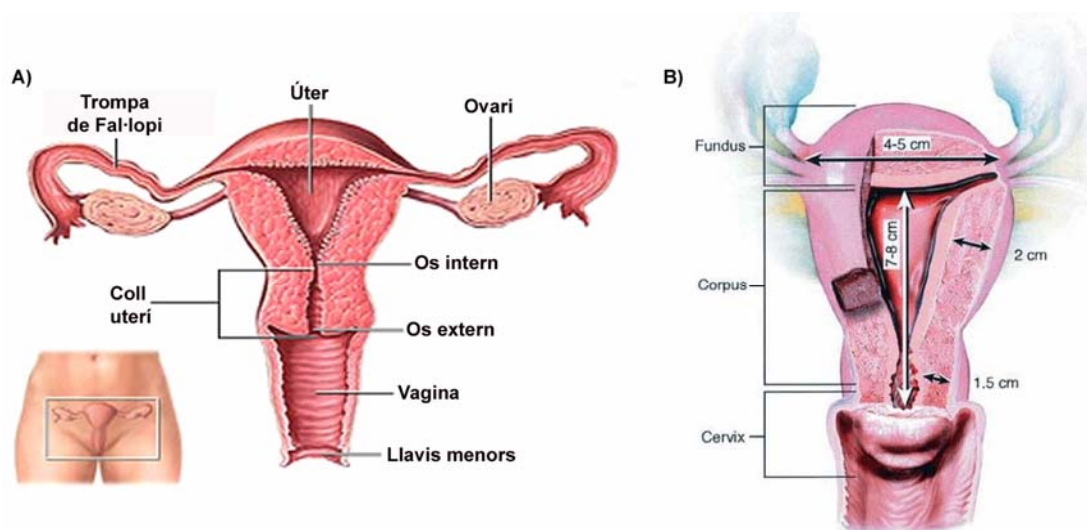


Figura 1. A) Aparell reproductor femení B) Anatomia de l'úter [9]

La matriu està constituïda per quatre porcions anatòmiques: **1)** cos: és la part central de la matriu en la qual es poden 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 (Figura 1).

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 [15].

1.1.1. Endometri: morfologia i histologia

L'endometri és 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 [16].

En l'estructura histològica de l'endometri s'han de considerar tres elements constitutius: **1)** l'epiteli columnar simple amb cilis superficials; **2)** les glàndules tubulars simples; i **3)** el component estromal (Figura 2).

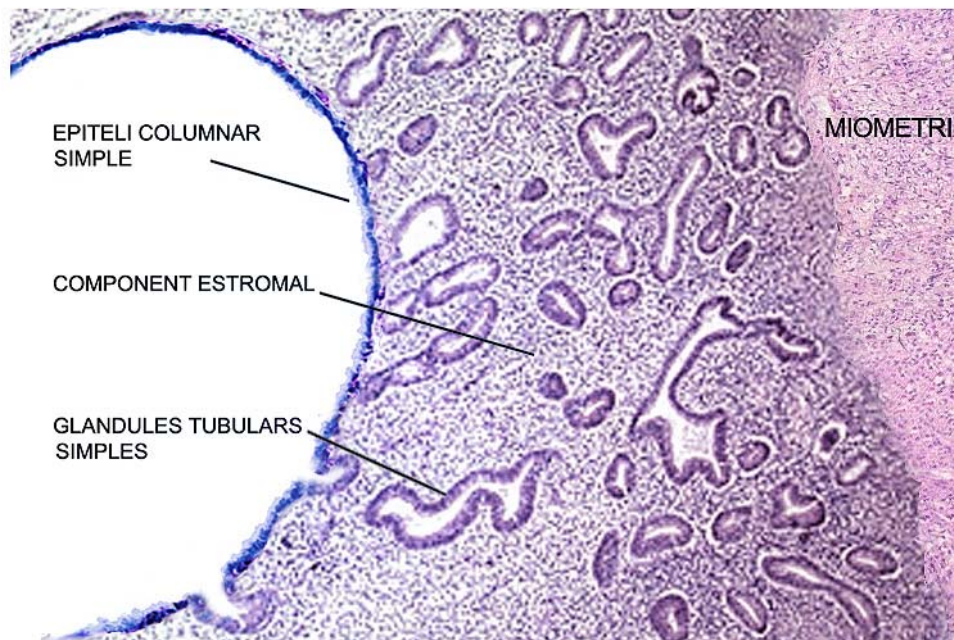


Figura 2. Imatge de la histologia de l'endometri: tall histològic de teixit endometrial, tenyit amb hematoxilina/eosina, en el qual s'observen tres components: l'epiteli columnar simple a la superfície, el component estromal i les glàndules tubulars simples. L'estroma n'és el component majoritari i sustenta 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 (Imatge de Jesús Planagumà, 2005).

El cicle menstrual 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.

1.2. Regulació hormonal de l'endometri

El cicle endometrial 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.

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 nidació 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 i citoquines [17].

1.3. Tipus d'endometris segons l'estat del cicle menstrual

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: endometri proliferatiu, endometri secretor, endometri en la fase descamativa, endometri gestacional i endometri atrofic.

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 [18].

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 [18]. 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 deciduallització.

Endometri en la fase descamativa

Les modificacions endometrials descrites tenen com a objectiu final obtenir un bon substrat per la nidació 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 es troba un tipus d'endometri histològicament diferent però tanmateix important [18].

Endometri gestacional

En el cas que el blastocist s'implanti a l'endometri i proliferi, el quadre hipertròfic i secretor, tant glandular com de l'estroma, es fa més destacat. Les glàndules es troben formades per un epitelí 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 [18].

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'epitelí 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 [18].

2. CARCINOMA ENDOMETRIAL

2.1 Epidemiologia, patogènesi i factors de risc

El càncer d'endometri (EC) és la malaltia ginecològica més comú i representa la quarta neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats després del càncer de mama, colorectal i pulmó [19]. La incidència a nivell mundial és de 23.4 casos per cada 100.000 dones i per any (Figura 3) [20] 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, SEGO) [15]. Malgrat l'elevada incidència, la patologia endometrial presenta una baixa mortalitat (18.62% 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 [10]. L'edat més freqüent d'aparició del carcinoma endometrial és als 61 anys, la majoria de dones són diagnosticades entre els 50-60 anys [21] i només un 20% dels casos es diagnostiquen en la premenopausa, essent excepcionals abans dels 40 anys [22].

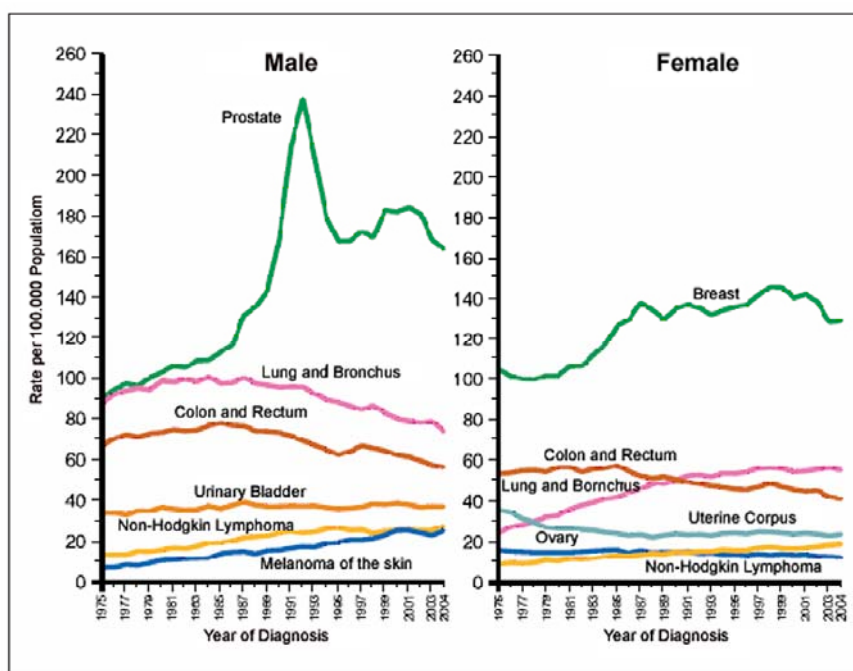


Figura 3. Taxa incidència anual de diferents tipus de carcinomes seleccionats per sexe als Estats Units, període 1975 to 2004 [10].

El 97% de tots els càncers uterins s'originen a partir de les glàndules de l'endometri, raó per la qual s'anomena carcinoma [23].

2.1.1. Factors de risc

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 [23].

S'han identificat múltiples factors de risc de càncer endometrial. MacMahon [24] els divideix en tres categories: a) variants de l'anatomia o fisiologia normals (inclou l'obesitat, la nuliparitat, i la menopausa tardana); b) anormalitat o malaltia franca (inclou diabetis mellitus i hipertensió arterial (HTA)), i c) exposició a carcinògens externs (poden incloure's fàrmacs com el tamoxifè i la teràpia hormonal substitutiva basada en estrògens sense oposició amb progestàgens). Molts d'aquests factors, inclús inclosos en categories diferents, tenen en comú la producció d'un augment d'estimulació hormonal de tipus estrogènic.

A continuació s'enumeren els factors més importants i de major rellevància clínica:

- **Raça:** la incidència del càncer endometrial en dones de raça blanca és dues vegades la incidència en dones afroamericanes [25,26]. Mirant estadi per estadi, les dones afroamericanes tenen pitjor pronòstic. No és clar si aquesta desavantatge en la supervivència de les dones afroamericanes està relacionada amb l'agressivitat del tumor, l'efectivitat del tractament o variacions biològiques pròpies de la raça.
- **Història familiar:** en petits estudis en els quals s'ha avaluat l'associació o agrupació de càncers dintre d'una família s'ha trobat un increment del risc de patir càncer endometrial en aquelles dones amb important història familiar de neoplàsies. Alguns autors han descrit un increment del risc, amb xifres properes al 50%, per a les pacients amb història familiar de càncer endometrial [27]. Particularment, la història familiar sembla estar associada amb un major risc en dones joves, d'edat inferior als 50 anys [28].

Per altra banda, molts dels carcinomes endometrials hereditaris es donen en famílies amb càncer colorectal no poliploide hereditari (HNPCC) o síndrome de Lynch II [29]. 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 [30,31].

- **Factors menstruals:** molts estudis han relacionat una edat precoç de la menarquia (generalment definida com aquella que apareix abans dels 11 anys) amb un increment del risc de càncer endometrial d'entre 1,5 i 4 vegades superior al de la població general [32,33]. Aquest efecte és major en les neoplàsies endometrials que afecten a dones premenopàusiques. També s'ha descrit una associació entre càncer endometrial i menopausa tardana [34,35]. Ambdós factors reproductius, menarquia precoç i menopausa tardana, són factors de risc ja

que comporten una exposició més llarga de l'endometri a l'acció dels estrògens durant l'edat reproductiva de la dona. Altres factors com els trastorns menstruals, menorràgies i síndrome premenstrual s'han relacionat també amb un increment del risc de sofrir càncer endometrial [36].

- **Factors reproductius:** inicialment es va observar a Anglaterra i Gal·les que dones solteres o nul·lípaes tenien una major taxa de mort per càncers de cos uterí que aquelles amb una taxa important de paritat [28,33,35,37]. L'explicació a aquest fet es donava en que la nul·liparitat impedeix la interrupció temporal de la síntesi d'estrògens i augmenta la síntesi de progesterona [38]. Altres estudis publicats que també han relacionat la nul·liparitat amb un increment del risc ho atribueixen a l'anovulació relacionada amb la infertilitat [39]. 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) [33].

- **Factors hormonals:** la majoria de condicions conegudes que tenen influència en el càncer d'endometri estan relacionades directa o indirectament amb les hormones, en particular els estrògens. Estimulen la proliferació endometrial i, sense oposició amb progestàgens, poden generar hiperplàsia endometrial i càncer.

- Estrògens endògens: Una elevada taxa d'estrògens endògens suposa un risc incrementat de càncer endometrial. L'associació del càncer d'endometri amb la síndrome de Stein-Leventhal es deu als alts nivells d'estrògens endògens que existeixen en aquesta condició [40], i és similar al que es dona amb l'associació que existeix amb els tumors ovàrics productors d'estrògens. Aquesta associació sembla observar-se sobretot en els casos d'adenocarcinoma endometrial que esdevenen en dones premenopàusiques.

- Tractament hormonal substitutiu: la important associació entre tractament hormonal substitutiu (THS) basada en estrògens i utilitzat per suplir el decrement hormonal que comporta la menopausa [41,42] i el desenvolupament de càncer endometrial va quedar demostrada a finals dels anys setanta i es va confirmar per la disminució de la incidència de la malaltia en els últims trenta anys [24,43]. S'ha demostrat que les dones que utilitzen estrògens no oposats per un temps superior a dos anys, tenen un increment de dos a dotze vegades del risc de patir càncer endometrial, mentre que aquelles que reben progestàgens en oposició no tenen aquest risc [44]. Brinton i Hoover [45] afegien que els tumors associats al tractament amb estrògens són, generalment, de baix grau i estadi i sorgeixen com a hiperplàsies.

- Contraceptius orals: els factors que disminueixen l'exposició del teixit endometrial als estrògens no balancejats redueixen el risc de càncer, com l'ús d'anticonceptius hormonals [46] o l'hàbit tabàquic. Alguns estudis han mostrat que el consum d'anticonceptius orals combinats (estrogen més progestagen) durant almenys un any redueix el risc de càncer endometrial en un 50%, i que la protecció persisteix almenys 15 anys després de l'abandó dels mateixos [47,48],

[38,49]. La protecció és més accentuada per a dones de baixa paritat, les quals tenen un risc major de patir la malaltia. L'efecte protector sembla no dependre de la dosi de gestagen.

- **Tamoxifè:** és una molècula sintètica no esteroide que competeix amb els estrògens a nivell dels seus receptors i es considera un modulador selectiu dels receptors d'estrògens. Produeix un efecte antiestrogènic estimulant la proliferació endometrial. És la base del tractament adjuvant en el càncer de mama. S'han descrit molts casos de carcinoma endometrial en pacients que rebien aquest fàrmac per un antecedent de neoplàsia mamària [42,50,51,52,53] la majoria en estadi I de la classificació de la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetricia (FIGO). El 30% de les pacients post-menopàusiques en tractament amb tamoxifè tenen símptomes derivats del seu ús i la metrorràgia és el més freqüent [54,55]. El risc incrementat de patir càncer endometrial s'associa a la durada del tractament, a l'antecedent d'haver rebut THS i a l'obesitat. Tot i que la majoria de carcinomes induïts per tamoxifè són de tipus endometriode, de baix grau i estadi [54,55,56,57] també s'ha descrit que existeixen adenocarcinomes endometrioides d'alt grau, carcinomes serosos, sarcomes de l'estroma endometrial i carcinosarcomes que tenien pitjor pronòstic que aquells trobats en pacients no usuàries de tamoxifè [42,58,59].

- **Massa corporal i dieta:** obesitat i sobrepès han estat sempre relacionades amb un augment del risc de desenvolupar carcinoma endometrial [35,60,61,62,63,64]. De fet un estudi prospectiu recent parla que prop del 70% de les dones amb càncer d'endometri inicial són obeses [65].

L'efecte de l'obesitat sobre l'endometri es relaciona amb l'augment de la conversió perifèrica a estrògens que existeix en aquestes pacients. La androstenediona es transforma en estrona en l'adipòcit i, una vegada més, l'efecte subjacent sembla ser l'estimulació estrogènica sense oposició. Altres estudis refereixen que l'associació entre un gran IMC i càncer endometrial és certa en dones post-menopàusiques, però que no ha d'aplicar-se estrictament en dones joves.

Un altre element important a tenir en compte en la etiopatogènia és la dieta rica en grasses animals, freqüent en el món occidental [66]. Encara que existeixen evidències que la ingestió de lípids i proteïnes animals incrementa el risc de càncer endometrial [67,68,69,70], i que les fruites, els vegetals i les fibres disminueixen aquest risc, el paper exacte de la dieta no està clar. Estudis epidemiològics i dades experimentals suggereixen que el consum d'aliments amb contingut de soja poden protegir de malalties cardiovasculars i disminuir el risc de càncer de mama, pròstata i endometri [71]. La soja i derivats alliberen elevades dosis d'isoflavones. Aquestes tenen propietats similars als moduladors dels receptors d'estrògens. En els últims anys se'ls ha donat força atenció com a alternativa a la teràpia hormonal convencional que es dona a les dones post-menopàusiques [72]. Altres factors dietètics que poden disminuir el risc de desenvolupar càncer d'endometri són el consum de fibra crua, polisacàrids (no incloent el midó), vitamina A i possiblement vitamina C.

- **Diabetis i hipertensió arterial (HTA):** la diabetis mellitus és un altre factor molt relacionat amb el càncer endometrial [33,73,74], així com la HTA [75]. Una explicació d'aquesta

associació és que ambdues situacions poden associar-se amb freqüència a obesitat [76]. No queda clar el paper de la diabetis quan es diferencia entre el tipus 1 (insulina dependent) i el tipus 2 (no insulina dependent). No obstant, alguns autors suggereixen que el risc és major per a la diabetis que esdevé en l'edat adulta (generalment la tipus 2) [74]. Les conclusions que es postulen és que l'associació de la diabetis amb la neoplàsia endometrial pot deure's als elevats nivells d'estrògens existents, a la hiperinsulinèmia i als elevats nivells de *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) existents [74].

- **Tabac:** nombrosos estudis han associat el consum de cigarrets amb una disminució del risc de adenocarcinoma endometrial [77,78], si bé aquesta associació sembla més determinant en dones post-menopàusiques. L'efecte protector es deuria a l'acció antiestrogènica del tabac. Un altre factor a tenir en compte és que les pacients fumadores tenen una menopausa més precoç, amb major associació a osteoporosis i fractures, la qual cosa és indicatiu del baix nivell d'estrògens existent en aquestes pacients. [79]
- **Alcohol i exercici:** el consum elevat d'alcohol s'associa a increments dels nivells d'estrògens, però la majoria d'estudis no mostren associació amb el càncer d'endometri, encara que en alguns es comenta un possible efecte protector [35,80]. D'altra banda, la relació tancada existent entre dieta, activitat física i massa corporal dificulta la cerca entre ells de riscos independents per al càncer endometrial. [81]

2.2. Presentació clínica i diagnòstic del carcinoma endometrial

La manifestació clínica més freqüent del càncer d'endometri és la metrorràgia. Aquest símptoma sol ser de presentació inicial i es detecta com una metrorràgia post-menopàusica o bé com una hipermenorrea o pèrdua intercíclica en la pacient premenopàusica. Les dones post-menopàusiques que presentin aquesta simptomatologia han de ser avaluades per a descartar la presència de càncer endometrial, tot i que aproximadament només un 30% dels casos esdevenen neoplàsies genitals malignes [82]. Poden presentar-se altres manifestacions clíniques, però solen tenir relació amb la pèrdua hemàtica. El dolor no és un símptoma constant. En les pacients joves ha de tenir-se un alt grau de sospita per a arribar al diagnòstic i haurà d'efectuar-se una biòpsia per a estudi. Haurien de tenir-se en compte els esmentats factors de risc.

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

- **Citologia cervicovaginal**

Fins al moment no hi ha cap mètode diagnòstic que pugui ser usat com a criatge per a detectar les pacients amb càncer endometrial en estadis més primerencs. Habitualment

s'apliquen els procediments diagnòstics quan apareixen símptomes sospitosos de patologia endometrial o si la pacient presenta factors de risc importants. No obstant això, s'havien buscat mètodes de cribatge que fossin efectius per al diagnòstic precoç del càncer endometrial, com la citologia. La citologia no és una prova específica de diagnòstic, si bé un 50% de les pacients afectes poden tenir frotis alterats amb presència de cèl·lules malignes. Això s'explica perquè la presa no es realitza directament de la lesió. Quan la presa es realitza dintre de la cavitat endometrial es troben cèl·lules malignes amb més freqüència. Encara que sigui d'escassa utilitat com a mètode d'exploració, la citologia cervicovaginal pot donar proves indirectes de la patologia endometrial [83].

- **Biòpsia endometrial**

Existeixen diverses possibilitats a l'hora d'efectuar el diagnòstic histològic: biòpsia dirigida amb control histeroscòpic sobre el teixit patològic (mètode d'elecció) i biòpsia per aspiració (cànula de Cournier) amb una sensibilitat propera al 90%. Normalment, ambdues tècniques poden efectuar-se de forma ambulatoria i sense necessitat d'anestèsia. En cas de dificultats tècniques o quan l'exploració resulta dolorosa es procedeix en quiròfan a practicar una histeroscòpia amb biòpsia i/o raspat.

- **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 [84,85].

- **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 [86]. Com a part de l'estudi ultrasònic, cada vegada s'utilitza més la valoració del flux sanguini endometrial per ecoDoppler. Les artèries radials i espirals internes són poc perceptibles en el miometri de dones postmenopàusiques, però poden esdevenir prominents per ecoDoppler

transvaginal, en pacients portadores de hiperplàsia o carcinoma, per tant els índexs de resistència baixos signifiquen un major gruix arterial i per tant s'associen a un major risc de neoplàsia [87].

- **Ressonància magnètica i tomografia axial computerizada (TAC)**

S'ha observat en l'actualitat una bona correlació entre la invasió miometrial i/o cervical estudiades per ressonància magnètica pèlvica-abdominal i la histologia. Com pauta general pot dir-se que aquelles pacients amb afectació cervical en l'examen clínic o amb resultats positius o no concloents del raspat endocervical han de ser estudiades amb ressonància magnètica i ecografia perquè està demostrat que poden valorar l'extensió de l'afectació cervical. El TAC resulta de major utilitat per a l'estudi de les adenomegalies retroperitoneals, així com per a estudiar vísceres intraabdominals susceptibles de tenir metàstasis o quan existeix ascitis.

- **Marcadors tumorals**

En determinats subtipus histològics, serós-papil·lar i de cèl·lula clara, pot ser útil la determinació de marcadors tumorals sobretot en estadis avançats. El monitoratge del marcador tumoral pot servir com indicador de recurrències. També s'utilitzen altres procediments en el procés diagnòstic de la malaltia, però el seu valor radica més en l'estadificació i planificació del tractament que per a ser usats com a mètodes diagnòstic de neoplàsia.

2.3. Lesions precursors del carcinoma endometrial

El carcinoma endometrial és un tipus de carcinoma amb una tumorigènesi complexa ja que pot originar-se en un endometri normal, en un endometri atròfic 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; en aquestes pacients els tumors comencen com una hiperplàsia endometrial i progressen a carcinoma [5]. En altres dones, el carcinoma apareix espontàniament sobre un endometri atròfic, sense una relació clara amb la transició d'hiperplàsia a carcinoma. 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.

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.

2.3.1. Hiperplàsies sense atípia

Les hiperplàsies sense atípia són resultat de la resposta exagerada a l'estímul estrogènic, l'endometri respon de manera difusa amb un augment equilibrat de glàndules i estroma. En la **hiperplàsia simple** 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. En la **hiperplàsia complexa** les glàndules presenten una arquitectura més 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.

2.3.2. Hiperplàsies amb atípia

La principal característica que la diferencia de l'hiperplàsia sense atípia és 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 hiper cromatisme nuclear, tenen un nucli irregular quant a la mida i a la forma, llur membrana nuclear és més gruixuda i presenten acumulacions de cromatina [18]. 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) [88]. 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 [2].

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 [2]

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% [89]. 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. 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.

2.4 Anatomia patològica del carcinoma endometrial

El càncer d'endometri pot presentar-se com lesió focal de grandària variable i que assenta sobre un pòlip endometrial, o de forma difusa, afectant àrees diferents o la totalitat de la superfície endometrial. Pot originar-se arreu de l'úter, però la majoria (90%) ho fa en el cos i la resta en el segment inferior uterí. Sovint l'úter està augmentat de grandària, però no és excepcional que les dimensions siguin normals per a l'edat. Quan només està afectada una cara, és més freqüent que sigui la posterior. Freqüentment es presenta com una massa disgregable de coloració grisenca i focalment ulcerada en la seva superfície. Quan el tumor arriba a un gran volum i es projecta en l'interior de la cavitat, existeix una major probabilitat d'invasió miometrial.

Localment s'estén cap al miometri, amb invasió en profunditat del mateix i podent arribar fins i tot a la serosa uterina, o cap al cèrvix, amb afectació únicament de la mucosa endocervical o també de l'estroma. En fases avançades pot envair trompes, vagina, ovaris i cavitat peritoneal. La malaltia detectada en les superfícies peritoneals pot ser deguda a extensió directa si el

tumor infiltra la totalitat del miometri o per alliberament i implantació de cèl·lules dintre de la cavitat abdominal. Les cèl·lules procedents de tumors intrauterins poden discórrer per les trompes de Falopi tenint accés directe al peritoneu, si bé es desconeix amb exactitud la seva capacitat d'oncogènesi. El carcinoma d'endometri també presenta capacitat de disseminació limfàtica i vascular. L'embolització tumoral a través dels espais linfovasculars causa disseminació als ganglis limfàtics retroperitoneals o a òrgans distals com pulmó, fetge, os i cervell [90]. Tot això ve recollit en l'estratificació quirúrgica de la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia (F.I.G.O.), que defineix els diferents estadis de la malaltia.

2.4.1. 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 (F.I.G.O., Organització Mundial de la Salut (O.M.S.)).

2.4.1.2. 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 [3,91,16] (Taula 2):

a) **carcinoma endometrial endometriode (EEC) o de tipus I**: és un tipus d'adenocarcinoma endometrial amb una incidència pròxima al 80%. Generalment ben diferenciat, s'origina en dones perimenopàusiques i amb tendència a ser de baix grau. Aquest tipus de carcinoma és hormonodependent i normalment va precedit d'una hiperplàsia simple i complexa, tot fent que els factors relacionats amb la hiperplàsia esdevinguin rellevants per a l'epidemiologia del carcinoma endometrial. Es caracteritzen per un pronòstic favorable. Inclou els subtipus histològic endometriode i mucinós.

b) **carcinoma endometrial no-endometriode o de tipus II**: està pitjor diferenciat, es produeix en dones d'edat avançada, generalment és més agressiu (alt grau), presenta receptors esteroidals negatius i agrupa la resta de tipus histològics (el carcinoma papil·lar serós, el de cèl·lules clares i l'adenoescamós en són els tipus principals) [92]. El carcinoma no-endometriode és menys freqüent, no és hormonodepenent ni està precedit per lesions preneoplàsiques precursors, presenta major propensió a la disseminació primerenca i mal pronòstic [93].

Taula 2: Tipus càncer endometrial [3]

	Tipus I	Tipus II
Edat	Pre- i perimenopàusiques	Postmenopàusiques
Estrògens	Presentes	Absents
Hiperplàsia	Present	Absent
Grau	Baix	Alt
Invasió miometrial	Mínima	Profunda
Tipus histològic	Endometrioide	No-endometrioide
Comportament	Estable	Progressiu

Per això, basant-se en les característiques clínicopatològiques i moleculars es parla d'un model genètic dualístic que explicaria els diferents tipus de carcinomes endometrials [94].

2.4.1.2. 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) [4].

CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Carcinoma endometrioide

Carcinoma serós

Carcinoma de cèl·lules clares

Carcinoma mucinós

Carcinoma escamós

Carcinoma transicional

Carcinoma indiferenciat

Carcinoma de tipus mixt

Taula 3. Classificació histològica del carcinoma en funció del tipus cel·lular [4]

1. Carcinoma endometrioide: És la forma més comú de càncer endometrial, representant prop del 80-85% de tots els casos [92]. Aquest tipus histològic ha estat el punt de partida d'aquesta tesi, és per això que serà explicat amb més detall més endavant.

2. Carcinoma serós: Aquesta neoplàsia mostra una gran diversitat en les seves característiques arquitecturals i citològiques. Encara que típicament predomina un patró papil·lar, també es poden veure patrons glandulars i sòlids. Va ser caracteritzat com a tumor

endometrial als anys 80 [95,96] ja que fins aleshores era reconegut com a tumor ovàric. 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'endometrioides, aquest tipus de carcinoma és responsable d'un 25% de totes les morts per carcinoma endometrial. La lesió que precedeix a aquest tipus histològic és el carcinoma endometrial serós intraepitelial, també anomenat carcinoma endometrial *in situ* o carcinoma serós de superfície [97,98,99,100]. Aquesta lesió es caracteritza per la substitució no invasiva de la superfície endometrial benigna (habitualment atròfica) i de l'epiteli glandular per cèl·lules altament malignes que s'assemblen a les cèl·lules del carcinoma serós invasiu [97,101,98,99,102,100].

Aquest tipus de tumor té tendència a desenvolupar invasió miometrial profunda i estendre's fins a ganglis limfàtics, i habitualment les pacients són diagnosticades quan ja hi ha hagut la disseminació extrauterina. De totes maneres, encara que no hi hagi invasió profunda, el resultat final no és esperançador.

3. Carcinoma de cèl·lules clares: la prevalença del carcinoma de cèl·lula clara varia entre el 1-5% en la majoria de les sèries. Conjuntament amb el carcinoma serós encapçalen el grup de carcinomes independents d'estrògens o de tipus II. Freqüentment envaeix el miometri en profunditat. El carcinoma de cèl·lula clara pot trobar-se amb patrons diferents: sòlid, papil·lar, tubular, quístic o una combinació d'aquests [103]. 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 [6]. De la mateixa manera que el carcinoma serós, les pacients amb adenocarcinoma de cèl·lula clara són diagnosticades en estadis avançats, és per això que el pronòstic és desfavorable [104,105,106,107]. De totes maneres, quan el carcinoma de cèl·lula clara està limitat al cos uterí presenta millor pronòstic que el carcinoma serós en el mateix estadi.

4. Carcinoma mucinós: és un tipus de carcinoma endometrial poc freqüent i amb aparença similar al carcinoma mucinós d'endocèrvix. Encara que està present com component focal fins en un 42% dels carcinomes endometrioides, representa la població cel·lular dominant en només un 1-9% dels casos [108,109]. Es caracteritza per presentar cèl·lules columnars amb un citoplasma ric en mucina d'un to pàl·lid [6]. A igualtat d'estadi, grau de diferenciació i profunditat d'invasió miometrial, els tumors mucinosos i els carcinomes endometrioides es comporten de forma similar. Tendeixen a ésser de baix grau i mínimament invasius, pel que com a grup tenen un excel·lent pronòstic [90].

5. 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 [110]. El tumor macroscòpicament presenta una aparença blanca uniforme, normalment es troba associat amb una abundant producció de queratina [6]. El

pronòstic de la majoria de carcinomes escamosos és bastant pobre, tot i que existeix alguna variant amb millor pronòstic.

6. Carcinoma transicional: és un tipus histològic minoritari, 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 [111]. Aquest tipus de carcinoma presenta focus papil·lars formats per cèl·lules amb morfologia transicional, les quals presenten un destacable nucli longitudinal [6].

7. Carcinoma indiferenciat: són aquells tipus de tumors que els manca diferenciació i no poden incloure's en cap dels tipus anteriors. La proporció d'aquest tipus de carcinoma és de l'1,5% dels carcinomes endometrials [112]. Les cèl·lules tumorals presenten un citoplasma apreciable i un nucli gran amb un nuclèol prominent [6]. Globalment, la supervivència del carcinoma indiferenciat a 5 i 10 anys és del 50%, similar a la dels carcinomes endometrioides grau 3 [90].

8. Carcinoma de tipus mixt: és un tipus de tumor que està compost d'una mescla de carcinoma tipus I (carcinoma endometriode, incloent les diferents variants, o carcinoma mucinos) i de carcinoma tipus II (serós o de cèl·lula clara), on el tipus minoritari ha de comprendre almenys un 10% del volum total del tumor. Normalment es classifica segons el component majoritari però cal citar el minoritari a l'informe patològic per la possible significació pronòstica (I.S.G.Y.P.) [6,113].

2.4.2. Carcinoma endometriode

Com ja s'ha mencionat anteriorment és la forma més comuna de càncer endometrial, representant prop del 80-85% de tots els casos. Els tumors d'aquesta categoria, per definició, no han de contenir àrees majors del 10% de diferenciació escamosa, serosa, mucinosa o de cèl·lula clara. Solen presentar-se en la sisena dècada de la vida, però poden diagnosticar-se des de la segona a la vuitena dècada [114]. La majoria de les pacients són peri-menopàusiques o menopàusiques, si bé un 20% dels casos esdevenen abans de la menopausa [115]. La manifestació inicial sol ser el sagnat vaginal anormal, encara que en ocasions la pacient està asimptomàtica i el diagnòstic es realitza en el context d'un examen ginecològic de control amb una ecografia sospitosa que obliga a un estudi endometrial.

El carcinoma endometriode es troba freqüentment precedit per hiperplàsia. Recentment s'ha descrit una alta relació, inclús compartint alteracions genètiques comunes, entre el carcinoma endometriode i la hiperplàsia endometrial, concretament la de tipus atípica [116].

Una de les característiques més importants del carcinoma endometriode és la seva dependència hormonal dels estrògens, cosa que el classifica com a carcinoma endometrial de

tipus I [3]. 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 escamosa

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.).

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 [16].

2. Carcinoma endometriode amb diferenciació escatosa: entre un 20-50% dels adenocarcinomes contenen quantitats variables d'epiteli neoplàsic amb diferenciació escatosa. Tot i que la distinció entre adenocarcinoma endometriode amb o sense diferenciació escatosa no és clínicament important, el diagnòstic de diferenciació escatosa és essencial per què els elements escatosos no poden considerar-se com a part del component sòlid del tumor, fet que augmentaria el grau de l'adenocarcinoma. Cèl·lules escatoses immadures formen la clàssica mòrula que s'observa en aquest tipus histològic de carcinoma [117].

3. Carcinoma endometriode secretor: tipus poc comú que es caracteritza per estar compost per cèl·lules amb vacuoles citoplasmàtiques subnuclears o supranuclears que contenen glicogen i que s'assemblen a l'endometri secretor [118]. És un patró rar que representa només l'1-2% dels carcinomes endometrials.

4. Carcinoma endometriode villoglandular: representa el 10% dels carcinomes endometriodes i es caracteritza per la presència de papil·les digiformes que presenten nuclis fibrovasculars. Els carcinomes villoglandulars generalment es comporten de manera semblant als carcinomes endometriodes de baix grau, envaint rarament en profunditat o al cèrvix, pel que el seu pronòstic és favorable [90].

5. Carcinoma endometriode amb cèl·lules ciliades: tot i que ocasionalment és possible observar cèl·lules ciliades en molts adenocarcinomes endometriodes, el diagnòstic de la variant amb cèl·lules ciliades tant sols es dona quan aquest tipus cel·lular ocupa la majoria de les glàndules malignes. És per això que, aquest tipus cel·lular és poc comú, representa un 8% dels casos de EEC. Els estrògens indueixen la formació de cilis en l'endometri normal, i el carcinoma ciliat està associat amb el tractament amb estrògens exògens. Encara que alguns carcinomes ciliats són moderadament diferenciats i envaeixen fins al terç mig del miometri, no s'han descrit casos de pacients que hagin desenvolupat recurrències o hagin mort per la malaltia [90].

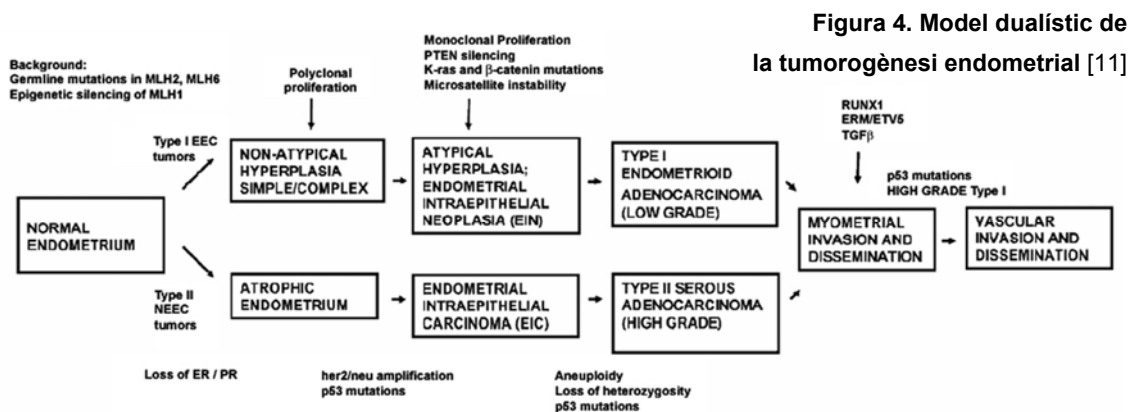
2.5. Bases moleculars del càncer d'endometri

La patogènesi molecular del CE continua sent encara poc entesa. De totes formes, com en d'altres malalties, com el càncer colorectal, es creu que la transició d'endometri normal a carcinoma implica l'acumulació successiva d'alteracions en gens preferentment implicats en proliferació cel·lular, inhibició de l'apoptosi i angiogènesi [119].

2.5.1 Model dualístic del carcinoma endometrial

La tumorigènesi del carcinoma endometrial s'explica en base a dues rutes que estan relacionades o no amb els nivells d'estrògens. Com ja ha estat mencionat anteriorment el carcinoma endometrial endometriode tipus I representa la majoria de casos (70-80%) de càncer d'endometri, es dona en dones peri-menopàusiques, expressen receptors d'estrògens i progesterona, estan relacionats amb hiperplàsia endometrial i presenten un bon pronòstic. En canvi, el carcinoma endometrial tipus II, es dona en dones grans, és negatiu pel receptor d'estrògens i progesterona, prové d'endometris atròfics i té mal pronòstic [5].

Aquest model dualístic de la tumorigènesi endometrial, basat en les hipòtesis realitzades per Bokhman [3], ha estat ampliat i confirmat en els últims anys amb les característiques genètiques que presenten, ja que el carcinoma endometrial endometriode (tipus I) i el no-endometriode (tipus II) presenten diferències respecte els canvis moleculars que s'esdevenen (Figura 4).



Així, tal com queda resumit en la següent taula (Taula 5) els de tipus I presenten inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i mutacions de PTEN i K-ras. No tant freqüentment poden presentar mutacions de p53, pèrdua d'expressió de p16 i amplificació de her2/neu. En canvi, els carcinomes endometrials no-endometrioides presenten elevada freqüència en mutació de p53, alteracions en E-cadherina, amplificació de her2/neu i sovint pèrdua d'expressió de p16; mentre que no és tant habitual MSI i mutacions de PTEN i K-ras [5].

Carcinoma endometrial		
Alteracions genètiques	TIPUS I	TIPUS II
Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)	20-40%	0-5%
Mutació p53	10-20%	90%
Inactivació PTEN	35-50%	10%
Inactivació p16 ^{INK4a}	10%	45%
Mutació β -catenina	25-40%	0-3%
Alteració E-cadherina	10-20%	80-90%
Mutació K-ras	15-30%	0-5%
Amplificació her2/neu	10-30%	80%

Taula 5. Principals alteracions genètiques proposades pel carcinoma endometrial tenint en compte les dues vies de carcinogènesi descrites [5,6,7]

2.5.2 Alteracions moleculars del carcinoma endometrial endometrioides

Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)

Les seqüències microsatèl·lit són seqüències curtes repetitives en tàndem àmpliament distribuïdes en el genoma. La seqüència més habitual és la repetició del dinucleòtid (CA)_n [120]. Degut a la seva estructura repetitiva els microsatèl·lits són susceptibles de patir errors durant la replicació del DNA que resulten en l'acumulació de mutacions. De totes maneres, les cèl·lules tenen mecanismes de reparació del DNA per a corregir aquests errors. El sistema de reparació del DNA (MMR) té un paper important en mantenir l'estabilitat genètica mitjançant la reparació dels errors comesos durant la replicació del DNA, inhibint la recombinació entre seqüències no idèntiques de DNA i participant en la resposta al dany del DNA. En els mamífers, els gens MMR codifiquen per 9 proteïnes (MLH1, MLH3, PMS1, PMS2, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 i MSH6) que interactuen entre elles per a formar complexes i heterodímers que participen en diferents funcions dels processos de reparació del DNA [121].

Els defectes en el sistema MMR donen lloc al fenotip MSI, caracteritzat per l'acumulació progressiva de mutacions als microsatèl·lits distribuïts al llarg del genoma [122,120,123].

Tot i que inicialment l'MSI va ser descoberta en càncers de còlon de pacients amb la síndrome HNPCC o amb síndrome de Lynch més endavant també es va trobar en altres càncers esporàdics [124]. Com ja s'ha mencionat anteriorment, el carcinoma endometrial és la segona malaltia diagnosticada en pacients amb HNPCC [125]. L'MSI s'ha trobat en el 70% dels carcinomes endometrials associats al síndrome de Lynch i ho presenten el 20-30% dels carcinomes endometrials [126,127,128,129]. 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 [130,131], 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 [132]. La metilació anormal de les illes CpG en les regions promotores dels gens pot provocar inactivació epigenètica progressiva de gens importants com ara gens d'inhibició del creixement (supressors tumorals) o de reparació del DNA [133].

Les alteracions causades en el sistema MMR per la hipermetilació del promotor de *MLH1* dona lloc a la pèrdua d'expressió d'aquesta proteïna, fet responsable del fenotip MSI de varis tumors esporàdics com el carcinoma endometrial [134,135]. Alhora, la hipermetilació del promotor de *MLH1* també s'ha detectat en hiperplàsies endometrials i quasi exclusivament en hiperplàsies atípiques, de les quals moltes coexisteixen amb carcinomes [136]. Aquestes descobertes suggereixen que la hipermetilació de *MLH1* podria ser un primer graó en la patogènesi del EEC i previ a desenvolupar el fenotip MSI.

L'impacte clínic-patològic del MSI en el carcinoma endometrial esporàdic és controvertit. La correlació entre grau histològic o supervivència i MSI encara ara és incerta [137,129,138,139,140]. Tot i que alguns escrits suggereixen una associació entre alt grau histològic i mal pronòstic [137,129,139], altres investigadors han trobat que l'MSI no està associat ni amb les variables clínic-patològiques ni amb el pronòstic [126,141,142]. De totes maneres, dades recents suggereixen que MSI està associat amb un pronòstic favorable del EEC [138,143,140].

Càncers amb MSI tenen una elevada taxa de mutació no solament en microsatèl·lits no codificants, sinó també en seqüències repetides en tàndem, localitzades dins de regions codificadores d'alguns gens. Són varis autors els que han suggerit que el procés carcinogènic pot ser degut a l'acumulació progressiva d'alteracions induïdes per MSI en importants gens reguladors. Càncers amb MSI poden presentar afectació en gens com el receptor β tipus II del *transforming growth factor (TGF- β RII)*, *BAX*, el receptor del *insulin-like growth factor II (IGFIIR)*, *MSH3*, *MSH6*, *Caspasa-5* i *PTEN*. Molts investigadors han aportat proves que les mutacions que es produeixen en aquests gens diana són molt freqüents en els EEC [122,123,126,144].

PTEN

El supressor tumoral *PTEN/MMAC1/TEP1* està localitzat en el cromosoma 10q23.3 que és una regió del genoma que pateix pèrdua d'heterozigotitat (LOH) en una àmplia varietat de càncers humans [145]. 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 [146] (Figura 5). Els mecanismes d'inactivació de *PTEN* inclouen la mutació, la deleció o pèrdua d'heterozigotitat (LOH) [147] i la hipermetilació del promotor [148].

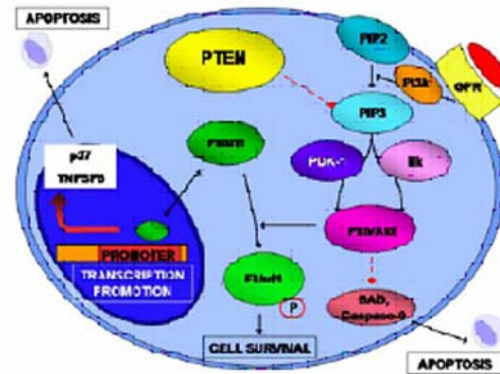


Figura 5. Ruta de PTEN

La mutació germinal de *PTEN* és responsable del síndrome de Cowden [149]. També s'han identificat mutacions somàtiques o deleccions de *PTEN* (37-61% dels casos) associades a estadis tumorogènics avançats de diferents òrgans [150,151,152]. En canvi, s'han trobat mutacions de *PTEN* en 15-55% de les hiperplàsies endometrials amb o sense atípia nuclear [153,154,155,156,157] i en el teixit endometrial normal amb sobreexposició estrogènica [153], [158], suggerint que la pèrdua de funció del supressor tumoral *PTEN* és un primer pas de la carcinogènesi endometrial.

La LOH en el cromosoma 10q23 és un fet habitual en el carcinoma endometrial i es dona aproximadament en el 40% dels casos de EEC [159,160,161]. Salvesen i col·laboradors van determinar que existia correlació entre mutacions de *PTEN* i edat menor, estadi FIGO baix, histologia endometriode, baix grau histològic i pronòstic favorable [162]. En els EECs es dona coexistència de mutacions en *PTEN* i MSI (60-86% dels tumors) i només el 24-35% dels tumors MSI negatius s'han descrit amb mutacions de *PTEN* [163,162,164,165].

Alguns estudis mostren que alteracions en *PTEN* poden ser utilitzades com a marcador pronòstic dels carcinomes endometrials i podrien ajudar en la detecció de les lesions premalignes. Dades més recents suggereixen que només les mutacions de *PTEN* fora dels exons 5-7 poden ser utilitzats com a predictors favorables de supervivència independentment de les característiques clínic-patològiques dels tumors [166]. En el cas contrari, la pèrdua d'expressió de *PTEN* seguit de la fosforilació d'Akt s'ha considerat com un factor de mal pronòstic en el EEC [167].

Mutacions en el protooncogen *K-ras*

K-ras és un oncogen 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 estan implicades en les vies de transducció de senyal entre els receptors de la superfície cel·lular i el nucli amb objectiu de controlar el creixement i la diferenciació cel·lular [168] (Figura 6).

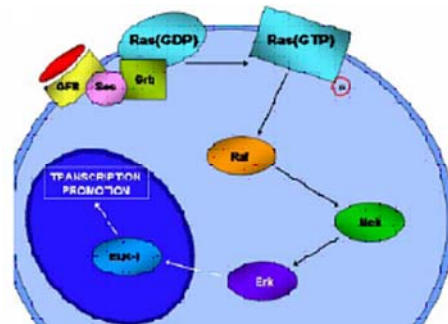


Figura 6. Ruta de *K-ras*

S'han identificat mutacions en *K-ras* en el 90% dels adenocarcinomes pancreàtics, 60% tumors mucinosos d'ovari, 50% carcinomes colorectals, però tant sols en un 10-30% dels EECs [119,169,170,171,172,173], [174], [175], [176], [177]. Alhora, en el EEC no s'ha trobat relació entre mutacions en *K-ras* i estadiatge del tumor, grau histològic, grau d'invasió miometrial o edat. De totes maneres, en algunes investigacions s'han descrit que dones post-menopàusiques amb EEC presenten associació entre mutacions de *K-ras* i hiperplàsia endometrial i metàstasi a gangli limfàtic [178,177]. La mutació puntual de *K-ras* també ha estat demostrada en el 15% de les hiperplàsies endometrials i la freqüència és similar a la trobada en el EEC, cosa que suggereix un rol destacable de *K-ras* en l'inici de la carcinogènesi endometrial [119,175,128,179]. També s'han detectat mutacions de *K-ras* en pòlips endometrials en pacients amb càncer de mama i tractades amb tamoxifè. Aquestes mutacions són més habituals en aquest tipus de pòlips (64%) que ens les hiperplàsies endometrials esporàdiques (4.5-23%) i la seva freqüència està relacionada amb la duració del tractament amb tamoxifè i l'estat menstrual de la pacient [180,181].

B-catenina

Les catenines són una família de proteïnes citoplasmàtiques que s'han classificat en alfa (α), beta (β) i gamma (γ) segons les seva mobilitat electroforètica. 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 mitjançant la interacció amb 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) [182,183] (Figura 7). En el citoplasma, la β -catenina lliure interacciona amb la proteïna APC i pot actuar com a factor de transcripció. 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 alhora provoca una activació de la via Wnt [184].

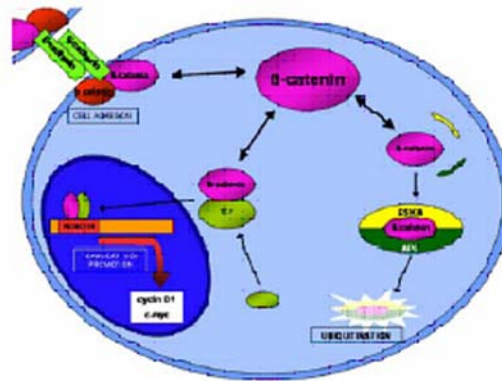


Figura 7. Ruta de β -catenina

L'activació de la via APC/ β -catenin/Tcf es dona en varis carcinomes humans, incloent carcinoma endometrial uterí, quasi exclusivament EECs, i carcinoma endometrial d'ovari. Els EECs amb mutacions de β -catenina són bàsicament tumors de baix estadi i bon pronòstic. En el càncer colorectal les mutacions de β -catenina sovint estan associades a MSI, en canvi en el EEC es donen independentment de la via de mutació [185]. Tot i que les mutacions són més habituals en tumors amb MSI, aquesta associació no és estadísticament significativa, i no existeix correlació amb l'expressió de β -catenina. Aquest fet suggereix que en els EECs β -catenina i MSI pertanyen a dues vies independents de les mutacions en *PTEN* i *K-Ras* [186].

La sobreexpressió de β -catenina degut a la inactivació dels llocs de fosforilació, resulta en la seva acumulació en el nucli i l'activació incontrolada de gens diana com la metal·loproteasa de matriu 7 (*MMP-7*), *ciclina D1 (CD1)*, *connexina 43*, *ITF2*, *c-myc* i *PPAR- δ* [187,188,189,190]. La regulació de l'expressió de la *MMP-7* per part de la β -catenina en el carcinoma colorectal 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 [187]. La funció exacta de la β -catenina en el carcinoma endometrial roman encara desconeguda. 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 [191].

E-cadherina

Les cadherines són una família de molècules d'adhesió essencials per les unions cèl·lula-cèl·lula [192]. La E-cadherina és una proteïna codificada pel gen *CDH1* i és la principal cadherina que s'expressa en les cèl·lules epitelials. Així, una disminució en l'expressió de E-cadherina resulta en una disfunció del sistema d'adhesió cèl·lula-cèl·lula. Es creu que el gen *CDH1* és un gen supressor de tumors que, en perdre's, promou la invasió tumoral i metàstasi.

En el cas del carcinoma endometrial, s'ha observat que la pèrdua completa o parcial d'E-cadherina està relacionat amb un comportament més agressiu del tumor [193,194].

L'expressió anormal de E-cadherina en càncer pot ser deguda a LOH, mutacions o hipermetilació del promotor. En el carcinoma endometrial s'ha trobat un baix percentatge de mutacions en el gen *CDH1* [195], la LOH s'ha relacionat amb mal pronòstic [196] i la hipermetilació del promotor s'ha associat amb alt grau histològic i invasió miometrial [197].

Desbalanceig hormonal d'esteroides

Els receptors d'estrògens i de progesterona són membres de la superfamília de receptors nuclears. Són factors de transcripció dependents de lligand, que en estat d'activació, poden unir-se a diferents llocs diana en el DNA per a modular l'expressió de gens específics. A part d'aquesta activació directa a gens diana, també s'ha descrit mecanismes d'activació del DNA a través de la unió a altres factors de transcripció com AP-1 o NF- κ B [198].

- Alteracions del receptor d'estrògens (ER): Es coneixen dos subtipus de receptors d'estrògens ($ER\alpha$ i $ER\beta$). Diversos estudis han demostrat que en l'úter $ER\alpha$ és la forma predominant i alhora és la responsable de mitjançar la sensibilitat de l'endometri als estrògens [199]. Però en treballs realitzats amb ratolins knockout per $ER\beta$ s'ha observat una resposta exagerada als estrògens i un augment de la proliferació, suggerint-ne que $ER\beta$ pot actuar modulant la funció de $ER\alpha$ i tenir un efecte anti-proliferatiu [200,201]. Per tant, un desequilibri en l'expressió d' $ER\alpha$ i $ER\beta$ pot ser crític en la tumorigènesi dependent d'estrògens. A més s'han descrit variants resultat d'errors durant la transcripció per ambdós receptors. Així, la variant $\Delta 5 ER\alpha$ (sense l'exó 5) només ha estat detectada en carcinoma endometrial [202]. S'ha vist que aquesta variant de l' $ER\alpha$ 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 [203,204,205]. També s'ha descrit que aquesta variant està relacionada amb la resistència al tractament amb tamoxifè i amb l'augment d'expressió del PR [206]. Una altre variant d'interès és $ER\beta_{ex}$ (sense l'exó 8) [207] que té un efecte dominant negatiu sobre $ER\alpha$. Aquesta variant s'expressa tant en endometri normal com neoplàsic però la seva funció en el carcinoma endometrial és encara desconeguda [208,209].

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' $ER\alpha$ juga un paper important en aquest procés regulant l'expressió del PR [210].

- Alteracions del receptor de progesterona (PR): La progesterona actua a través del seu receptor com un regulador negatiu de l'acció dels estrògens a l'endometri. Existeixen dues isoformes del PR: PR-A i PR-B. En l'endometri, PR-A regula negativament l'acció dels estrògens impedit l'activació de $ER\alpha$. En canvi, PR-B actua com un agonista d'estrògens [198]. En conjunt, es creu que PR-A és necessari per a inhibir la proliferació endometrial induïda pels estrògens mitjançant la inactivació dels efectes de PR-B. 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 [211].

Apoptosi

L'apoptosi o mort cel·lular programada és un procés pel qual una cèl·lula mor de manera controlada. En càncer, l'apoptosi presenta alteracions en varis dels seus passos. L'apoptosi pot ser iniciada per dos mecanismes bàsics: a) la *via intrínseca*, activada per proteïnes mitocondrials com el citocrom-c; i b) la *via extrínseca*, activada per la unió de lligand als receptors de mort com per exemple el factor de necrosi tumoral (TNF), Fas o l'apoptosi relacionada amb TNF que inclou el lligand FLIP (Figura 8). Un regulador clau en aquesta via de senyalització és la proteïna inhibidora FLIP, la qual comparteix un elevat grau d'homologia amb la caspasa-8 però no presenta activitat proteasa.

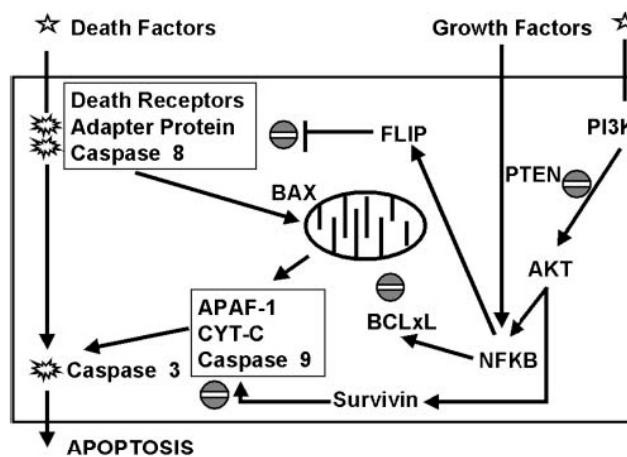


Figura 8. Apoptosi, ruta intrínseca (mitocondrial) i ruta extrínseca (iniciada per receptors de mort).

Alteracions en l'apoptosi poden ser importants en el desenvolupament i progressió del EEC. Alguns estudis han demostrat la implicació dels gens *Bcl-2*, *Bax* i *caspasa-3* en la desregulació progressiva de la proliferació i apoptosi, avançant d'hiperplàsia simple i complexa a adenocarcinoma [212,213]. També es donen alteracions en PI3K-Akt i NF-κB, molècules implicades en la supervivència i creixement cel·lular, les quals disminueixen la sensibilitat a l'apoptosi.

Pallares i col·laboradors van descriure que en el carcinoma endometrial la família de factors de transcripció NF-κB regulen varis processos incloent el creixement cel·lular, diferenciació i apoptosi [214]. Els gens diana de NF-κB poden o bé inhibir l'apoptosi o bé promoure la progressió del cicle cel·lular. En aquests estudis, els autors confirmen que en el carcinoma endometrial, NF-κB es troba habitualment activat i pot inhibir l'apoptosi mitjançant gens diana

com *FLIP* i *Bcl-XL* [214,215]. Alhora, també demostren que la proteïna survivina, relacionada amb apoptosi, es troba freqüentment sobreexpressada en els carcinomes endometrials i correlaciona de manera inversa amb l'expressió de *PTEN* [216]. En resum, la inactivació de *PTEN* posa en marxa la ruta de PI3K/Akt, la qual després activa survivina i NF- κ B. En conseqüència, gens diana com *Bcl-XL* i *FLIP* inhibeixen l'apoptosi, resultant en la progressió del tumor.

2.5.3 Model de progressió del carcinoma endometrial endometriode

Existeixen evidències que el desenvolupament del carcinoma endometrial recorda el model proposat per Vogelstein de la progressió del carcinoma colorectal [217]. 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 [5].

Així el model de tumorigènesi proposat progressa des de hiperplàsia simple a complexa i, posteriorment d'hiperplàsia atípica a carcinoma. La majoria de les alteracions genètiques trobades en el carcinoma endometrial es donen en els estadis primerencs del procés tumorigènic. Així, 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 [5,218,6,219,220] (Figura 4).

2.5.4 Alteracions moleculars del carcinoma endometrial no-endometriode

Aquest tipus de carcinomes endometrials vénen encapçalats pels histiotips serós i de cèl·lules clares, comprenen el 10-20% dels carcinomes endometrials. Són tumors que s'inicien directament d'endometris atròfics, són d'alt grau, mal pronòstic i independents d'estrògens.

Els carcinomes no endometriodes es caracteritzen per presentar, majoritàriament, grans alteracions genètiques. Aquestes alteracions definides com aberracions cromosòmiques, normalment vénen acompanyades per la inactivació d'importants proteïnes reguladores com *p53* o *p16^{INK4a}* (Figura 4). Aquest fet és la raó per la qual els carcinomes no endometriodes estan considerats de mal pronòstic. Les principals alteracions són:

p53

El supressor tumoral *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 [221] (Figura 9). En les cèl·lules normals, *p53* és degradat ràpidament i no és possible detectar-la per immunohistoquímica. En canvi, quan es troba mutada, *p53* no és funcional, resisteix la degradació i és possible detectar-la [222]. 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 [223].

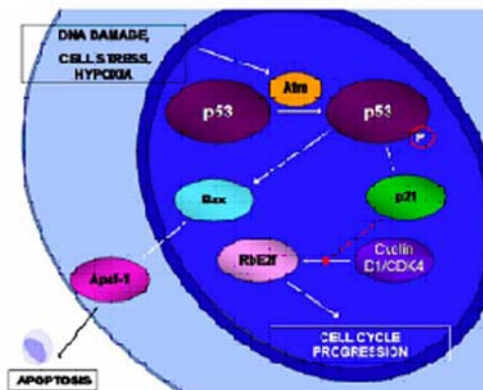


Figura 9. Ruta de *p53*

p53 es troba inactivat en quasi el 50% dels tumors humans. La mutació de *p53* és el més característic del NEEC. De fet, com ja s'ha mencionat, és possible detectar la sobreexpressió de *p53* per immunohistoquímica en la majoria de NEEC (71-85%) i en canvi en els de tipus I és inferior al 10%, fet que converteix *p53* en un marcador molecular útil per a distingir entre càncers de tipus I o II [224,225,226]. S'ha determinat que aproximadament el 20% dels EEC d'alt grau tenen mutació en *p53* [227], i aquest fet reforça la hipòtesi que la mutació de *p53* pot influir en la progressió de EEC a NEEC. De totes maneres, 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 [101]. 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 [228].

L'anàlisi mutacional de *p53* ha permès determinar que algunes mutacions de *p53* (dominants negatives) es troben molt sovint en estadiatges avançats i tipus histològics agressius dels carcinoma endometrial, i aquest fet representa un predictor de supervivència en les pacients amb carcinoma endometrial [229]. Alhora la sobreexpressió de *p53* està associada amb alt grau histològic, estadiatges avançats i mal pronòstic [230,231]. De fet, existeixen investigadors que postulen que la sobreexpressió de *p53* pot servir per identificar tumors endometrials d'alt risc [232].

Amplificació HER-2/neu

HER-2/neu (*c-erb-B2*) és, conjuntament amb *K-ras*, un dels protooncogens més ben caracteritzats en el carcinoma endometrial. *HER-2/neu* o receptor del factor de creixement epidèrmic tipus II codifica per un receptor transmembrana tirosin-kinasa 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 d'*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 [233].

S'ha observat que existeixen nivells elevats de *HER-2/neu* en varis tipus tumorals incloent-hi els carcinomes de mama, ovari i endometri, i que correlacionen amb resistència a la quimioteràpia i baixa supervivència. Aquest fet suggereix que les cèl·lules tumorals que sobreexpressen *HER-2/neu* es comporten amb més agressivitat i poden presentar avantatges en el seu creixement respecte cèl·lules tumorals negatives per a *HER-2/neu* [234].

Tot i que en el carcinoma endometrial es dona l'amplificació o sobreexpressió de *HER-2/neu* en un 20-40% dels casos, té una incidència d'un 80% en els carcinomes no endometrioides [93, 235,236]. Aquest fet s'ha associat amb un pronòstic desfavorable, estadiatge avançat, alt grau histològic i baixa supervivència [234,237]. 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 [238].

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 es creu que també podria tenir algun paper potencial en els estadis inicials de la patologia [239]. Cal dir, però, que diverses vies d'estudi apunten a la potencialitat futura d'aquest oncogen com a factor pronòstic en la patologia endometrial [239,240].

Inactivació del supressor tumoral p16^{INK4a}

La inactivació de *p16^{INK4a}* s'ha descrit fins a un 45% dels carcinomes no endometrioides [5]. *CDKN2A*, gen que codifica per *p16^{INK4a}*, 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 [241]. Sembla que la mutació o la deleció del gen de *p16^{INK4a}* es dona amb poca freqüència en el carcinoma endometrial [242], no obstant la pèrdua d'expressió d'aquest gen és significativa en el tipus de carcinoma no endometrioide [243,244]. 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 [245].

2.5.5 Model de progressió del carcinoma no-endometriode

El model de progressió del carcinoma serós 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 (Figura 10). 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 [5,246]. 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 [5]. Matias-Guiu i col·laboradors hipotetitzen que el carcinoma serós podria esdevenir-se a partir del carcinoma endometriode a través de les mutacions en p53. Aquest model es basa en la descripció de carcinomes mixts de tipus endometriode i serós [218].

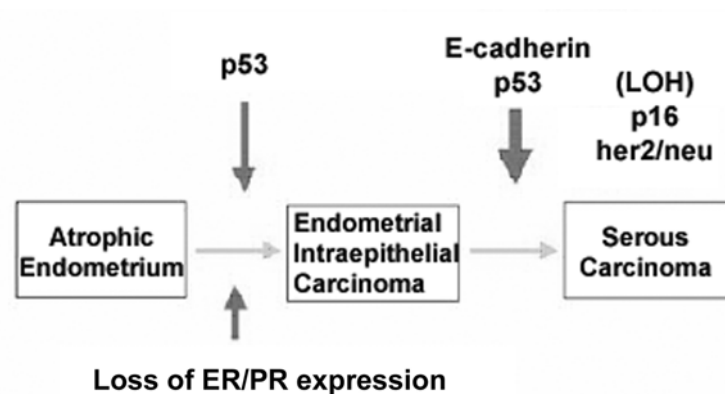


Figura 10. Model de progressió del carcinoma serós. Les principals alteracions genètiques són la mutació de p53 i E-cadherina [5]

2.6. Factors pronòstic del carcinoma endometrial

En les pacients amb carcinoma endometrial, el patòleg té un paper important en establir el pronòstic i la necessitat de tractament adjuvant després de l'operació. En les dues últimes dècades, l'estudi de les característiques patològiques del tumor han permès establir 2 o més grups de pacients amb diferent final del procés tumoral (supervivència lliure de malaltia o bé recurrència). És per això, que els factors pronòstic són de gran utilitat [247].

La Societat de Ginecologia Oncològica ha realitzat diversos estudis en els quals demostren que els factors pronòstic del carcinoma endometrial poden dividir-se en factors uterins i factors extra-uterins [248,249,250,251]. Els factors uterins inclouen: tipus histològic, grau histològic, profunditat d'invasió miometrial, invasió vascular, presència d'hiperplàsia endometrial atípica, afectació cervical, ploïdia del DNA, estat dels receptors hormonals. I els factors extrauterins

inclouen: citologia peritoneal positiva, afectació d'annexes, metàstasi en ganglis limfàtics pèlvics i para-aòrtics i metàstasi peritoneal.

Les pacients que presenten malaltia extrauterina amb afectació cervical i invasió vascular constitueixen un grup d'alt risc, amb aproximadament una reincidència del 65% [251]. En canvi, les pacients que presenten tumors que queden limitats al cos uterí (sense afectació cervical) i sense evidències d'invasió vascular tenen un risc de recurrència menor. En aquestes pacients el pronòstic varia, bàsicament, en funció de tres paràmetres: el tipus histològic, el grau histològic i la profunditat d'invasió miometrial [249,250,251,252,253]

2.6.1. Edat

Com en la major part dels processos neoplàsics, l'edat està directament relacionada amb el pronòstic del càncer [23]. 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 [254].

2.6.2. Tipus histològic

El tipus cel·lular s'ha identificat com un important marcador de predicció del comportament biològic del carcinoma endometrial. En els últims anys, la patogènesi del carcinoma endometrial s'ha explicat en base al model de Bokhman [3] en que, com ja s'ha mencionat anteriorment, el carcinoma endometrial es classifica en dos tipus: el carcinoma endometrial endometriode (EEC) o de tipus I i el carcinoma endometrial no-endometriode (NEEC) o de tipus II (Taula 3). 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 es poden trobar els carcinomes mixts, cosa que fa que aquest model no estigui del tot delimitat, ja que no explica el grup de carcinomes no endometriodes que vénen precedits pels carcinomes endometriodes o els carcinomes de tipus mixt [5,255,218,126].

2.6.3. Grau histològic

Mentre que els carcinomes NEEC són considerats d'alt grau per definició, els EEC necessiten definir el grau histològic [253]. Conjuntament amb els estadis F.I.G.O, el grau histològic és un factor molt sensible amb un valor pronòstic amplament reconegut [256].

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 [8].

1) El **grau arquitectural** es determina per l'extensió del tumor, format per masses sòlides de cèl·lules, comparades amb les glàndules ben definides [16]. Segons la F.I.G.O. es poden distingir tres graus arquitecturals en el carcinoma endometrial: G1,G2 i G3 (Taula 6).

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 7). En presència d'atípia nuclear (nuclis polimòrfics) notable s'ha d'augmentar a 1 el grau nuclear [253].

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 [257].

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 6. Gradació arquitectural proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8]

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 7. Gradació nuclear proposada per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8].

El valor de la gradació F.I.G.O. va ser demostrat per Zaino i col·laboradors [258]. En aquest estudi es demostrava que la supervivència després de 5 anys lliures de la malaltia en pacients amb tumors de grau 1 era del 94%, per a tumors de grau 2 era del 84% i per a tumors de grau 3 era del 72%. 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 reproducibilitat [259,260,261].

També s'ha descrit que el grau histològic correlaciona amb altres factors pronòstics com l'edat, estadi o la profunditat d'invasió miometrial. Sembla doncs, que el grau histològic no és un pronosticador independent, a més la seva importància decreix en ajustar aquests altres factors [256]. Tanmateix, com suggereixen els treballs de Lax i col·laboradors [260], fins i tot per pacients d'avançat estat de la patologia, el grau histològic comporta un valor pronòstic. Cal dir que en l'estadiatge de la F.I.G.O., també s'hi contempla el grau histològic, per tant cadascun dels estadis es complementen amb un grau corresponent, depenent de les característiques del tumor.

2.6.4. 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 [254,262,263,264]. 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, així com avaluació del ganglis limfàtics pèlvics i para-aòrtics, annexos i citologia del fluid peritoneal. L'avaluació patològica inclou el grau histològic, profunditat d'invasió miometrial i determinar l'afectació cervical.

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 8 i Figura 11) [8]. 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 [265]. 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 [263]. 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 8. Estadis del carcinoma endometrial establerts per la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia [8]. 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**).

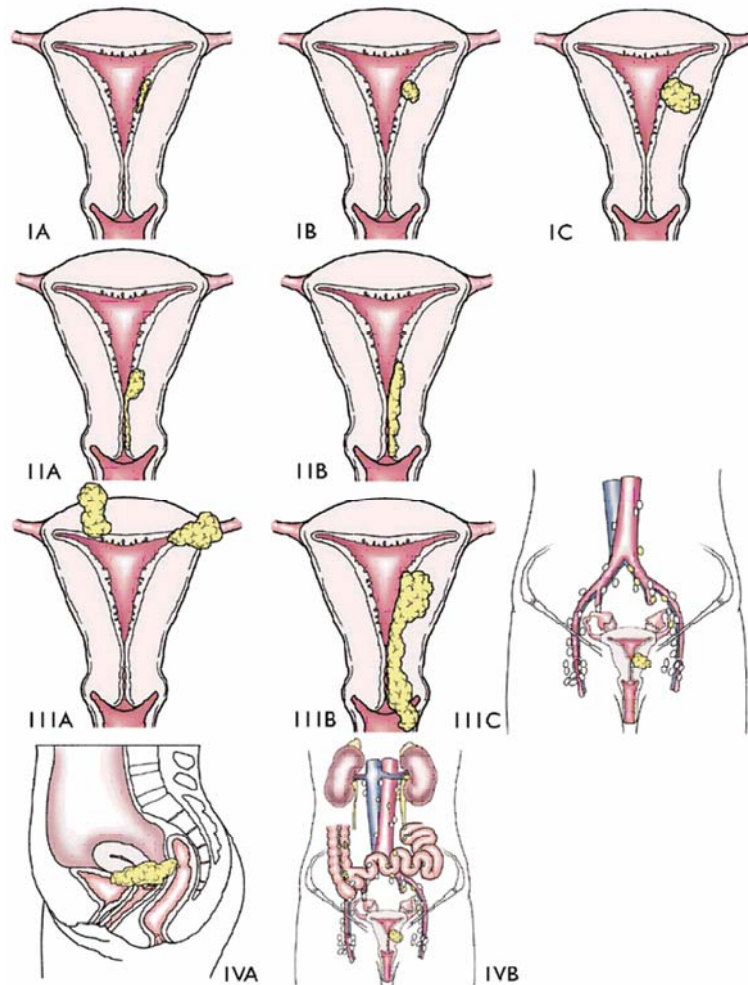


Figura 11. Classificació per estadis de la F.I.G.O. L'esquema mostra la progressió del tumor endometrial en cadascun dels estadis F.I.G.O.. L'estadi de carcinogènesi inicial és l'IA en el qual el tumor es troba confinat a l'endometri; el tumor surt de la cavitat endometrial progressivament fins arribar a l'estadi IVB, que es caracteritza per presentar metàstasis a distància [8].

2.6.5. 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 $<50\%$ i profunditat d'invasió miometrial $\geq 50\%$. 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 [266]. Actualment es considera que la profunditat d'invasió miometrial és el factor predictiu més important de disseminació hematògena [267].

Aquest punt és un dels eixos principals d'aquesta tesi, és per això que es desenvoluparà més extensament en el següent apartat.

2.6.6. Invasió vascular

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 [268,269,270]. La invasió vascular és poc freqüent en carcinomes del tipus endometriode; s'ha descrit que la freqüència d'invasió vascular incrementa en tipus cel·lulars desfavorables, grau histològic elevat i profunditat d'invasió miometrial, tot arribant fins a un 95% d'afectació en carcinomes serosos [255]. De totes maneres, la presència d'invasió vascular és altament predictiu de presència de metàstasi en ganglis limfàtics [256,270].

2.6.7. Hiperplàsia endometrial

Els carcinomes endometrials que vénen acompanyats d'hiperplàsia endometrial atípica normalment presenten un pronòstic favorable. Aquests tumors acostumen a ser de baix grau i no presenten invasió miometrial [271,272]. D'altra banda, els tumors d'alt grau acostumen a anar acompanyats d'endometri atrofíic.

2.6.8. Invasió cervical

La invasió cervical determina la classificació d'un tumor en estadi II, tal com es recull en la estadificació de la FIGO. Ocasionalment, l'afectació cervical no és directa i sí per implants o extensió limfàtica [263,273,274,275]. La seva afectació es correlaciona amb graus tumorals pitjor diferenciats, amb major volum tumoral, amb major profunditat d'invasió miometrial, amb permeació limfovascular i amb afectació ganglionar, sobretot en el subestadi IIB.

2.6.9. Invasió de la serosa, citologia peritoneal i invasió d'annexes

Des del punt de vista d'alguns ginecòlegs oncològics, el criteri utilitzat per a classificar els carcinomes endometrials d'estadi III (6% dels casos) és en part artificial [276]. La invasió de la serosa implica l'últim pas de la invasió miometrial. La citologia peritoneal implica la presència de cèl·lules atípiques en el líquid peritoneal i es dona en un 12-20% del casos de dones amb càncer endometrial (10% en estadi I). Sovint s'associa amb d'altres factors de risc, com alt grau tumoral, invasió miometrial i extensió extrauterina [277,278,279]. I finalment, la invasió d'annexes s'ha correlacionat amb tumors pitjor diferenciats i amb major percentatge d'afectació de ganglis regionals. És possible que molts dels tumors classificats en estadi III (basat en la presència d'afectació d'annexes) en realitat siguin carcinomes ovàrics primaris.

2.6.10. Metàstasi a ganglis limfàtics

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. Els carcinomes endometrials associats a metàstasi en ganglis limfàtics pèlvics i/o para-aòrtics es classifiquen com a tumors en estadi IIIC [8]. Sembla que el pronòstic per a tumors amb afectació de ganglis pèlvics és millor que els tumors amb afectació en ganglis para-aòrtics. L'índex de supervivència de les pacients després de 5 anys lliures de malaltia amb ganglis para-aòrtics positius és d'un 36% comparat amb un 85% a les pacients amb ganglis para-aòrtics negatius [251].

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 [258].

2.6.11. Ploidia 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. Prop del 67% dels EEC són diploides, en canvi el 55% dels NEEC (carcinomes serosos, de cèl·lula clara o indiferenciats) presenten patrons no diploides. Els tumors diploides acostumen a ser de baix grau, amb invasió superficial i estan associats a major supervivència que la que mostren els carcinomes aneuploides [280,281,282,283]. S'ha observat que en tumors en estadi I existeix un 94% de correlació entre supervivència lliure de malaltia i carcinomes diploides anvers una correlació del 64% en el cas de carcinomes aneuploides [284,285,257].

2.6.12. 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 [286], 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 [287,288,289,290]. 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 [291].

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

1) *HER-2/neu* (*c-erb-B2*): l'amplificació i sobreexpressió del protooncogen *HER-2/neu* s'esdevé aproximadament del 20%-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 [234,237]. 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 [292,240]. 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.

2) *K-ras*: les mutacions en el codó 12 de *K-ras* es troben presents aproximadament entre el 10%-30% dels carcinomes endometrials, majoritàriament de tipus endometriode [172]. Diversos estudis han indicat que la presència de l'oncogèn *K-ras* activat és un factor pronòstic negatiu, tot i que d'altres estudis no ho han pogut confirmar [293,294].

3) *Bcl-2*: és un protooncogen que inhibeix el programa de mort cel·lular o apoptosi. Per tant l'activació aberrant de l'oncogèn *Bcl-2* confereix a la cèl·lula la capacitat d'evitar l'apoptosi i esdevenir immortal. S'han trobat nivells elevats de *Bcl-2* en hiperplàsia endometrial amb una disminució de l'expressió en els carcinomes. La pèrdua de *Bcl-2* ha estat associat amb mal pronòstic, augment en la invasió miometrial, elevat estadiatge F.I.G.O. i tipus cel·lular agressiu [295], així com un augment de trobar afectació en ganglis limfàtics [296,297].

2.6.14. Marcadors de proliferació

La capacitat proliferativa de les cèl·lules tumorals és la característica fonamental del creixement dels tumors [298]. Hi ha diversos mètodes de quantificació de la capacitat de proliferar de les cèl·lules [299] per citometria de flux [300,301,302] i immunohistoquímica [299].

Els antígens de proliferació més freqüentment emprats són el PCNA i el Ki-67 (MIB-1) tissular [299].

1) PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) és una proteïna nuclear de 46 kDa que actua com a cofactor de la DNA polimerasa. La síntesi de PCNA ha estat directament correlacionada amb la replicació del DNA i la proliferació cel·lular [299].

2) Ki-67: 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) [299].

Tant PCNA com Ki67 en el carcinoma endometrial estadi I correlacionen amb el grau histològic, la profunditat d'invasió miometrial i el risc de recurrència. Molts dels EEC expressen baix Ki-67 i tenen un pronòstic favorable, mentre els carcinomes serosos i de cèl·lula clara expressen elevat Ki-67 i tenen mal pronòstic.

2.6.15. Inestabilitat de microsatèl·lits

Com ja s'ha mencionat anteriorment, s'ha trobat MSI en un 30% dels carcinomes endometrials, sobretot en els de tipus endometriode [126]. Tot i que són molts els estudis en que no relacionen MSI amb edat, raça, grau histològic, estadi o profunditat d'invasió miometrial, si que s'ha trobat que els EEC amb MSI tenen un 20% millor taxa de supervivència després de 5 anys lliures de la malaltia envers els EEC que no tenen MSI [143]. 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 dona lloc un fenotip clínic menys agressiu [143].

2.6.16. Els supressors tumorals PTEN, p53, p21 WAF1/CIP1 i p16 INK4a com a factors pronòstic

Els gens denominats supressors tumorals 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. La seva 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 [7,247].

1) *PTEN*: aquest supressor tumoral es troba mutat en el 30- 60% dels carcinomes endometrials [304,305]. S'ha observat que les mutacions a *PTEN* es donen gairebé exclusivament en el carcinoma endometrial, molts d'ells amb MSI i absència de sobreexpressió de *p53*. Minaguchi i col·laboradors [166] 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. En d'altres investigacions, es va associar la metilació del promotor de *PTEN* amb estadis avançats del carcinoma endometrial [148]. 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 [305,163,304].

2) *p53*: la mutació o sobreexpressió de *p53* està clarament associada amb baixa supervivència, sobretot en el cas dels carcinomes serosos on correlaciona amb d'altres factors pronòstic adversos (per exemple estadiatge avançat o absència de PR) [285,237]

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 [306].

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 [245].

2.6.17. β -catenina

Ha estat descrit que existeixen mutacions en el gen de la β -catenina de prop del 15-40% dels carcinomes endometrials de baix grau [186,307,308]. De manera semblant, l'expressió nuclear de la β -catenina ha estat majoritàriament trobada en els carcinomes endometrioides de baix grau [309]. Per tant el conjunt d'estudis realitzats apunten en la direcció de la β -catenina com a factor pronòstic favorable.

3. INVASIÓ MIOMETRIAL

És possiblement el factor pronòstic més important en els estadis I i II. Es correlaciona amb la presència de metàstasis ganglionars, amb l'índex de recurrències i amb la taxa de supervivència global. No obstant això, l'estimació precisa d'aquest paràmetre pot ser complexa per la dificultat d'identificar la unió endo-miometrial, pel diferent gruix miometrial segons la zona uterina o per la presència d'altres patologies afegides com miomes o adenomiosis.

Poder reconèixer la infiltració miometrial és clar quan les glàndules prenen una forma irregular, es troben distribuïdes a l'atzar, estan rodejades d'estroma desmoplàstic i infiltren el miometri (Figura 12). De totes maneres, en algunes ocasions un carcinoma que no ha envaït el miometri pot presentar el límit endometrial irregular on parts del tumor semblen endinsar-se en el miometri i això ocasiona una mala interpretació com a presència d'invasió miometrial superficial. De fet, prop del 25% dels casos diagnosticats amb invasió miometrial estan mal diagnosticats [310]. La clau del problema està en que l'endometri normal no és una línia recta sinó que presenta protuberàncies llargues i curtes que s'endinsen en el miometri.

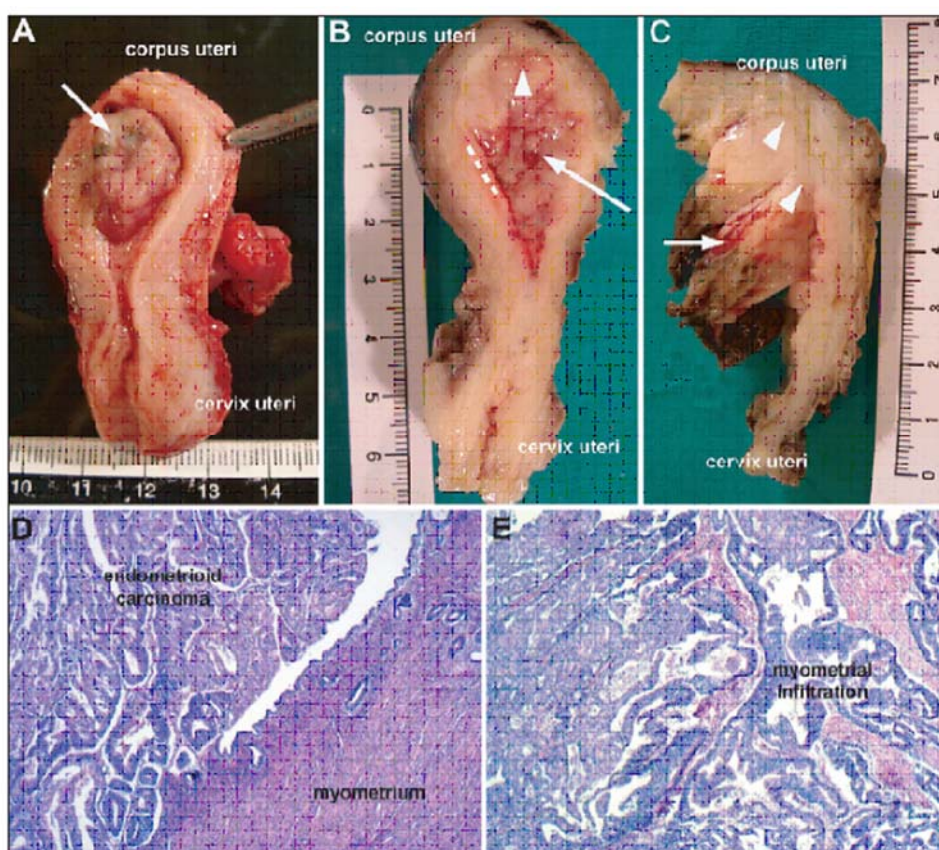


Figura 12. Infiltració miometrial en el carcinoma d'endometri. A-C, Imatges macroscòpiques de carcinomes endometrials no invasius (A) i invasius (B-C). D-E, Imatges de tinció amb hematoxilina/eosina de tumors endometrials no infiltrants (D) i infiltrants (E) (25X). D, Carcinoma endometrial que afecta la mucosa uterina atròfica sense envair la paret miometrial. E, Carcinoma endometrial afectant tant la cavitat uterina com la paret miometrial.

Des de la perspectiva en la que es desenvolupa aquesta tesi, és important descriure quins són els esdeveniments moleculars que es donen durant el procés d'invasió miometrial. Actualment la recerca està centrada en la cerca de nous marcadors que puguin descriure els passos inicials del procés tumorogènic associats a la promoció de metàstasi, amb l'objectiu de desenvolupar teràpies dirigides directament contra les cèl·lules disseminades o les micrometàstasis generades.

El pas inicial que caracteritza el procés metastàtic es basa en el despreniment de les cèl·lules tumorals de la línia epitelial i la penetració en el teixit connectiu adjacent [311]. La transició epiteli-mesènquima (EMT) és un procés dinàmic en el que les cèl·lules perden la seva polaritat i el contacte cèl·lula-cèl·lula, es remodela el citoesquelet, s'adquireix fenotip migrador i programa d'expressió gènica semblant al mesenquimal. En el procés d'invasió i metàstasi les cèl·lules cancerígenes adquireixen aquestes característiques EMT [312,313]. Durant la tumorogènesi, EMT pot augmentar la motilitat i invasivitat de les cèl·lules cancerígenes, i la transformació maligna de les cèl·lules pot ser deguda a l'activació de vies de senyalització específiques de EMT [314].

3.1. Bases moleculars de la invasió en el carcinoma endometrial

3.1.1. Molècules d'adhesió implicades en la invasió en el carcinoma endometrial

Les cadherines

D'aquesta família de proteïnes, la E-cadherina és la més important. Aquesta molècula és una glicoproteïna transmembrana depenent de calci present en moltes de les cèl·lules epitelials sanes. En el procés de transició epiteli-mesènquima es troba infraexpressada. Els seus dominis intra i extracel·lular exerceixen funcions diferents: per una banda el domini extracel·lular s'uneix a d'altres cadherines de les cèl·lules veïnes i en canvi, el domini intracel·lular interacciona amb proteïnes citoplasmàtiques que alhora transmeten el senyal d'adhesió i ancoren el complex proteic (anomenat unió adherent) al citoesquelet d'actina [315]. E-cadherina està també implicada en altres tipus d'unions adherents com són els desmosomes i les "tight junctions", estructures importants per a establir i mantenir les capes epitelials i la integritat tissular [316]. De fet, E-cadherina està actuant com a supressor tumoral inhibint la invasió i metàstasi, i sovint està reprimida o degradada durant la tumorogènesi [317,318] (Figura 13).

Fujimoto i col·laboradors han establert correlació entre E-cadherina i característiques histopatològiques del carcinoma endometrial: els nivells proteics d'E-cadherina disminueixen amb la pèrdua de diferenciació, i estan inversament correlacionats amb la profunditat de la invasió miometrial i les metàstasis a ganglis limfàtics paraaòrtics. Aquestes dades, més tard corroborades per d'altres grups, permeten concloure que la disminució de l'expressió d'E-cadherina de les cèl·lules tumorals endometrials els facilita la invasió [193,194,319,320].

Alhora existeix relació entre el PR i E-cadherina. Com ja s'ha mencionat anteriorment, la pèrdua d'expressió del PR en el carcinoma endometrial està associat a major capacitat invasiva i metastàtica [321], i això és en part mediat per l'expressió d'E-cadherina [322]. A més, s'ha descrit que la progesterona, a través del PR, actua inhibint el creixement cel·lular i la invasivitat del carcinoma endometrial mitjançant l'inactivació de les molècules d'adhesió [323].

Saito i col·laboradors van analitzar l'estat de metilació d'E-cadherina en diferents teixits endometrials, observant que la metilació del gen *E-cadherina* està associada a l'adquisició de les capacitats invasives del tumor endometrial [197]. Alhora van comprovar que en moltes mostres de carcinoma i hiperplàsia endometrial es donava l'expressió i localització errònia de les connexines, proteïnes estructurals que també participen en les unions cèl·lula-cèl·lula. Aquest fet indica que la pèrdua de connexió cèl·lula-cèl·lula durant la carcinogènesi endometrial es dona en els estadis primerencs [324].

En referència a d'altres membres de la família de les cadherines, s'ha observat que els carcinomes endometrials més agressius presenten elevada expressió de P-cadherina i que el canvi d'expressió de E-cadherina a P-cadherina pot ser utilitzat com a factor pronòstic [325,326]. Alhora també s'ha observat una disminució en els nivells de la proteïna N-cadherina quan es comparen endometris normals amb adenocarcinomes endometrials [327].

β-catenina

Aquesta proteïna, ja mencionada anteriorment com una de les alteracions moleculars observades en el carcinoma endometrial endometriode, és important en la unió cèl·lula-cèl·lula, mitjançant el complex amb E-cadherina, i la senyalització cel·lular ja que forma part de la via *Wnt*. Es troba mutada en el 20% dels casos de carcinoma endometriode [328,308]. Les mutacions en β-catenina resulten en la seva acumulació en el citoplasma, posteriorment migra al nucli on s'uneix i activa membres de la família de factors de transcripció TCF/LEF-1 (factor de cèl·lules T/factor d'unió a limfòcits) [329] així com d'altres gens diana (Figura 13).

Ezrin

Aquesta és una proteïna del citoesquelet que, mitjançant la interacció amb E-cadherina i β-catenina, està implicada en la unió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula matriu. Alhora pot tenir un paper important en el control de l'adhesió i invasivitat de les cèl·lules tumorals [330]. S'ha observat que en les lesions precursors del carcinoma endometrial i en l'adenocarcinoma, Ezrin es troba sobreexpressada [331]. Estudis més recents han demostrat que l'augment d'expressió d'ezrin en el EEC correlaciona amb una disminució en la supervivència [332] (Figura 13).

3.1.2. Vies de senyalització alterades durant la invasió en el carcinoma endometrial

Implicació de PTEN

Com ja s'ha mencionat anteriorment el supressor tumoral *PTEN* és el gen més freqüentment alterat en el carcinoma endometrial. Prop del 80% dels EEC presenten pèrdua d'expressió de *PTEN* degut a mutacions [156] o a LOH [333].

PTEN, mitjançant la seva activitat fosfatasa, està implicat en la inhibició de la formació dels contactes focals, la disseminació i migració cel·lular, així com la inhibició de la senyalització via *MAPK* (Figura 13). Per tant, la pèrdua de l'activitat fosfatasa de *PTEN* resulta en un creixement cel·lular descontrolat, les cèl·lules escapen de l'apoptosi així com inicien la migració i disseminació [152].

Estudis realitzats per Uegaki K i col·laboradors demostren que *PTEN*, *p-Akt*, *p27* i *β-catenina* estan implicats en la via de senyalització de la inhibició dels contactes i suggereixen que *PTEN* pot estar, en part, controlant la proliferació de les cèl·lules del carcinoma endometrial a través de la inducció de la inhibició dels contactes [334].

Implicació de K-Ras

S'ha descrit que al voltant del 10-30% dels EEC presenten mutacions de l'oncogèn *K-Ras* [227]. *K-Ras* està implicat en l'activació de factors de transcripció via *MAPK*, com *Snail* i *Slug*, que estan implicats en la EMT (Figura 13). Alhora afecta l'activitat de les dues GTPases Rac i Rho possiblement via PI3K. Aquestes dues molècules també participen en la EMT regulant les unions adherents, les fibres d'actina i per tant, regulant la motilitat i dispersió cel·lular [335].

Implicació de TGF-β

Ha estat descrit que en el carcinoma endometrial en estadis primerencs, la inactivació de la senyalització mediada per *TGF-β* permet fugir del control del creixement normal de les cèl·lules [336,337]. Estudis realitzats per Piestrzeniewicz-Ulanska i col·laboradors proposaven que l'augment d'expressió del receptor tipus II de *TGF-β* i de *SMAD4* juntament amb la presència de invasió miometrial podia augmentar la capacitat de les cèl·lules neoplàsiques endometrials a metastatitzar [338] (Figura 13).

D'altra banda, durant la invasió miometrial es dona un augment en l'activitat gelatinasa regulat per *TGF-β* [339]. Per tant, *TGF-β* podria comportar-se com a supressor tumoral en els estadis primerencs i com promotor tumoral en els estadis tardans del carcinoma endometrial.

3.1.3. Factors de transcripció relacionats amb la invasió miometrial

Durant el procés d'invasió miometrial s'ha descrit la participació de diversos factors de transcripció:

1) **HOXA10**: és un gen que controla l'organogènesi uterina durant el desenvolupament embrionari i la diferenciació endometrial durant l'època adulta. Yoshida i col·laboradors van descriure que *HOXA10* regula l'expressió de *E-cadherina* i que la disminució d'expressió de *HOXA10* pot contribuir en la progressió del carcinoma endometrial mitjançant l'activació d'EMT (Figura 13). Aquesta ruta probablement aniria mediada per la metil·lació del promotor de *HOXA10* i la supressió de l'expressió del factor de transcripció *Snail* [340].

2) **Twist**: és un factor de transcripció de la família bHLH que indueix EMT. Es troba molt associat a invasió miometrial juntament a la disminució de l'expressió de E-cadherina [341] (Figura 13).

3) **ERM/ETV5**: és un factor de transcripció de la família Ets que ha estat associat a l'activació de proteases degradadores de la matriu extracel·lular [342] (Figura 13). ERM/ETV5 i els seu mecanisme d'acció en el carcinoma endometrial han estat l'objecte d'estudi en aquesta tesi, és per això que es desenvoluparà més extensament en un proper apartat.

4) **AML1/RUNX1**: és un factor de transcripció també sobreexpressat en el carcinoma endometrial [343] i correlaciona amb ERM/ETV5 durant el procés d'infiltració en el carcinoma endometrial [344] (Figura 13).

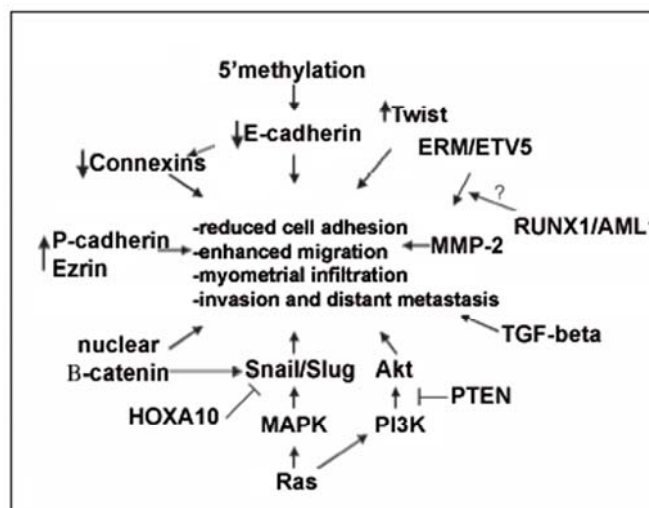


Figura 13. Molècules implicades en la invasió miometrial i metàstasi del carcinoma endometrial [13].

En resum, la invasió miometrial és deguda a un conjunt de processos cel·lulars i a la implicació d'un grup de molècules. Com ha estat citat anteriorment, la infraexpressió de E-cadherina durant la transició epitel·li mesènquima, així com les modificacions en la resta de molècules implicades en els contactes cel·lula-cel·lula, aporta a les cèl·lules el fenotip migrador. A més, en el procés d'invasió miometrial també hi ha implicació de rutes de senyalització alterades i

factors de transcripció. Des d'un punt de vista clínic, és important la cerca de nous marcadors que permetin caracteritzar els esdeveniments inicials de la disseminació tumoral, així com el desenvolupament de noves teràpies dirigides contra aquestes cèl·lules tumorals disseminades i les micrometàstasis generades.

4. El factor de transcripció ETV5 i la seva implicació en el carcinoma endometrial

La regulació de l'expressió gènica és controlada a través de l'acció combinada de múltiples factors de transcripció, els quals actuen activant o reprimint la transcripció de gens diana. És important identificar els promotors del gens diana que són regulats pels factors de transcripció per així determinar els mecanismes moleculars que controlen la transcripció. A més, la identificació dels promotors dels gens diana de factors de transcripció amb característiques normals o oncogèniques permet conèixer els gens implicats en el creixement normal de les cèl·lules, la diferenciació i, evidentment, els gens implicats en els processos metastàtics.

4.1. La família Ets

Aquesta família de 30 proteïnes comparteixen el domini ETS [345] i és el que permet a aquests factors de transcripció unir-se a una seqüència única del DNA GGAA/T anomenada seqüència EBS ("Ets binding site") [346]. Les seqüències situades a ambdós costats de la seqüència EBS és el que determina l'especificitat d'unió per a cada membre de la família Ets [347,348]. Les proteïnes que pertanyen a la família Ets poden actuar com a reguladors positius o negatius en l'expressió de gens implicats en el control de la proliferació cel·lular, diferenciació, desenvolupament, hematopoesi, apoptosi, metàstasi, remodelació tissular, angiogènesi i transformació (Figura 14). A part de la seva importància en el control del funcionament normal de la cèl·lula, les proteïnes de la família Ets també han estat implicades en processos malignes. Per exemple, els gens Ets, *FLI1*, *TEL* i *ERG* formen proteïnes quimèriques responsables de tumorogènesi [349]. A més també s'ha trobat la sobreexpressió dels factors Ets [350,351,344] o la seva pèrdua [352] durant el desenvolupament del càncer.

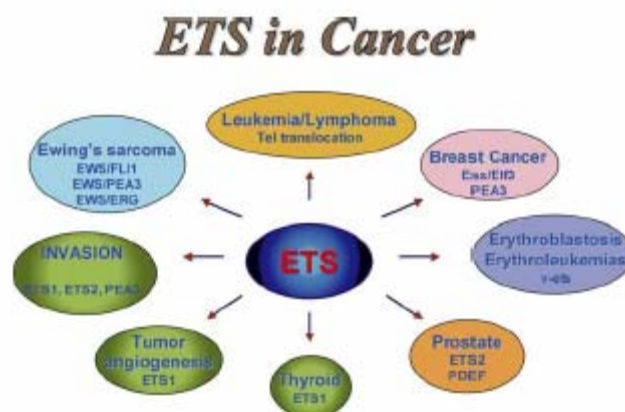


Figura 14. Implicació dels factors de transcripció ETS en càncer [14]

Els membres d'aquesta família de factors de transcripció es classifiquen en grups segons la seqüència del domini Ets, la posició del domini en la proteïna i la presència d'altres dominis funcionals conservats. Els 13 grups que s'identifiquen són: ETS, TEL, YAN, SPI, ERG, PEA3, ELF, DETS4, ELK, GABP, ER71, ERF i ESE [353].

4.1.1. Els gens *ETS* en càncer

La importància dels gens *ETS* en la carcinogènesi humana ha estat demostrada per l'alteració dels patrons d'expressió dels gens *ETS* degut a amplificació o deleció cromosòmica, o bé translocacions o trencaments observats en leucèmies i tumors sòlids. L'activació oncogènica pot donar-se per varis mecanismes incloent amplificació i/o sobre-expressió, activació degut a la inserció de noves seqüències reguladores, fusió amb altres proteïnes degut a translocacions cromosòmiques o bé mutacions puntuals [354,355,356]. Per exemple, la translocació del gen *Fli1* al locus *EWS* en el sarcoma de Ewing dona lloc a una proteïna quimèrica amb major potencial com a factor de transcripció. Altres exemples, *Ets2* es troba sobre-expressat en càncer de pròstata i mama i aquesta sobre-expressió és necessària per a la transformació de les cèl·lules cancerígenes. Alhora, *Ets1* és un indicador pronòstic negatiu [348].

Els gens *ETS* també han estat implicats en els processos d'invasió, angiogènesi i supressió tumoral. Com ja ha estat mencionat anteriorment, EMT és imprescindible per a que les cèl·lules tumorals esdevinguin invasives i metastàtiques. Gens diana de *Ets*, com les MMPs i d'altres proteases, són responsables de l'activació d'enzims imprescindibles per a la dissolució dels components de la matriu extracel·lular. D'altra banda, s'ha demostrat que l'expressió dels factors *ETS1*, *ERG* i *FLI1* correlaciona amb la incidència d'angiogènesi durant el desenvolupament normal i tumoral [357]. Els tumors sovint produeixen VEGF, el qual induïx la producció de *ETS1* per les cèl·lules endotelials durant la neovascularització [358]. Estudis recents descriuen el paper dels factors *ETS* com a supressors tumorals. La majoria dels carcinomes humans tenen un origen epitelial. Un subgrup de factors *ETS* (*ESE1*, *ESE2*, *ESE3* i *PDEF*) s'expressen en teixits epitelials com mama, pròstata i colon, teixits susceptibles a desenvolupar càncer. Aquests estudis indiquen l'infraexpressió d'alguns dels membres d'aquest subgrup durant la tumorigènesi.

D'entre els múltiples gens diana de la família *Ets* que són importants per a la progressió tumoral es troben els que controlen la proliferació cel·lular (ciclins i *cdks*), adhesió (caderines, integrines, molècules d'adhesió cel·lular), motilitat i migració (vimentina), supervivència cel·lular (*Bcl-2*), invasió (*iPA*, MMPs, *TIMPs*), extravasació (MMPs, integrines), micrometàstasis i establiment i manteniment de metàstasis a distància i angiogènesi (integrina $\beta 3$, VEGF) [359,348].

4.2. La subfamília PEA3

Aquest grup està compost per 3 membres: ERM/ETV5, Er81 (o ETV1) i Pea3 (o E1Af o ETV4) [360,361,362] els quals comparteixen el domini ETS (amb una semblança de més del 95%) i dos dominis de transactivació, un col·locat en l'extrem n-terminal i l'altre situat en l'extrem c-terminal (amb una semblança de més d'un 85%) [363].

Com en els altres membres de la família Ets, és improbable que aquests factors de transcripció actuïn sols en la regulació de la transcripció dels seus gens diana. De fet interaccionen amb d'altres proteïnes fent que, com a complexes, puguin actuar [364,365]. Així, per exemple, ETV5 interacciona amb les proteïnes TAF_{II}60, TBP i TAF_{II}40 [366]. També interacciona amb el receptor d'andrògens, el qual media la repressió de la transactivació d'ETV5 [364]. La proteïna c-Jun, membre del complex AP1, també interacciona amb ETV5 per augmentar la transcripció [367].

A més, els membres de la família PEA3, com molts altres factors de transcripció, necessiten de modificacions post-traduccionals que regulin la seva activitat. La modificació més habitual dels membres PEA3 és la fosforilació de serines i treonines, ja que són diana de la via MAPK [368]. ERM/ETV5 i Er81 són fosforilades també a través de la via de PKA [369]. Les modificacions post-traduccionals en lisines són també d'especial importància en la regulació de la transcripció [370].

Com ja s'ha mencionat anteriorment, els membres de la subfamília PEA3 s'expressen durant els processos de remodelació, diferenciació i proliferació cel·lular. És per això que és important conèixer quins són els seus gens diana. Existeixen alguns autors que relacionen aquests factors de transcripció amb la regulació de les proteases degradadores de matriu extracel·lular (MMP) les quals estan implicades en la remodelació de la matriu extracel·lular, fet important en la metàstasi. Ha estat descrita la presència d'elements d'unió a membres de la família ETS en tots els promotors induïbles de metal·loproteases de matriu MMPs [371]. A més, s'ha descrit un paper del membre ETS-1 com a regulador de l'expressió de les proteases MMP-1, MMP-3, MMP-9, del plasminogen tipus uroquinasa (uPA), així com del factor de creixement vascular endotelial (VEGF) i del seu receptor, fet que el relaciona amb l'angiogènesi, la migració cel·lular i la invasió tumoral associada a l'increment de l'activitat proteolítica de les cèl·lules tumorals invasores [356]. L'expressió d'un membre de la família PEA3, *ETV4* ha estat correlacionada amb la sobreexpressió d'MMP-1 i la progressió del càncer colorectal [372].

Existeixen varis estudis que relacionen l'expressió de ERM/ETV5, Er81 i Pea3 amb processos carcinogènics del tracte gastrointestinal [373], pulmó [374], ovari [375], mama [376] i, descrit més recentment pel nostre grup, endometri [344].

En resum, els membres de la subfamília PEA3 són factors de transcripció de la família Ets que tenen un paper important en els processos tumorals, en particular regulen l'expressió de gens implicats en metàstasi i proliferació.

4.3. El gen *ERM/ETV5*

El gen *ETV5* també anomenat ERM pertany a la subfamília PEA3 de factors de transcripció ETS. El gen humà consta de 14 exons distribuïts al llarg de 65 kd de DNA genòmic. Estudiant les parts del gen es poden diferenciar dos dominis funcionals principals, el domini acídic o de transactivació i el domini ETS o d'unió al DNA. Aquests dos dominis es troben, cadascun, codificats per tres exons diferents. La regió 3' no traduïda d'*ERM/ETV5* consta de 2.1 kb, mentre que la regió 5' consta de 0.3 kb; això permet que la transcripció d'*ERM/ETV5* generi un transcrit de 4 kb.

El gen *ERM/ETV5* humà es troba localitzat a la regió 28 del braç llarg del cromosoma 3 [377]. *ERM/ETV5* codifica el factor de transcripció *ERM/ETV5* que es troba implicat en processos de desenvolupament, però el seu rol específic al llarg d'aquest procés no està clar.

ERM/ETV5, a part de jugar un rol en processos de desenvolupament, també ha estat relacionat amb l'oncogènesi degut a fenòmens de sobreexpressió, mutació o translocació. Com ja s'ha mencionat anteriorment, hi ha constància de la relació entre la subfamília PEA3 i l'oncogènesi mamària. S'ha observat sobreexpressió d'aquest gen en diversos tumors mamaris, així com en tumors mamaris induïts [378,379].

4.4. *ERM/ETV5* en el carcinoma endometrial

Finalment, membres de la família ETS han estat relacionats amb la malignitat en el carcinoma endometrial. En concret, la sobreexpressió del gen *Elf-1* es relaciona amb el potencial maligne del carcinoma endometrial [380,381].

Estudis recents realitzats en el nostre grup han demostrat la sobreexpressió del gen *ERM/ETV5* en el carcinoma endometrial endometriode a través del procés tumorogènic. Els resultats de l'estudi d'hibridació dels *microarrays* de cDNA el situaven com al gen amb major sobreexpressió en condicions tumorals [343]. Els resultats obtinguts van ser validats per RT-Q-PCR utilitzant un panell de mostres que cobrien des de l'estadi IA en que no hi ha invasió fins a estadis metastàtics IIIA, suggerien que *ERM/ETV5* es troba sobreexpressat en els estadis inicials del desenvolupament del carcinoma endometrial i es troba associat a l'estadi IC, on més del 50% del miometri presenta infiltració. Aquests resultats van ser validats mitjançant immunohistoquímica sobre array de teixit (TMA) utilitzant mostres que cobrien tot el procés tumorogènic, observant-se la sobreexpressió de *ERM/ETV5* a mida que el carcinoma avança des de l'endometri atròfic a carcinoma, passant per la hiperplàsia simple i complexa [344] (Figura 15).

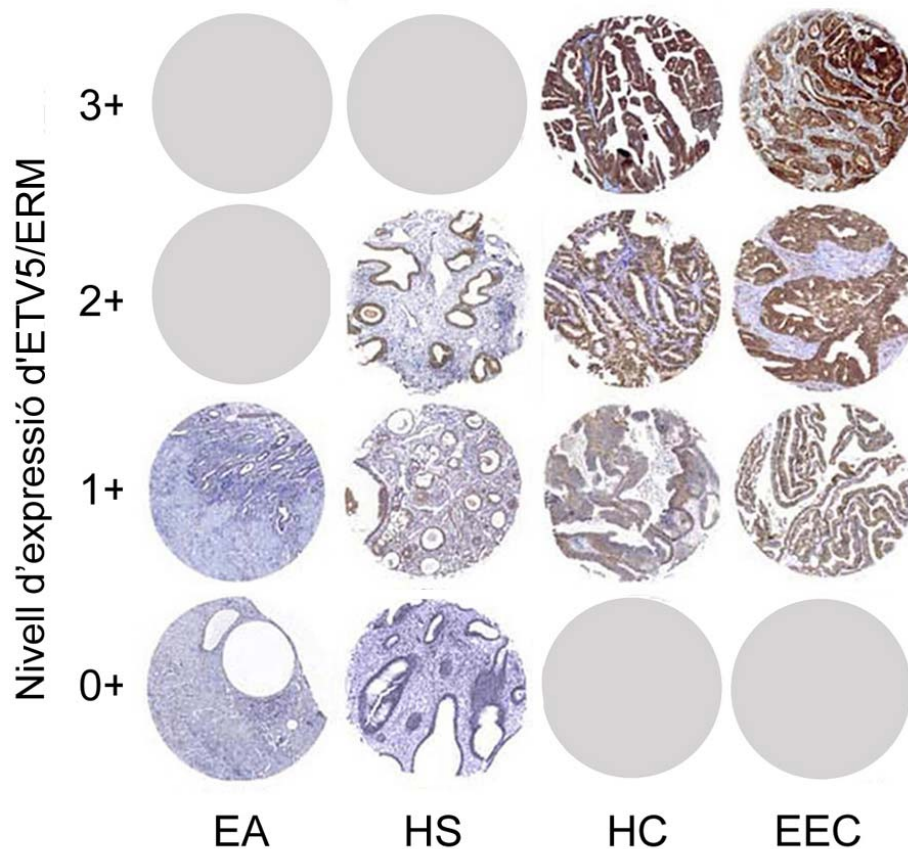


Figura 15. Imatge dels punts dels TMAs amb marcatge d'ETV5/ERM: composició d'imatges de punts dels diferents *arrays* de teixit. La imatge mostra el nivell d'expressió proteica d'ETV5/ERM en cadascun dels teixits: endometri atròfic EA (0-1), hiperplàsia simple HS (0-2), hiperplàsia complexa HC (1-3) i carcinoma endometrial endometriode EEC (1-3). Els cercles grisos representen els nivells d'expressió no existents [344]

Aquests resultats van permetre proposar un paper important d'ERM/ETV5 durant els estadis inicials de la tumorigènesia endometrial, el qual podria estar associat al punt d'inici de la infiltració miometri, i han estat el punt de partida d'aquesta tesi doctoral.

Objectius

OBJECTIUS

1. Caracterització del mecanisme d'acció de ERM/ETV5 durant els estadis inicials de la tumorigènesi endometrial associats al punt d'inici de la infiltració miometrial.

1.1. Estudi de l'activitat gelatinasa associada a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A.

1.2. Estudi de la interacció específica del factor de transcripció ERM/ETV5 amb el promotor de la metal·loproteasa MMP-2, així com dels efectes en la capacitat migratòria de les cèl·lules degudes a la sobreexpressió de ERM/ETV5 a través de l'activitat gelatinolítica de MMP-2.

1.3. Anàlisi de l'associació entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i l'activitat gelatinolítica de MMP-2 en un model de ratolins ortotòpic de carcinoma endometrial. Estudi del patró d'invasió observat en els tumors generats mitjançant les cèl·lules de carcinoma endometrial Hec-1A, Hec-1A GFP i Hec-1A GFP-ERM/ETV5.

1.4. Validació de la relació entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i l'activitat gelatinasa de MMP-2 en mostres humanes de carcinoma endometrial.

2. Caracterització dels mecanismes moleculars associats a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en la tumorigènesi endometrial.

2.1. Anàlisi diferencial dels perfils proteics associats a la sobreexpressió del factor de transcripció ERM/ETV5.

2.2. Estudi dels processos biològics i interaccions gèniques alterades degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 mitjançant el software Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

2.3. Estudi de la relació entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i la inducció de l'expressió de la proteïna Hep27, així com de la seva localització cel·lular i implicació en la protecció enfront l'estrès oxidatiu.

3. Aproximació proteòmica per a caracteritzar components específics del front d'invasió o l'estroma reactiu mitjançant la comparació de l'àrea invasiva del tumor anvers el tumor superficial i el teixit normal provinents de la mateixa pacient.

Informe del director

INFORME DEL DIRECTOR DEL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS

ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through MMP-2 activation in endometrial cancer. Marta Monge, Eva Colas, Andreas Doll, Marta Gonzalez, Antonio Gil-Moreno, Jesús Planagumà, Maite Quiles, Maria Antònia Arbos, Àngel Garcia, Josep Castellví, Marta Llaurodo, Marina Rigau, Hafid Alazzouzi, Jordi Xercavins, Francesc Alameda, Jaume Reventos and Miguel Abal. *Cancer Research* 2007 67(14):6753-9.

Factor d'impacte: 7.672

Informe del director per a especificar la participació de la doctoranda Marta Monge i Azemar en la realització del treball de la qual és co-primera autora:

- Clonatge del factor de transcripció ERM/ETV5 en fusió amb la proteïna verda fluorescent (GFP), en vectors d'expressió.
- Generació de cultius cel·lulars estables en la línia Hec-1A que sobreexpressen les diferents construccions.
- Caracterització de l'expressió de les proteïnes sobreexpressades mitjançant western blot i immunofluorescència.
- Estudis d'activitat enzimàtica gelatinasa mitjançant tècniques de zimografia en les línies cel·lulars generades, mitjançant fluorimetria en tumors generats en models animals a partir de les línies establertes, i mitjançant microscopia de fluorescència en mostres humanes de carcinoma d'endometri.
- Anàlisi dels llocs Ets en el promotor de MMP-2, i validació de la unió de ERM/ETV5 a aquest promotor mitjançant immunoprecipitació de cromatina.
- Caracterització de l'expressió de ERM/ETV5 i MMP-2 en mostres de pacients mitjançant immunohistoquímica en arrays de teixit de càncer d'endometri.
- Tractament estadístic de les dades obtingudes en els diferents assajos.
- Definició d'estratègies experimentals, posta a punt de les tècniques emprades, discussió de resultats, i elaboració del manuscrit.

Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress. Marta Monge, Andreas Doll, Eva Colas, Antonio Gil-Moreno, Josep Castellví, Berta Diaz, Marta Gonzalez, Jordi Xercavins, Francesc Alameda, Francesc Canals, Franco Gabrielli, Jaume Reventos and Miguel Abal. *Carcinogenesis (en revisió)*.

Factor d'impacte: 5.406

Informe del director per a especificar la participació de la doctoranda Marta Monge i Azemar en la realització del treball de la qual és co-primera autora:

- Clonatge del factor de transcripció ERM/ETV5 en fusió amb la proteïna verda fluorescent (GFP), en vectors d'expressió.
- Generació de cultius cel·lulars estables en la línia Hec-1A que sobreexpressen les diferents construccions.
- Anàlisi proteòmic mitjançant tecnologia DIGE: preparació de les mostres, electroforesi bidimensional amb marcatge fluorescent i anàlisi comparatiu i quantificació estadística mitjançant l'ús del software DeCyder v6.0.
- Identificació proteica per espectrometria de masses MALDI-TOF.
- Anàlisi funcional de les proteïnes sobre- o infraexpressades mitjançant el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA).
- Validació dels resultats obtinguts mitjançant western blot i immunofluorescència.
- Caracterització de l'expressió de la proteïna Hep27 mitjançant western blot, fraccionament cel·lular i immunofluorescència.
- Validació de la localització de la proteïna Hep27 en tumors generats en models animals a partir de les línies establertes així com mostres humanes de carcinoma d'endometri mitjançant immunohistoquímica.
- Anàlisi dels llocs Ets en el promotor de Hep27, i validació de la unió de ERM/ETV5 a aquest promotor mitjançant immunoprecipitació de cromatina.
- Estudis d'estrès oxidatiu en les línies cel·lulars establertes.
- Tractament estadístic de les dades obtingudes en els diferents assajos.
- Definició d'estratègies experimentals, posta a punt de les tècniques emprades, discussió de resultats, i elaboració del manuscrit.

Proteomic approach to endometrial carcinoma invasion front. Marta Monge, Andreas Doll, Eva Colas, Antonio Gil-Moreno, Josep Castellví, Àngel Garcia, Núria Colome, Assumpció Perez-Benavente, Núria Pedrola, Xavier Dolcet, Santiago Ramon y Cajal, Jordi Xercavins, Xavier Matias-Guiu, Francesc Canals, Jaume Reventos and Miguel Abal. *Molecular & Cellular Proteomics (en revisió)*.

Factor d'impacte: 9.425

Informe del director per a especificar la participació de la doctoranda Marta Monge i Azemar en la realització del treball de la qual és co-primera autora:

- Recollida de mostres provinents de l'Hospital Universitari Vall Hebrón (Barcelona) i l'Hospital Arnau de Vilanova (Lleida).
- Anàlisi proteòmic mitjançant tecnologia DIGE: preparació de les mostres, electroforesi bidimensional amb marcatge fluorescent i anàlisi comparatiu i quantificació estadística mitjançant l'ús del software Progenesis SameSpots v2.0.
- Identificació proteica per espectrometria de masses MALDI-TOF.
- Anàlisi funcional de les proteïnes sobre- o infraexpressades mitjançant el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA).
- Validació dels resultats obtinguts mitjançant western blot.
- Estudi de la presència i relació amb estrès oxidatiu de la proteïna BLVRB en el front de migració d'una monocapa de cèl·lules de carcinoma endometrial sotmeses a ferida i tractament amb antioxidant mitjançant immunofluorescència.
- Validació de la presència de la proteïna BLVRB en el front d'invasió en talls de carcinoma endometrial humà mitjançant immunohistoquímica.
- Tractament estadístic de les dades obtingudes en els diferents assajos.
- Definició d'estratègies experimentals, posta a punt de les tècniques emprades, discussió de resultats, i elaboració del manuscrit.

Resum Global

RESUM GLOBAL

El càncer d'endometri és la malaltia ginecològica més comuna i representa la quarta neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats després del càncer de mama, colorectal i pulmó [19]. Actualment, i bàsicament gràcies a l'aparició de simptomatologia com la metrorràgia, és possible diagnosticar el 80% dels casos de EEC en estadiatge I F.I.G.O. i per tant, poder aplicar cirurgia i presentar un bon pronòstic. Com ja s'ha mencionat anteriorment, l'estadiatge I F.I.G.O. inclou tres subtipus determinats en funció de l'afectació de l'endometri (estadi IA) i la presència d'infiltració miometrial, estadi IB quan l'afectació és menor al 50%, i estadi IC quan l'afectació supera el 50% [8]. Aquest últim grup correspon a les pacients amb major risc de recurrència després d'aplicar cirurgia i que, per tant, els cal aplicar un tractament adjuvant, basat quasi exclusivament en radioteràpia i quimioteràpia. Durant els darrers anys s'ha aprofundit en el diagnòstic i pronòstic del carcinoma endometrial, però ha estat clara la necessitat d'aprofundir en els aspectes genètics i els successos moleculars associats al procés tumorogènic del carcinoma endometrial.

Per aquest motiu el nostre grup es va centrar en la identificació de nous gens implicats en el EEC. La recerca plantejada va ser l'estudi dels patrons d'expressió gènica diferencial entre el teixit endometrial sa, hiperplàsic i tumoral, així com la cerca de nous gens associats al fenotip carcinomatós endometrial amb potencial valor diagnòstic i/o pronòstic. Mitjançant l'ús de microarrays de cDNA i comparant mostres de pacients amb carcinoma endometrial endometriode en diferents estadis anvers mostres d'endometri proliferatiu normal i endometri atròfic, es va trobar que els dos gens majorment sobreexpressats eren RUNX1/AML1 i ERM/ETV5 i a més, aquests dos gens es troben sobreexpressats en l'adenocarcinoma endometrial endometriode, concretament en la fase en la qual el carcinoma esdevé invasiu. Aquests resultats són un exemple de la necessitat de continuar en l'anàlisi genètic i molecular per a identificar els esdeveniments que es donen durant el procés tumorogènic, i ja concretament els esdeveniments que s'estan donant en l'inici de la invasió miometrial.

Partint d'aquest coneixement, ens vam plantejar la caracterització del mecanisme d'acció del factor de transcripció ERM/ETV5 en el carcinoma endometrial endometriode, i aportar les claus dels esdeveniments inicials d'invasió i disseminació del carcinoma endometrial. La possibilitat de conèixer els mecanismes moleculars en EEC associats a l'inici de la invasió tumoral representaria una millora clara en la cerca de dianes implicades en la metàstasi. Alhora, tot aquest coneixement seria de gran utilitat per a poder classificar les pacients, ja que l'afectació miometrial determina un augment en l'índex de recidives després d'un primer tractament quirúrgic i una disminució de la supervivència després de cinc anys.

És per això que el primer plantejament dut a terme tenia per objectiu caracteritzar la possible activitat gelatinasa associada a la sobreexpressió de ERM/ETV5 durant els estadis inicials de la tumorogènesi endometrial associats al punt d'inici de la infiltració miometrial. Kaya i col·laboradors destaquen que la progressió tumoral i l'augment d'expressió de proteases

degradadores de matriu extracel·lular (MMP) es troben molt relacionades amb la capacitat invasiva que confereixen els factors de transcripció de la família Ets [387]. Concretament, en el seu estudi, determinen que la sobreexpressió del factor de transcripció E1AF en una línia cel·lular de càncer de mama indueix major activitat migratòria i invasiva a les cèl·lules, juntament amb un augment en l'expressió de MMP-9. Més tard es va descriure que la presència de gelatinases actives en el carcinoma endometrial resulta en alteracions del microambient que promou la invasió tumoral i metàstasi [381,342].

Amb aquests precedents, en un primer moment vam demostrar que la sobreexpressió del factor de transcripció ERM/ETV5 en la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A, resultava en un augment de l'activitat gelatinasa. La metal·loproteasa-2 (MMP-2) és un enzim amb activitat gelatinasa responsable de la degradació dels dominis hèlix del col·lagen tipus IV, aquest és el principal component de la membrana basal. Ha estat descrit que els promotors induïbles de les MMP presenten elements conservats PEA3, els quals són punt d'unió dels factors de transcripció de la família Ets, on s'inclou ERM/ETV5 [371]. Coneixent aquests antecedents i a partir dels resultats que teníem, mitjançant immunoprecipitació de cromatina vam poder demostrar la unió específica del factor de transcripció ERM/ETV5 a la regió promotora de MMP-2 en la línia cel·lular estable Hec-1A GFP-ERM/ETV5. A continuació, utilitzant un model ortotòpic de càncer d'endometri en ratolins nuus realitzat en el nostre laboratori vam confirmar la correlació existent entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i l'activitat gelatinasa de MMP-2. La sobreexpressió de ERM/ETV5 va resultar en l'augment tant dels nivells de MMP-2 com de la seva activitat proteolítica. Finalment, aquest resultat van ser traslladats a mostres humanes. Utilitzant un TMA amb més de 70 mostres representatives del procés tumorigènic en el EEC, es va observar una correlació significativa entre l'expressió proteica de ERM/ETV5 i MMP-2 en les glàndules epitelials. D'acord amb aquests resultats, recentment ha estat publicat que l'expressió de MMP-2 pot ser utilitzada com a valor predictiu per als carcinomes endometrials en estadi I [391]. A més, els experiments de zimografia *in situ* sobre seccions tissulars de carcinoma endometrial humà en estadi IC, mostraven que aquest augment d'expressió proteica de MMP-2 es corresponia amb l'augment de l'activitat gelatinolítica de la proteïna i que aquesta es localitza en les glàndules epitelials, on ja anteriorment, en el nostre grup, s'havia descrit que ERM/ETV5 es troba sobreexpressat [344]. Existeix una altre gelatinasa, MMP-9 la qual ha estat associada amb infiltració inflamatòria [392,393]. El fet que en les mostres del EEC utilitzades per l'estudi no existeixi infiltració inflamatòria suggereix que l'activitat gelatinolítica observada en la zimografia *in situ* és deguda a l'activitat de MMP-2. Els resultats obtinguts en aquest treball estan en línia amb d'altres estudis que correlacionen l'expressió de membres de la família Ets amb gens implicats en la remodelació de la matriu extracel·lular. Per exemple, Nerlov i col·laboradors van descriure que Ets-1 controla l'expressió del promotor de dues metal·loproteases, stromelisin-1 (o MMP-3) i col·lagenasa-1 (o MMP-13) i també del promotor de l'activador de plasminogen uPA [396]. Alhora, també s'ha descrit que en el carcinoma hepàtic Ets-1, induït pel factor de creixement hepàtic, estimula la sobreexpressió de MMP-7 [397]. ETV4 un altre membre dels factors de transcripció de la família Ets, està implicat en la

progressió tumoral del carcinoma colorectal i gàstric a través de la inducció de l'expressió de MMP [372]. De totes maneres, no s'ha trobat cap mena de correlació entre l'expressió de ERM/ETV5 i l'activitat MMP en aquests dos tipus de carcinomes.

Amb la intenció d'anar una mica més enllà i analitzar el significat de la correlació entre l'expressió de ERM/ETV5 i l'activitat gelatinolítica en el carcinoma endometrial, vam poder descriure un nexa funcional entre la sobreexpressió de ERM/ETV5, causant d'un augment de la motilitat i dispersió de les cèl·lules, i l'augment de l'activitat gelatinolítica, causant de la modificació de la interfase cèl·lula-substrat. Per a determinar l'efecte específic de ERM/ETV5 mediat per MMP-2, vam utilitzar tant RNA d'interferència envers la proteïna de fusió com un inhibidor específic de l'activitat gelatinasa i vam ser capaços de revertir l'efecte dispersador causat per la sobreexpressió de ERM/ETV5. D'acord amb aquests resultats, Hahne i col·laboradors van descriure que la sobreexpressió de Ets-1 en cèl·lules epitelials tumorals HeLa resultava en un augment de la motilitat [398]. A més, es va descriure que Ets-1 està implicat en la migració i invasió tumoral, resultat que correlaciona amb un augment de l'activitat proteolítica de les cèl·lules cancerígenes invasores [356].

De manera semblant, ETV4 s'ha descrit implicat en el potencial invasiu de línies cel·lulars tumorals com neuroblastoma [399], cèl·lules de carcinoma bucal [400] i carcinoma d'ovari [401]. A més, en el model animal hem mostrat que la capacitat migratòria degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 es tradueix en un patró d'infiltració miometrial més agressiu, amb un perfil infiltrant en el front d'invasió del tumor. La implantació del tumor en el teixit originari és un procés essencial ja que el resultat del procés metastàtic depèn de la interacció de les cèl·lules metastàtiques amb l'ambient dels diferents òrgans [402].

Finalment, la major capacitat invasiva dels tumors ortotòpics generats que sobreexpressen ERM/ETV5 va ser confirmada a nivell de tumorigènesi humana. Planagumà i col·laboradors van caracteritzar la sobreexpressió de ERM/ETV5 en l'estadi IC del EEC, on es dona >50% d'infiltració miometrial [344] i a continuació el nostre estudi ha demostrat un marcat augment de l'expressió de ERM/ETV5 i MMP-2 en el front d'invasió, suggerint que existeix una acció coordinada i activa entre aquestes dues proteïnes en el moment de la invasió miometrial. D'acord amb les dades exposades, havia estat descrit que l'expressió elevada de MMP-2 conjuntament amb un baix nivell de l'inhibidor específic de MMP-2 són dos marcadors de la tumorigènesi endometrial amb elevat risc per a dur a terme disseminació local i a distància [403]. A més, recentment, s'ha descrit que quan MMP-2 s'expressa en cèl·lules tumorals de mama està implicat en la promoció successiva de metàstasis pulmonars [404]. Els resultats exposats ens permeten suggerir que en el EEC, ERM/ETV5 podria actuar a través de MMP-2 per a donar capacitat invasiva associada al punt d'inici de la invasió miometrial. És per això que la possibilitat de conèixer els mecanismes moleculars en EEC associats a l'inici de la invasió tumoral representaria una millora clara en la cerca de dianes implicades en la metàstasi.

En el següent estudi, molt relacionat amb l'anterior, l'objectiu plantejat es centrava en el coneixement de les alteracions moleculars associades a la sobreexpressió del factor de transcripció ERM/ETV5 durant la infiltració miometrial en el carcinoma d'endometri, permetent la identificació de nous marcadors moleculars o dianes terapèutiques que, presumiblement, estarien sota el control de l'activitat transcripcional de ERM/ETV5. És per això que el plantejament es va centrar en l'anàlisi comparatiu dels patrons d'expressió proteica diferencial de la línia cel·lular Hec-1A que sobreexpressa de forma estable la proteïna de fusió GFP-ERM/ETV5 anvers la línia cel·lular sense transfectar i la que presenta el vector GFP buit. Aquest objectiu es va abordar mitjançant l'ús de tècniques proteòmiques, concretament mitjançant electroforesi bidimensional amb marcatge fluorescent (2D-DIGE) i espectrometria de masses.

L'anàlisi proteòmic mitjançant DIGE permet augmentar la detecció i quantificació de les proteïnes diferencials entre les mostres d'un experiment. La inclusió d'un estàndard intern que és representació de totes les mostres presents en l'experiment, ha permès realitzar comparacions més precises i eliminar les diferències intra-gels. La tècnica 2D-DIGE implica el marcatge de les proteïnes de les diferents mostres amb diferents fluorocroms, permetent la comparació de dues mostres diferentment marcades en un mateix gel i que totes les mostres siguin sotmeses a les mateixes condicions tant en la primera com en la segona dimensió, limitant-se així la variació experimental i assegurant-se la màxima coincidència entre els gels de l'experiment (Figura 16).

El fet que dues mostres puguin ser analitzades en un mateix gel, ja que es marquen amb fluorocroms diferents, permet reduir el nombre de gels necessaris per a dur a terme

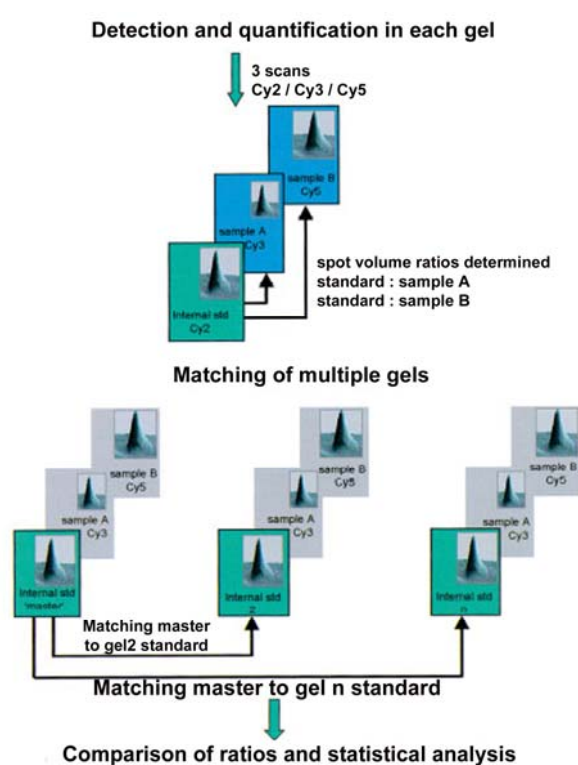


Figura 16. Anàlisi imatge.

L'anàlisi dels spots es duu a terme en parelles. Les dues imatges es solapen perfectament permetent la mesura dels volums dels spots i la normalització amb l'estàndard intern. Les imatges dels standards dels diferents gels de l'experiment es comparen conjuntament i el quocient standard/ mostra permet el càlcul de les diferències significatives. Tot seguit s'aplica un anàlisi estadístic [1].

l'experiment. Realitzar experiments mitjançant 2D-DIGE juntament amb l'ús d'un software d'anàlisi d'imatges adequat permet detectar i quantificar de forma més acurada les diferències d'expressió entre les mostres amb una significació estadística de confiança.

En qualsevol estudi biològic és important aportar valor estadístic als resultats obtinguts, i l'anàlisi proteòmic mitjançant DIGE ofereix aquesta possibilitat a través dels valors de t-test o anova associats a cada una de les diferències proteiques observades. Això ha estat possible gràcies a la introducció de l'estàndard intern en cada un dels gels, ja que permet la normalització dels valors obtinguts i l'eliminació de les diferència inter- i intragels [1].

En aquest treball, hem realitzat una aproximació proteòmica associada a la sobreexpressió de ERM/ETV5 durant la infiltració miometrial en el carcinoma d'endometri. És per això que, mitjançant la tècnica 2D-DIGE vam comparar les tres línies cel·lulars desenvolupades en el treball anterior, Hec-1A, Hec-1A GFP i Hec-1A GFP-ERM/ETV5. Mitjançant MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight) va ser possible identificar prop de cinquanta proteïnes que estarien sota el control de la sobreexpressió de ERM/ETV5. Amb l'objectiu de determinar els processos biològics que estaven alterats degut a la sobreexpressió del factor de transcripció ERM/ETV5, es van carregar les dades gèniques de les proteïnes identificades al software Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Aquest software disposa d'una potent i extensa base de dades i un sistema d'anàlisi per a poder donar explicació a com les proteïnes estan interaccionant per a produir efectes en les cèl·lules o com actuen en vies metabòliques i processos de senyalització cel·lular.

L'anàlisi de les nostres dades ens indicava que la migració cel·lular i l'invasió eren les vies moleculars majorment alterades a través de la senyalització per TGF- β i progesterona i la regulació del citoesquelet. Com ja s'ha mencionat anteriorment, en el nostre grup havia estat descrit que la sobreexpressió de ERM/ETV5 en el carcinoma endometrial correlaciona amb el grau d'infiltració miometrial [344] i en el treball prèviament presentat s'aporten resultats *in vitro* i *in vivo* que demostren que ERM/ETV5 actua a través de MMP-2 per a donar aquesta capacitat invasiva associada al punt d'inici de la infiltració miometrial [405]. Anteriorment s'ha descrit que la progesterona presenta un efecte inhibidor del creixement en el carcinoma endometrial, per tant la progesterona i el seu receptor juguen un paper important en la regulació de les propietats invasives de les cèl·lules del carcinoma endometrial [321]. D'altra banda, també ha estat descrita la reorganització del citoesquelet d'actina durant la migració cel·lular i invasió dels processos tumorigènics [407] així com la sobreexpressió durant la invasió i en cèl·lules tumorals metastàtiques de molècules que estableixen comunicació entre els senyals migratoris i el citoesquelet d'actina [408]. Relacionat amb el citoesquelet d'actina, Gimona i col·laboradors van descriure que és possible localitzar polimerització de filaments d'actina relacionats amb protrusions en la membrana com a resposta a la migració, a estímuls quimotàctics i a la degradació de la matriu extracel·lular per podosomes i invadopodia [409]. Finalment, en el carcinoma endometrial la migració cel·lular depenent d'hormones està relacionada amb el trencament de les fibres d'estrès, l'acumulació d'actina en la perifèria cel·lular i la formació de

lamel·lipodia, filopodia i protuberàncies puntiformes de la membrana [410]. Pel que fa a TGF- β , l'altre eix de senyalització alterat degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A, aquesta és una molècula que pot actuar com a supressor tumoral o com a factor pro-oncogènic, en estadis avançats de la malaltia pot tenir efecte en el tumor i, en les cèl·lules estromals, pot estimular la invasió, angiogènesi i metàstasi i pot inhibir la immunitat responsable de la supervivència [411]. Aquesta evidència dóna suport a la necessitat de cercar noves estratègies terapèutiques contra la senyalització duta a terme per TGF- β per tal d'inhibir la seva activitat com a factor promotor de la tumorogènesi, invasió i metàstasi [412]. En referència a la invasió miometrial del carcinoma d'endometri, s'ha observat que en EEC de tipus I, les alteracions en la senyalització per TGF- β així com la localització de SMADs pot ser important en la infiltració de la paret miometrial [413]. A més, la invasió miometrial implica un augment en l'activitat gelatinasa que en cert punt pot ser regulada per TGF- β 1 de manera autocrina o paracrina [339].

El canvi d'expressió del gens significativament alterats degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A es movia entre 1.3-2.0, fet que representa un canvi d'expressió proteica raonable per a una línia cel·lular que expressa un factor de transcripció de forma estable. De totes maneres, el gen més alterat mostrava una inducció en la seva expressió de fins a 10 vegades en la línia que sobreexpressa ERM/ETV5. Aquesta proteïna corresponia a Hep27, membre de la superfamília d'enzims deshidrogenasa/reductasa de cadena curta (SDR). Els membres d'aquesta superfamília són enzims oxidoreductases dependents de NAD(P)(H). Actuen en el metabolisme de diferents substrats com esteroids, retinoids, prostaglandines, sucres i xenobiòtics. De totes maneres, la seva activitat enzimàtica no es limita a l'oxidoreducció, ja que alguns dels membres de la família també presenten activitat isomerasa o liasa [414].

La proteïna Hep27 va ser identificada per primera vegada en la línia cel·lular d'hepatoblastoma HepG2 [415]. Mitjançant *western blot* vam confirmar la sobreexpressió de Hep27 associada a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en les línies de càncer d'endometri generades, així com la seva localització nuclear i citoplasmàtica com ja havia estat descrit en la línia cel·lular HepG2 [416]. Aprofundint en la localització citoplasmàtica de Hep27, utilitzant un marcador específic del compartiment mitocondrial, vam localitzar Hep27 a la mitocòndria, fet que suggereix que podria tenir un paper durant l'estrès oxidatiu.

De fet, les espècies reactives d'oxigen (ROS) han estat implicades amb la metàstasi tumoral com a mediadors de gens clau en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, transició epitel·li-mesènquima (EMT) i migració [417]. La producció de ROS pot ser induïda intercel·lularment per factors de creixement o citoquines (com TGF- β i HGF) o inductors de la tumorogènesi com TPA, de manera dependent de NADH oxidasa o dependent de mitocòndria [418,419]. Com a molècules senyalitzadores, ROS són capaços d'oxidar molècules diana rellevants per a la invasió tumoral com PKC [420] o proteïnes tirosin-fosfatasa (PTP) [421]. Dues de les molècules regulades *down-stream* per ROS són MAPK i p-21 kinase (PAK). La cascada de la MAPK és la via de

senyalització més important per la seva implicació en la metastasi tumoral, i és mediada per PKC, TGF- β /Smad i la senyalització mediada per integrines [422,423] (Figura 17).

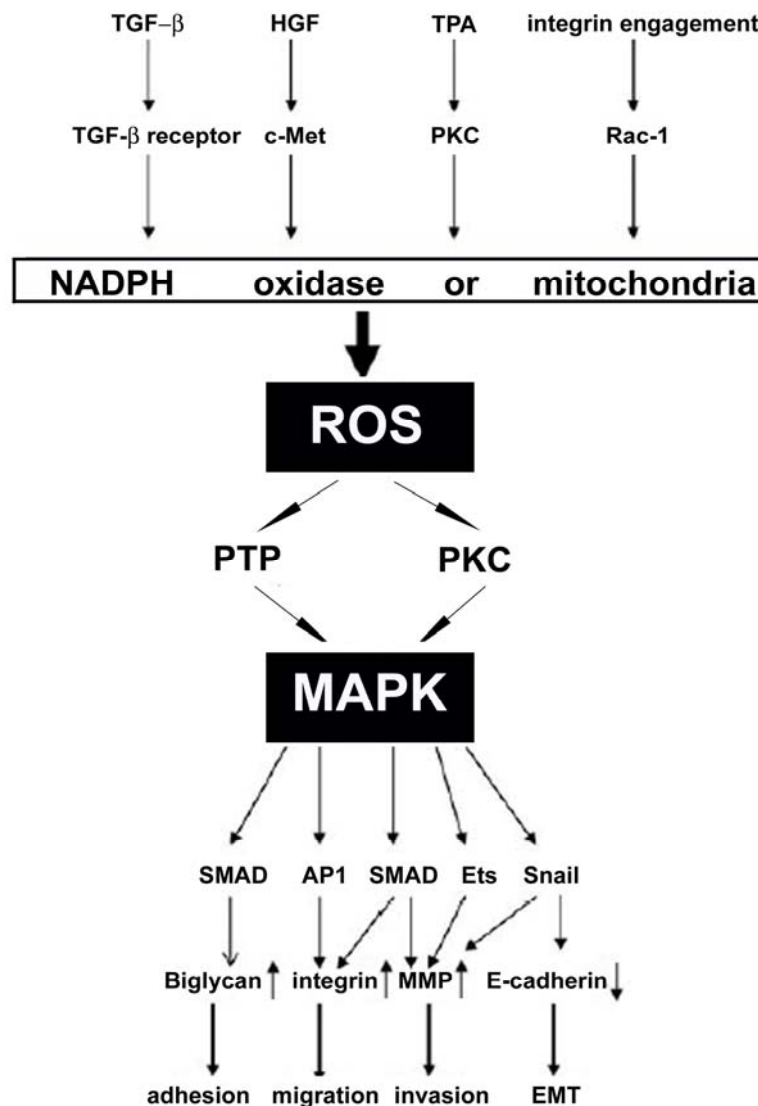


Figura 17. Vies de senyalització alterades per Ros en la progressió tumoral.

De manera alternativa, s'ha demostrat que ROS induïxen apoptosi, arrest del cicle cel·lular i senescència a través del desacoblament de la cadena de transport electrònic del mitocondri i una disminució del potencial de membrana mitocondrial [424]. Com ja s'ha mencionat anteriorment, existeixen varis factors de transcripció, com AP-1, Ets, Smad i Snail, que regulen gens important en la metastasi. AP-1 i Smad, a través de PKC i TGF- β 1, poden ser activats per ROS [425]. D'altra banda, en les cèl·lules tumorals ROS poden ser un factor important en la regulació directa de l'expressió de Ets-1, un altre membre de la família Ets a la qual pertany ERM/ETV5 [426]. S'ha descrit que la regulació de MMP-1 per part de Ets-1 és sensible a l'estat redox [427]. De la mateixa manera, la inducció d'angiogènesi per H_2O_2 s'ha demostrat que ve mediada per Ets-1 [428] (Figura 17). Finalment, també en el síndrome de Down o en

l'Alzheimer [429] o en l'arteriosclerosi induïda per una dieta rica en colesterol [430] s'ha relacionat l'estrès oxidatiu a la sobreexpressió de diversos factors de transcripció Ets. En resum, entendre la senyalització transduccional, l'activació transcripcional i la regulació de l'expressió gènica per ROS ha de permetre comprendre l'important paper de ROS en la progressió tumoral així com la creació de noves estratègies terapèutiques [417].

En aquest sentit, en el nostre estudi, vam demostrar que l'administració de H₂O₂ és capaç d'induir l'augment d'expressió de la proteïna ERM/ETV5 en la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A. En canvi, el tractament amb un antioxidant, implicava una disminució en l'expressió de ERM/ETV5, indicant que la resposta a l'estrès oxidatiu induït era específica. Mitjançant immunoprecipitació de cromatina vam mostrar la regulació de Hep27 a través de la unió directa de ERM/ETV5 al seu promotor, suggerint que aquesta regulació té per objectiu la protecció del mitocondri als efectes citotòxics dels compostos α -dicarbonílics. Aquests compostos són generats durant l'estrès oxidatiu o també es troben formant part de la dieta; poden ser citotòxics causant pèrdua cromosòmica [406] o poden ser processats a AGEs (*advanced glycation endproducts*) que es creu que són causants de patologies complexes, incloent inflamació o els efectes escleròtics detectats en les malalties cròniques [431]. Wilson i col·laboradors, mitjançant anàlisi de microarrays per a identificar possibles dianes del factor de transcripció Ets-1, van descriure la presència d'enzims implicats en la defensa antioxidant a través de l'eliminació dels efectes de l'estrès oxidatiu [432]. D'acord amb Shafqat i col·laboradors, l'augment d'expressió de Hep27 degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 també podria tenir per objectiu protegir les cèl·lules endometrials tumorals situades en el front d'invasió de la producció de ROS, i així mantenir-se el procés migratori i invasiu.

En resum, l'anàlisi de les proteïnes sotmeses al control de ERM/ETV5 en la línia cel·lular Hec-1A reforça el rol d'aquest factor de transcripció en la regulació de la invasió i migració tumoral en el carcinoma endometrial. Més endavant, va ser possible caracteritzar una nova funció per a ERM/ETV5 en la resposta moduladora a l'estrès oxidatiu associat a la promoció de l'invasió.

Amb els resultats obtinguts fins aquest moment ha estat possible la caracterització dels mecanismes moleculars associats a la sobreexpressió de ERM/ETV5 en la tumorigènesi endometrial i la seva clara connexió com a punt d'inici de la infiltració miometrial. Amb aquests antecedents, a continuació vam pretendre caracteritzar els components específics del front d'invasió o l'estroma reactiu mitjançant la comparació de l'àrea invasiva del tumor anvers el tumor superficial i el teixit normal utilitzant mostres de pacients amb EEC estadi IC, en el qual es dona més d'un 50% d'invasió miometrial.

El microambient que envolta el tumor concentra esdeveniments importants que defineixen el procés invasiu, amb l'existència d'una profunda regulació espai-temps entre el tumor i l'estroma que l'envolta, en el que s'anomena front d'invasió. És per això que, durant els últims anys, la invasió tumoral ha esdevingut un terreny en plena activitat d'estudi [433]. Des d'un punt de vista clínic, la invasió tumoral defineix la frontera entre el tumor estrictament delimitat en el teixit i la

presència de cèl·lules tumorals disseminades. El primer implica un bon pronòstic i la possibilitat d'aplicar-ne cirurgia, en canvi el segon, implica mal pronòstic, disminució de la supervivència i opcions terapèutiques basades en la radioteràpia i la quimioteràpia amb un baix percentatge d'èxit. En el cas del carcinoma endometrial, prop del 25% de les pacients que es sotmeten a cirurgia presenten afectació fora de l'úter (afectació limfàtica i d'annexes i metastasi) [250].

Les molècules que actuen durant la invasió no estan restringides a les cèl·lules tumorals que formen part de les glàndules epitelials infiltrants, sinó que en el punt d'inici de la infiltració i disseminació també hi participen l'estroma reactiu que està en contacte directe amb aquestes glàndules, els components inflamatoris activats degut al procés invasiu i l'endoteli activat associat a angiogènesi [434,435,436].

En aquest treball s'ha dut a terme una aproximació proteòmica per a caracteritzar components específics del front d'invasió o l'estroma reactiu mitjançant la comparació de l'àrea invasiva del tumor anvers el tumor superficial i el teixit normal, totes tres mostres provinents de la mateixa pacient. Independentment de la contribució del miometri a l'àrea invasiva, vam poder identificar proteïnes específicament sobre o infraexpressades en el front d'invasió. Degut a la complexitat tissular, és possible l'aïllament i anàlisi d'un nombre petit de cèl·lules provinents d'una àrea específica de la secció histològica mitjançant l'aïllament de tipus tissulars específics i microdissecció amb làser (LCM). El procediment habitual per a l'estudi dels protagonistes principals del procés invasiu ha estat la microdissecció d'àrees implicades en la infiltració miometrial, bàsicament mitjançant la genòmica i LCM combinada amb software assistit d'anàlisi imatges. L'ús de tincions saturants fan que les tècniques de microdissecció puguin ser compatibles amb anàlisis proteòmics posteriors [437,438]. Per a dur-ho a terme és necessari l'ús de tècniques d'espectrometria de masses altament sensibles per tal d'identificar les proteïnes alterades i aïllades utilitzant LCM [439], i per a dur a terme anàlisis proteòmics a gran escala de forma eficient, acurada i reproduïble [440]. De totes maneres, tot i el prometedor futur que espera a aquestes tècniques, fins ara la identificació de proteïnes implicades en la invasió tumoral ha estat dut a terme mitjançant mètodes immunohistoquímics. Aquest és el cas de la identificació de la glicoproteïna de matriu extracel·lular tenascin [441], la timidina-fosforilasa angiogènica [442] o l'enzim indolamina 2,3-dioxigenasa [443], les quals són proteïnes implicades en el front d'invasió del carcinoma endometrial.

L'aproximació que hem dut a terme en el nostre laboratori indica que la composició proteica de l'àrea de contacte existent entre el tumor endometrial invasiu i el miometri més proper està bàsicament representada per una mescla d'aquests dos tipus tissulars, però les dades obtingudes també informen que existeix un petit grup de proteïnes sobre o infraexpressades específicament en el front d'invasió. Tenint en compte que la mostra de tumor profund està composta bàsicament de glàndules epitelials tumorals i miometri, amb la zona de contacte de glàndules tumorals invasives i estroma reactiu, vam aproximar que les proteïnes diferencialment expressades en el front d'invasió haurien de presentar nivells majors o menors comparant-ho tant a les glàndules epitelials tumorals del tumor pur (el tumor que anomenem superficial, no invasiu) com del miometri. La nostra hipòtesi va poder ser validada mitjançant

western blot i immunohistoquímica. Una altra aproximació vàlida hagués estat avaluar la contribució de cada component de la mostra de tumor profund per histopatologia i després normalitzar l'expressió diferencial de cada spot detectat. De totes maneres, degut a la complexitat quan es treballa amb mostres de diferents pacients amb diferents percentatges de miometri o tumor en la mostra tumoral profunda (per tant, invasiva), sumat a l'heterogeneïtat dels tipus cel·lulars que formen part de les diferents àrees tissulars analitzades, fan inviable actualment una aproximació global a l'estudi del front d'invasió. Coneixent les limitacions del nostre estudi, som conscients que potser estem passant per alt proteïnes amb major expressió en el front d'invasió del carcinoma endometrial quan es compara amb el tumor superficial ja que són emmascarades per una major contribució del la mostra de tumor profund anvers miometri, o a l'inversa. Això resultaria en una disminució de l'expressió de tota la mostra de tumor profund comparat amb el tumor superficial, i en el nostre estudi hem estat capaços d'identificar proteïnes que tenen major (o menor) expressió en el tumor profund comparat amb el tumor superficial i la mostra normal. Algunes de les proteïnes que han estat identificades com diferencialment expressades en el front d'invasió del carcinoma endometrial, ja havien estat descrites com a proteïnes específiques del front d'invasió. Aquest és el cas de fascin1 en el carcinoma colorectal, on presenta un sobreexpressió transitòria que promou l'adquisició del fenotip migrador i invasiu que permet fer metàstasi [444]. Altres proteïnes identificades com Desmin, Miosin, Serpin H1 i Tropomiosin 4 semblen estar implicades en l'assemblatge cel·lular i les interaccions cèl·lula-cèl·lula, crucials també en la transició epiteli-mesènquima (EMT), quan les cèl·lules epitelials del carcinoma endometrial adquireixen el fenotip invasiu [13]. És d'especial interès, per la seva connexió amb els resultats obtinguts en el treball anterior en que es descriu la inducció d'expressió de Hep27 degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 i la seva relació amb l'estrès oxidatiu, la identificació de SOD1 i BLVRB, dos enzims implicats també en aquest procés.

L'enzim SOD1 catalitza la conversió dels radicals d'oxigen a peròxid d'hidrogen i oxigen. Existeixen diferents tipus de SOD que difereixen en el tipus de metall al qual s'uneixen, el compartiment on s'ubiquen i la sensibilitat a diferents reactius. Entre aquests la superòxid dismutasa Cu-Zn (SOD1) és la que es troba més àmpliament distribuïda i suposa el 90% de totes les SOD. Aquest enzim que necessita de Cu i Zn per a dur a terme la seva activitat, té molta importància fisiològica i com a potencial terapèutic. Estudis realitzats per Rao i col·laboradors, han demostrat l'implicació de SOD1 en la regulació de l'expressió de gens de resposta a estrògens i suggereixen que l'estradiol (hormona de la família dels estrògens) augmenta SOD1 provocant un augment en la supervivència de les cèl·lules de càncer de mama i la progressió dels tumors mamaris [445]. Aquests resultats estarien en línia als descrits en aquest treball, on SOD1 tindria un paper en la protecció de les cèl·lules que formen part del front d'invasió a l'estrès oxidatiu generat, per tal d'afavorir la progressió del tumor.

D'altra banda, BLVRB és un enzim implicat en la reacció redox de conversió de la biliverdina a bilirubina [446]. BLVRB intervé en la protecció de les cèl·lules contra l'estrès oxidatiu, però aquesta no és la seva única funció; també s'ha demostrat que participa en diverses vies de

senyalització cel·lular [447]. Com ja s'ha descrit prèviament, la producció excessiva de radicals lliures d'oxigen (ROS) comporta dany a la cèl·lula i mort cel·lular. L'estrès oxidatiu és responsable de moltes alteracions com malalties cardiovasculars, complicacions de la diabetis o càncer. Existeixen varis mecanismes per a defensar les cèl·lules de ROS, un d'ells és la producció de bilirubina, un citoprotector produït a través de l'acció enzimàtica de BLVRB [446]. Mitjançant immunohistoquímica sobre talls de carcinoma endometrial amb diferent grau d'infiltració miometrial, vam confirmar la sobreexpressió de BLVRB en el front d'invasió, fet que s'explicaria pel seu paper com a protector cel·lular a l'estrès oxidatiu generat durant el procés invasiu.

Com s'ha mostrat en el treball previ, en el nostre grup hem descrit l'acció de ERM/ETV5 com a modulador de la resposta a l'estrès oxidatiu associat a la promoció de la invasió tumoral en el carcinoma endometrial. La nostra proposta es centra en la regulació dels enzims que protegeixen dels ROS generats durant el procés invasiu, i específicament localitzats en el front d'invasió. Aquestes dades reforcen el paper de ROS en la inducció i resposta durant la infiltració miometrial en el carcinoma d'endometri i permeten pensar en el disseny de noves teràpies amb drogues adreçades a lluitar contra la invasió. Seria especialment atractiu el disseny de drogues que tinguessin l'efecte combinat en la inhibició del proteasoma i la inducció de l'apoptosi [448]. Tot i que el carcinoma endometrial pot ser detectat en els seus estadis inicials degut als símptomes que presenta, prop d'un 20% de les pacients presenten infiltració miometrial amb afectació limfàtica, fet que es correlaciona amb mal pronòstic i una disminució en la supervivència. Després d'un primer tractament amb cirurgia, s'ha demostrat que la quimioteràpia no aporta beneficis demostrats als tumors en estadi avançat que no responen a hormones, aquest fet reflecteix la necessitat de desenvolupar noves teràpies per al carcinoma endometrial associat a la infiltració miometrial, la disseminació tumoral i metàstasi [385]. Per concloure, els resultats presentats aporten una nova aproximació proteòmica que s'enfoca de manera específica a l'estudi del front d'invasió en el carcinoma endometrial, permetent la identificació de nous protagonistes de la infiltració miometrial, els quals podrien ser diana de noves teràpies dirigides al punt d'inici de la metàstasi endometrial.

Conclusions

CONCLUSIONS

1. La sobreexpressió del factor de transcripció ERM/ETV5 a la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A resulta en un augment de l'activitat gelatinasa MMP-2.
2. Tant els experiments d'immunoprecipitació de cromatina com els experiments amb RNA d'interferència o l'ús d'un inhibidor específic de MMP-2 mostren un nexe funcional entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i l'activació de MMP-2, mostrant un augment de dispersió i motilitat cel·lular en les cèl·lules que sobreexpressen ERM/ETV5.
3. En el model animal ortotòpic de carcinoma endometrial es demostra que l'augment de l'activitat de MMP-2 associat a la sobreexpressió de ERM/ETV5 confereix major capacitat invasiva als tumors endometrials. Els tumors ortotòpics implantats amb sobreexpressió de ERM/ETV5 mostren un patró més agressiu i infiltrant d'invasió miometrial.
4. ERM/ETV5 i MMP-2 correlacionen en el front d'invasió de mostres de carcinomes endometrials humanes amb infiltració miometrial, pel que podem hipotetitzar que ERM/ETV5 té un paper en els passos inicials de la disseminació endometrial.
5. Analitzant les dades obtingudes, podem proposar que en el carcinoma endometrial endometriode, ERM/ETV5 actua a través de l'activitat gelatinolítica de MMP-2 per a donar major capacitat invasiva, associat al punt d'inici de la infiltració miometrial. Podria considerar-se ERM/ETV5 com a un potent marcador per a la classificació de les pacients amb EEC, així com per buscar teràpies específicament dirigides als inicis de la disseminació endometrial.
6. L'anàlisi comparatiu dels perfils proteics associats a la sobreexpressió estable de ERM/ETV5 permet detectar prop de 50 proteïnes diferencialment expressades. Les rutes moleculars implicades assenyalen la migració cel·lular i l'invasió com a les vies moleculars majorment alterades a través de la senyalització per TGF- β i progesterona i la regulació del citoesquelet.
7. El gen més alterat degut a la sobreexpressió de ERM/ETV5 correspon a Hep27, membre de la superfamília d'enzims deshidrogenasa/reductasa de cadena curta (SDR). Aquesta proteïna presenta localització mitocondrial dependent de ERM/ETV5. Estudis funcionals van demostrar associació amb l'estrès oxidatiu.
8. Analitzant els resultats obtinguts, podem concloure que l'anàlisi proteòmic dut a terme amb la línia cel·lular Hec-1A que sobreexpressa de forma estable ERM/ETV5, reforça el paper d'aquest factor de transcripció com a factor regulador de la migració i invasió tumoral, i assenjala la seva implicació en la resposta a l'estrès oxidatiu associat a l'inici de la invasió en el carcinoma endometrial.

9. L'aproximació proteòmica per a caracteritzar els components específics del front d'invasió o l'estroma reactiu indica que la composició proteica de l'àrea de contacte existent entre el tumor endometrial invasiu i el miometri més proper està bàsicament representada per una mescla d'aquests dos tipus tissulars, però alhora ha estat possible identificar proteïnes específicament sobre o infraexpressades en el front d'invasió. Aquestes es troben implicades en la morfologia cel·lular, acoblament i moviment, així com mecanismes moleculars relacionats amb la senyalització i interacció cèl·lula-cèl·lula i la resposta moduladora a l'estrès oxidatiu.

10. És d'especial interès la identificació de SOD1 i BLVRB, dos enzims implicats en la protecció enfront l'estrès oxidatiu generat durant el procés invasiu. Novament aquest resultat mostren associació entre el procés d'invasió i l'estrès oxidatiu.

11. En resum, ha estat possible descriure una nova estratègia proteòmica que puntualitza específicament en el front d'invasió del carcinoma endometrial, permetent la identificació de nous protagonistes implicats en la infiltració miometrial, els quals podrien ser diana de noves teràpies dirigides al punt d'inici de la metàstasi endometrial.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

1. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 2003. **3**(1): p. 36-44.
2. Kurman, R.J., P.F. Kaminski, and H.J. Norris, *The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients*. Cancer, 1985. **56**(2): p. 403-12.
3. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10-7.
4. Scully, R.B., TA; Kurman, RJ et and al., *International histological classification and histologic typing of female genital tract tumors*. 1994, Berlin: Springer-Verlag.
5. Lax, S.F., *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. Virchows Arch, 2004. **444**(3): p. 213-23.
6. Fuller, A.S., MV; Young RH., *Uterine Cancer (ACS series)*. 1st ed. A.C.S.A. of Clinical Oncology. Vol. 1. 2004. Hamilton: BC Decker Inc.
7. Salvesen, H.B. and L.A. Akslen, *Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma*. APMIS, 2002. **110**(10): p. 673-89.
8. F.I.G.O., *International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO): Announcements. FIGO stages: 1988 revision*. Gynecol Oncol, 1989. **35**(p.125-127).
9. Baggish, M., *Hysteroscopy: visual perspectives of uterine anatomy, physiology and pathology*. 3rd edition ed. L.W. Wilkins. Vol. 1. 2007.
10. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
11. Doll, A., et al., *Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **108**(3-5): p. 221-9.
12. Ryan, A.J., et al., *Endometrial cancer*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(1): p. 53-61.
13. Abal, M., et al., *Molecular determinants of invasion in endometrial cancer*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(5): p. 272-7.
14. Seth, A. and D.K. Watson, *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2462-78.
15. van de Graaff, K., *Human Anatomy*. 6th ed. McHill. Vol. 1. 2002. New York.
16. Kurman, R.Z., RJ; Norris, HJ, *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract* Springer-Verlag., Editor. 2002 Nueva York
17. Salamonsen, L.A., G.T. Kovacs, and J.K. Findlay, *Current concepts of the mechanisms of menstruation*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 1999. **13**(2): p. 161-79.

18. Cabero, L.C., E. , *Tratado de ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción*. 2003, Madrid. Editorial médica panamericana.
19. Bray, F., et al., *Geographic and temporal variations in cancer of the corpus uteri: incidence and mortality in pre- and postmenopausal women in Europe*. *Int J Cancer*, 2005. **117**(1): p. 123-31.
20. Institute, N.C. *Cancer Statistics Review*. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/ 1975-2005 [cited].
21. Creasman, W.T., et al., *Carcinoma of the corpus uteri*. *J Epidemiol Biostat*, 2001. **6**(1): p. 47-86.
22. Lambert ME., B.P., *Gynaecological Oncology*, 1992. **New York** (Oxford).
23. Rose, P.G., *Endometrial carcinoma*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(9): p. 640-9.
24. MacMahon, B., *Risk factors for endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 1974. **2**(2-3): p. 122-9.
25. Partridge, E.E., H.M. Shingleton, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on endometrial cancer*. *J Surg Oncol*, 1996. **61**(2): p. 111-23.
26. Hill, H.A., et al., *Racial differences in tumor grade among women with endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 1995. **56**(2): p. 154-63.
27. Egeland, G.M., et al., *Characteristics of noncontraceptive hormone users*. *Prev Med*, 1988. **17**(4): p. 403-11.
28. Parslov, M., et al., *Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study*. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. **182**(1 Pt 1): p. 23-9.
29. Sandles, L.G., et al., *Endometrial adenocarcinoma: genetic analysis suggesting heritable site-specific uterine cancer*. *Gynecol Oncol*, 1992. **47**(2): p. 167-71.
30. Watson, P. and H.T. Lynch, *Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers*. *Fam Cancer*, 2001. **1**(1): p. 57-60.
31. Cederquist, K., et al., *Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(3): p. 370-6.
32. Elwood, J.M., et al., *Epidemiology of endometrial cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **59**(4): p. 1055-60.
33. Brinton, L.A., et al., *Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study*. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. **167**(5): p. 1317-25.
34. Ewertz, M., G. Schou, and J.D. Boice, Jr., *The joint effect of risk factors on endometrial cancer*. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1988. **24**(2): p. 189-94.
35. Kalandidi, A., et al., *A case-control study of endometrial cancer in relation to reproductive, somatometric, and life-style variables*. *Oncology*, 1996. **53**(5): p. 354-9.

36. Burke, T.W., et al., *Endometrial hyperplasia and endometrial cancer*. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1996. **23**(2): p. 411-56.
37. Logan, W.P., *Marriage and childbearing in relation to cancer of the breast and uterus*. *Lancet*, 1953. **265**(6797): p. 1199-1202.
38. Salazar-Martinez, E., et al., *Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico*. *Cancer Res*, 1999. **59**(15): p. 3658-62.
39. Escobedo, L.G., et al., *Infertility-associated endometrial cancer risk may be limited to specific subgroups of infertile women*. *Obstet Gynecol*, 1991. **77**(1): p. 124-8.
40. Wood, G.P. and R.C. Boronow, *Endometrial adenocarcinoma and the polycystic ovary syndrome*. *Am J Obstet Gynecol*, 1976. **124**(2): p. 140-2.
41. Grady, D., et al., *Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. *Obstet Gynecol*, 1995. **85**(2): p. 304-13.
42. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(18): p. 1371-88.
43. Gusberg, S.B., *The rise and fall of endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 1989. **35**(1): p. 124.
44. Ziel, H.K., W.D. Finkle, and S. Greenland, *Decline in incidence of endometrial cancer following increase in prescriptions for opposed conjugated estrogens in a prepaid health plan*. *Gynecol Oncol*, 1998. **68**(3): p. 253-5.
45. Brinton, L.A. and R.N. Hoover, *Estrogen replacement therapy and endometrial cancer risk: unresolved issues. The Endometrial Cancer Collaborative Group*. *Obstet Gynecol*, 1993. **81**(2): p. 265-71.
46. Parazzini, F., et al., *The epidemiology of endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 1991. **41**(1): p. 1-16.
47. Voigt, L.F., Q. Deng, and N.S. Weiss, *Recency, duration, and progestin content of oral contraceptives in relation to the incidence of endometrial cancer (Washington, USA)*. *Cancer Causes Control*, 1994. **5**(3): p. 227-33.
48. Weiderpass, E., et al., *Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk (Sweden)*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(4): p. 277-84.
49. Grimes, D.A. and K.E. Economy, *Primary prevention of gynecologic cancers*. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. **172**(1 Pt 1): p. 227-35.
50. Fornander, T., et al., *Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers*. *Lancet*, 1989. **1**(8630): p. 117-20.
51. Andersson, M., H.H. Storm, and H.T. Mouridsen, *Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(14): p. 1013-7.

52. Fisher, B., et al., *Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(7): p. 527-37.
53. Seoud, M.A., J. Johnson, and J.C. Weed, Jr., *Gynecologic tumors in tamoxifen-treated women with breast cancer*. Obstet Gynecol, 1993. **82**(2): p. 165-9.
54. Neven, P., et al., *Longitudinal hysteroscopic follow-up during tamoxifen treatment*. Lancet, 1998. **351**(9095): p. 36.
55. Neven, P. and I. Vergote, *Controversies regarding tamoxifen and uterine carcinoma*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1998. **10**(1): p. 9-14.
56. Bergman, L., et al., *Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen*. Lancet, 2000. **356**(9233): p. 881-7.
57. Deligdisch, L., et al., *Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer*. Gynecol Oncol, 2000. **78**(2): p. 181-6.
58. Magriples, U., et al., *High-grade endometrial carcinoma in tamoxifen-treated breast cancer patients*. J Clin Oncol, 1993. **11**(3): p. 485-90.
59. Ferguson, S.E., et al., *Comparison of uterine malignancies that develop during and following tamoxifen therapy*. Gynecol Oncol, 2006. **101**(2): p. 322-6.
60. Friedenreich, C., et al., *Anthropometric factors and risk of endometrial cancer: the European prospective investigation into cancer and nutrition*. Cancer Causes Control, 2007. **18**(4): p. 399-413.
61. Austin, H., et al., *Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 568-72.
62. Olson, S.H., et al., *Body mass index, weight gain, and risk of endometrial cancer*. Nutr Cancer, 1995. **23**(2): p. 141-9.
63. Baanders-van Halewyn, E.A., et al., *A comparative study of risk factors for hyperplasia and cancer of the endometrium*. Eur J Cancer Prev, 1996. **5**(2): p. 105-12.
64. Ricci, E., et al., *Risk factors for endometrial hyperplasia: results from a case-control study*. Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(3): p. 257-60.
65. Courneya, K.S., et al., *Associations among exercise, body weight, and quality of life in a population-based sample of endometrial cancer survivors*. Gynecol Oncol, 2005. **97**(2): p. 422-30.
66. Cauley, J.A., et al., *The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women*. Am J Epidemiol, 1989. **129**(6): p. 1120-31.

67. Goodman, M.T., et al., *Diet, body size, physical activity, and the risk of endometrial cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(22): p. 5077-85.
68. Shu, X.O., et al., *A population-based case-control study of dietary factors and endometrial cancer in Shanghai, People's Republic of China*. *Am J Epidemiol*, 1993. **137**(2): p. 155-65.
69. Potischman, N., et al., *Dietary associations in a case-control study of endometrial cancer*. *Cancer Causes Control*, 1993. **4**(3): p. 239-50.
70. Dalvi, T.B., A.J. Canchola, and P.L. Horn-Ross, *Dietary patterns, Mediterranean diet, and endometrial cancer risk*. *Cancer Causes Control*, 2007. **18**(9): p. 957-66.
71. Cardoso, J.R. and S.N. Bao, *Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits*. *Anim Reprod Sci*, 2007. **97**(3-4): p. 237-45.
72. Phipps, W.R., A.M. Duncan, and M.S. Kurzer, *Isoflavones and postmenopausal women: a critical review*. *Treat Endocrinol*, 2002. **1**(5): p. 293-311.
73. Weiderpass, E., et al., *Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden)*. *Cancer Causes Control*, 2000. **11**(2): p. 185-92.
74. Parazzini, F., et al., *Diabetes and endometrial cancer: an Italian case-control study*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(4): p. 539-42.
75. Soler, M., et al., *Hypertension and hormone-related neoplasms in women*. *Hypertension*, 1999. **34**(2): p. 320-5.
76. Jung, R.T., *Obesity as a disease*. *Br Med Bull*, 1997. **53**(2): p. 307-21.
77. Stockwell, H.G. and G.H. Lyman, *Cigarette smoking and the risk of female reproductive cancer*. *Am J Obstet Gynecol*, 1987. **157**(1): p. 35-40.
78. Lawrence, C., et al., *Smoking, body weight, and early-stage endometrial cancer*. *Cancer*, 1987. **59**(9): p. 1665-9.
79. Friedman, A.J., V.A. Ravnkar, and R.L. Barbieri, *Serum steroid hormone profiles in postmenopausal smokers and nonsmokers*. *Fertil Steril*, 1987. **47**(3): p. 398-401.
80. Levi, F., et al., *Dietary factors and the risk of endometrial cancer*. *Cancer*, 1993. **71**(11): p. 3575-81.
81. Schouten, L.J., R.A. Goldbohm, and P.A. van den Brandt, *Anthropometry, physical activity, and endometrial cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(21): p. 1635-8.
82. Kimura, T., et al., *Abnormal uterine bleeding and prognosis of endometrial cancer*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004. **85**(2): p. 145-50.

83. Demirkiran, F., et al., *The prognostic significance of cervico-vaginal cytology in endometrial cancer*. Eur J Gynaecol Oncol, 1995. **16**(5): p. 403-9.
84. Clark, T.J., et al., *Evaluation of outpatient hysteroscopy and ultrasonography in the diagnosis of endometrial disease*. Obstet Gynecol, 2002. **99**(6): p. 1001-7.
85. Marchetti, M., et al., *The role of hysteroscopy in early diagnosis of endometrial cancer*. Eur J Gynaecol Oncol, 2002. **23**(2): p. 151-3.
86. Blumenfeld, M.L. and L.P. Turner, *Role of transvaginal sonography in the evaluation of endometrial hyperplasia and cancer*. Clin Obstet Gynecol, 1996. **39**(3): p. 641-55.
87. Hata, K., T. Hata, and M. Kitao, *Intratumoral blood flow analysis in endometrial cancer: does it differ among individual tumor characteristics?* Gynecol Oncol, 1996. **61**(3): p. 341-4.
88. Montgomery, B.E., G.S. Daum, and C.J. Dunton, *Endometrial hyperplasia: a review*. Obstet Gynecol Surv, 2004. **59**(5): p. 368-78.
89. Karlsson, B., et al., *Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding--a Nordic multicenter study*. Am J Obstet Gynecol, 1995. **172**(5): p. 1488-94.
90. Kurman, R.J.Z., R.J.; Norris H.J. *Endometrial carcinoma*. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract., 1995, Nueva York, Springer-Verlag: 439-86.
91. Smith, M. and A.J. McCartney, *Occult, high-risk endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 1985. **22**(2): p. 154-61.
92. Caduff, R.F., et al., *Molecular analysis in endometrial cancer*. Verh Dtsch Ges Pathol, 1997. **81**: p. 219-27.
93. Oehler, M.K., A. Brand, and G.V. Wain, *Molecular genetics and endometrial cancer*. J Br Menopause Soc, 2003. **9**(1): p. 27-31.
94. Lax, S.F. and R.J. Kurman, *A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses*. Verh Dtsch Ges Pathol, 1997. **81**: p. 228-32.
95. Hendrickson, M., et al., *Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma*. Am J Surg Pathol, 1982. **6**(2): p. 93-108.
96. Lauchlan, S.C., *Tubal (serous) carcinoma of the endometrium*. Arch Pathol Lab Med, 1981. **105**(11): p. 615-8.
97. Ambros, R.A., et al., *Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation*. Hum Pathol, 1995. **26**(11): p. 1260-7.
98. Gehrig, P.A., et al., *Noninvasive papillary serous carcinoma of the endometrium*. Obstet Gynecol, 2001. **97**(1): p. 153-7.

99. Spiegel, G.W., *Endometrial carcinoma in situ in postmenopausal women*. Am J Surg Pathol, 1995. **19**(4): p. 417-32.
100. Zheng, W., et al., *p53 immunostaining as a significant adjunct diagnostic method for uterine surface carcinoma: precursor of uterine papillary serous carcinoma*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(12): p. 1463-73.
101. Baergen, R.N., et al., *Early uterine serous carcinoma: clonal origin of extrauterine disease*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(3): p. 214-9.
102. Wheeler, D.T., et al., *Minimal uterine serous carcinoma: diagnosis and clinicopathologic correlation*. Am J Surg Pathol, 2000. **24**(6): p. 797-806.
103. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, *Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 97 cases*. Gynecol Oncol, 1991. **40**(3): p. 207-17.
104. Abeler, V.M., et al., *Clear cell carcinoma of the endometrium. Prognosis and metastatic pattern*. Cancer, 1996. **78**(8): p. 1740-7.
105. Carcangiu, M.L. and J.T. Chambers, *Early pathologic stage clear cell carcinoma and uterine papillary serous carcinoma of the endometrium: comparison of clinicopathologic features and survival*. Int J Gynecol Pathol, 1995. **14**(1): p. 30-8.
106. Lax, S.F., et al., *Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression*. Hum Pathol, 1998. **29**(6): p. 551-8.
107. Vang, R., et al., *Immunohistochemical analysis of clear cell carcinoma of the gynecologic tract*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(3): p. 252-9.
108. Nucci, M.R., et al., *Mucinous endometrial epithelial proliferations: a morphologic spectrum of changes with diverse clinical significance*. Mod Pathol, 1999. **12**(12): p. 1137-42.
109. Zaloudek, C., et al., *Microglandular adenocarcinoma of the endometrium: a form of mucinous adenocarcinoma that may be confused with microglandular hyperplasia of the cervix*. Int J Gynecol Pathol, 1997. **16**(1): p. 52-9.
110. Goodman, A., et al., *Squamous cell carcinoma of the endometrium: a report of eight cases and a review of the literature*. Gynecol Oncol, 1996. **61**(1): p. 54-60.
111. Spiegel, G.W., R.M. Austin, and P.L. Gelven, *Transitional cell carcinoma of the endometrium*. Gynecol Oncol, 1996. **60**(2): p. 325-30.
112. Abeler, V.M., K.E. Kjorstad, and J.M. Nesland, *Undifferentiated carcinoma of the endometrium. A histopathologic and clinical study of 31 cases*. Cancer, 1991. **68**(1): p. 98-105.
113. Sherman, M.E., et al., *Uterine serous carcinoma. A morphologically diverse neoplasm with unifying clinicopathologic features*. Am J Surg Pathol, 1992. **16**(6): p. 600-10.

114. Parker, S.L., et al., *Cancer statistics, 1997*. CA Cancer J Clin, 1997. **47**(1): p. 5-27.
115. Duska, L.R., et al., *Endometrial cancer in women 40 years old or younger*. Gynecol Oncol, 2001. **83**(2): p. 388-93.
116. Baloglu, H., et al., *Atypical endometrial hyperplasia shares genomic abnormalities with endometrioid carcinoma by comparative genomic hybridization*. Hum Pathol, 2001. **32**(6): p. 615-22.
117. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, *Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation*. Cancer, 1992. **69**(2): p. 488-95.
118. Clement, P.B. and R.H. Young, *Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. Adv Anat Pathol, 2002. **9**(3): p. 145-84.
119. Enomoto, T., et al., *K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus*. Cancer Res, 1991. **51**(19): p. 5308-14.
120. Ionov, Y., et al., *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 558-61.
121. Chao, E.C. and S.M. Lipkin, *Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(3): p. 840-52.
122. Aaltonen, L.A., et al., *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science, 1993. **260**(5109): p. 812-6.
123. Thibodeau, S.N., G. Bren, and D. Schaid, *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. Science, 1993. **260**(5109): p. 816-9.
124. Ichikawa, Y., et al., *Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members*. Cancer Genet Cytogenet, 1999. **112**(1): p. 2-8.
125. Watson, P. and H.T. Lynch, *Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cancer, 1993. **71**(3): p. 677-85.
126. Catusus, L., et al., *Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases*. Hum Pathol, 1998. **29**(10): p. 1160-4.
127. Risinger, J.I., et al., *Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5100-3.
128. Duggan, B.D., et al., *Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(16): p. 1216-21.
129. Caduff, R.F., et al., *Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma*. Am J Pathol, 1996. **148**(5): p. 1671-8.

130. Katabuchi, H., et al., *Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas*. *Cancer Res*, 1995. **55**(23): p. 5556-60.
131. Kowalski, L.D., et al., *Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997. **18**(3): p. 219-27.
132. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. *Trends Genet*, 2000. **16**(4): p. 168-74.
133. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. *Adv Cancer Res*, 1998. **72**: p. 141-96.
134. Esteller, M., et al., *MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas*. *Oncogene*, 1998. **17**(18): p. 2413-7.
135. Cunningham, J.M., et al., *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. *Cancer Res*, 1998. **58**(15): p. 3455-60.
136. Esteller, M., et al., *hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(5): p. 1767-72.
137. Kobayashi, K., et al., *Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. **14**(2): p. 128-32.
138. Basil, J.B., et al., *Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Cancer*, 2000. **89**(8): p. 1758-64.
139. Hirasawa, A., et al., *Unfavorable prognostic factors associated with high frequency of microsatellite instability and comparative genomic hybridization analysis in endometrial cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(15): p. 5675-82.
140. Black, D., et al., *Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(11): p. 1745-53.
141. MacDonald, N.D., et al., *Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas*. *Cancer Res*, 2000. **60**(6): p. 1750-2.
142. Macdonald, N.D., et al., *Molecular differences between RER+ and RER- sporadic endometrial carcinomas in a large population-based series*. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. **14**(5): p. 957-65.
143. Maxwell, G.L., et al., *Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers*. *Obstet Gynecol*, 2001. **97**(3): p. 417-22.
144. Catusus, L., et al., *Frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinoma with microsatellite instability*. *Cancer*, 2000. **88**(10): p. 2290-7.

145. Ali, I.U., L.M. Schriml, and M. Dean, *Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(22): p. 1922-32.
146. Cully, M., et al., *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 184-92.
147. Mutter, G.L., *Pten, a protean tumor suppressor*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1895-8.
148. Salvesen, H.B., et al., *PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma*. Int J Cancer, 2001. **91**(1): p. 22-6.
149. Eng, C., *PTEN: one gene, many syndromes*. Hum Mutat, 2003. **22**(3): p. 183-98.
150. Rasheed, B.K., et al., *Molecular pathogenesis of malignant gliomas*. Curr Opin Oncol, 1999. **11**(3): p. 162-7.
151. Montironi, R., M. Scarpelli, and A. Lopez Beltran, *Carcinoma of the prostate: inherited susceptibility, somatic gene defects and androgen receptors*. Virchows Arch, 2004. **444**(6): p. 503-8.
152. Wu, H., V. Goel, and F.G. Haluska, *PTEN signaling pathways in melanoma*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3113-22.
153. Levine, R.L., et al., *PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma*. Cancer Res, 1998. **58**(15): p. 3254-8.
154. Maxwell, G.L., et al., *Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias*. Cancer Res, 1998. **58**(12): p. 2500-3.
155. Yoshinaga, K., et al., *The PTEN, BAX, and IGF1R genes are mutated in endometrial atypical hyperplasia*. Jpn J Cancer Res, 1998. **89**(10): p. 985-90.
156. Mutter, G.L., et al., *Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(11): p. 924-30.
157. Sun, H., et al., *Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia*. Am J Clin Pathol, 2001. **115**(1): p. 32-8.
158. Latta, E. and W.B. Chapman, *PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2002. **14**(1): p. 59-65.
159. Peiffer, S.L., et al., *Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers*. Cancer Res, 1995. **55**(9): p. 1922-6.
160. Jones, M.H., et al., *Allelotype of uterine cancer by analysis of RFLP and microsatellite polymorphisms: frequent loss of heterozygosity on chromosome arms 3p, 9q, 10q, and 17p*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **9**(2): p. 119-23.
161. Nagase, S., et al., *Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer*. Br J Cancer, 1996. **74**(12): p. 1979-83.

162. Salvesen, H.B., et al., *Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression*. Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1615-23.
163. Risinger, J.I., et al., *PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 3005-10.
164. Kanaya, T., et al., *Association of mismatch repair deficiency with PTEN frameshift mutations in endometrial cancers and the precursors in a Japanese population*. Am J Clin Pathol, 2005. **124**(1): p. 89-96.
165. Bilbao, C., et al., *The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(3): p. 563-70.
166. Minaguchi, T., et al., *PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(9): p. 2636-42.
167. Uegaki, K., et al., *PTEN-positive and phosphorylated-Akt-negative expression is a predictor of survival for patients with advanced endometrial carcinoma*. Oncol Rep, 2005. **14**(2): p. 389-92.
168. Boguski, M.S. and F. McCormick, *Proteins regulating Ras and its relatives*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 643-54.
169. Fujimoto, I., et al., *Studies on ras oncogene activation in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1993. **48**(2): p. 196-202.
170. Caduff, R.F., C.M. Johnston, and T.S. Frank, *Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 182-8.
171. Semczuk, A., et al., *K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer*. Cancer Lett, 2001. **164**(2): p. 207-12.
172. Lagarda, H., et al., *K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability*. J Pathol, 2001. **193**(2): p. 193-9.
173. Enomoto, T., et al., *K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6139-45.
174. Mizuuchi, H., et al., *Clinical implications of K-ras mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium*. Cancer Res, 1992. **52**(10): p. 2777-81.
175. Sasaki, H., et al., *Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma*. Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1906-10.
176. Duggan, B.D., et al., *Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma*. Cancer Res, 1994. **54**(6): p. 1604-7.

177. Ito, K., et al., *K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient*. *Gynecol Oncol*, 1996. **63**(2): p. 238-46.
178. Tsuda, H., et al., *Frequent occurrence of c-Ki-ras gene mutations in well differentiated endometrial adenocarcinoma showing infiltrative local growth with fibrosing stromal response*. *Int J Gynecol Pathol*, 1995. **14**(3): p. 255-9.
179. Sun, H., et al., *Clonal analysis and mutations in the PTEN and the K-ras genes in endometrial hyperplasia*. *Diagn Mol Pathol*, 2002. **11**(4): p. 204-11.
180. Hachisuga, T., et al., *K-ras mutation in tamoxifen-related endometrial polyps*. *Cancer*, 2003. **98**(9): p. 1890-7.
181. Hachisuga, T., et al., *K-ras mutation in the endometrium of tamoxifen-treated breast cancer patients, with a comparison of tamoxifen and toremifene*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(6): p. 1098-103.
182. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
183. Bullions, L.C. and A.J. Levine, *The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer*. *Curr Opin Oncol*, 1998. **10**(1): p. 81-7.
184. Palacios, J. and C. Gamallo, *Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas*. *Cancer Res*, 1998. **58**(7): p. 1344-7.
185. Mirabelli-Primdahl, L., et al., *Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway*. *Cancer Res*, 1999. **59**(14): p. 3346-51.
186. Fukuchi, T., et al., *Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium*. *Cancer Res*, 1998. **58**(16): p. 3526-8.
187. Brabletz, T., et al., *beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1033-8.
188. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
189. Shih, H.C., et al., *Nuclear localization of beta-catenin is correlated with the expression of cyclin D1 in endometrial carcinomas*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(5A): p. 3749-54.
190. Moreno-Bueno, G., et al., *Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer*. *Int J Cancer*, 2004. **110**(2): p. 194-200.
191. Saegusa, M., et al., *beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(2): p. 209-17.
192. Takeichi, M., *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator*. *Science*, 1991. **251**(5000): p. 1451-5.

193. Sakuragi, N., et al., *Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion*. Gynecol Oncol, 1994. **53**(2): p. 183-9.
194. Mell, L.K., et al., *Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5546-53.
195. Risinger, J.I., et al., *Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 98-102.
196. Kihana, T., et al., *Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology*. Jpn J Cancer Res, 1996. **87**(11): p. 1184-90.
197. Saito, T., et al., *Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(4): p. 1002-9.
198. Oehler, M.K., M.C. Rees, and R. Bicknell, *Steroids and the endometrium*. Curr Med Chem, 2000. **7**(5): p. 543-60.
199. Couse, J.F., S. Curtis Hewitt, and K.S. Korach, *Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 287-96.
200. Lecce, G., et al., *Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1379-86.
201. Weihua, Z., et al., *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5936-41.
202. Horvath, G., et al., *Exon deletions and variants of human estrogen receptor mRNA in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2000. **10**(2): p. 128-136.
203. Lemieux, P. and S. Fuqua, *The role of the estrogen receptor in tumor progression*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996. **56**(1-6 Spec No): p. 87-91.
204. Bryant, W., et al., *The estrogen receptor (ER)alpha variant Delta5 exhibits dominant positive activity on ER-regulated promoters in endometrial carcinoma cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 751-9.
205. Herynk, M.H. and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor mutations in human disease*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 869-98.
206. Daffada, A.A., et al., *Exon 5 deletion variant estrogen receptor messenger RNA expression in relation to tamoxifen resistance and progesterone receptor/pS2 status in human breast cancer*. Cancer Res, 1995. **55**(2): p. 288-93.

- 207.Ogawa, S., et al., *Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3505-12.
- 208.Critchley, H.O., et al., *Wild-type estrogen receptor (ERbeta1) and the splice variant (ERbetax/beta2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5265-73.
- 209.Skrzypczak, M., et al., *Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor beta and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium*. Int J Cancer, 2004. **110**(6): p. 783-7.
- 210.Saegusa, M. and I. Okayasu, *Changes in expression of estrogen receptors alpha and beta in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(5): p. 510-8.
- 211.De Vivo, I., et al., *A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12263-8.
- 212.Peiro, G., et al., *Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(4): p. 359-67.
- 213.Vaskivuo, T.E., F. Stenback, and J.S. Tapanainen, *Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma*. Cancer, 2002. **95**(7): p. 1463-71.
- 214.Pallares, J., et al., *Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 569-77.
- 215.Dolcet, X., et al., *FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis*. Lab Invest, 2005. **85**(7): p. 885-94.
- 216.Pallares, J., et al., *Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3*. Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(3): p. 247-53.
- 217.Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
- 218.Matias-Guiu, X., et al., *Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma*. Hum Pathol, 2001. **32**(6): p. 569-77.
- 219.Mutter, G.L., et al., *Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4483-6.
- 220.Mutter, G.L., *Diagnosis of premalignant endometrial disease*. J Clin Pathol, 2002. **55**(5): p. 326-31.

221. Yin, Y., et al., *Differential regulation of p21 by p53 and Rb in cellular response to oxidative stress*. Mol Carcinog, 1999. **24**(1): p. 15-24.
222. Semczuk, A., et al., *Allelic loss at TP53 is not related to p53 protein overexpression in primary human endometrial carcinomas*. Oncology, 2005. **69**(4): p. 317-25.
223. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
224. Moll, U.M., et al., *Uterine papillary serous carcinoma evolves via a p53-driven pathway*. Hum Pathol, 1996. **27**(12): p. 1295-300.
225. Ambros, R.A., et al., *MDM2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma*. Mod Pathol, 1996. **9**(12): p. 1165-9.
226. Kounelis, S., et al., *Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature*. Mod Pathol, 2000. **13**(4): p. 379-88.
227. Lax, S.F., et al., *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 814-24.
228. Battifora, H., *p53 immunohistochemistry: a word of caution*. Hum Pathol, 1994. **25**(5): p. 435-7.
229. Sakuragi, N., et al., *Functional analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2005. **116**(4): p. 514-9.
230. Inaba, F., et al., *PTEN and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma*. Oncol Rep, 2005. **13**(1): p. 17-24.
231. Saffari, B., et al., *Association of p53 mutations and a codon 72 single nucleotide polymorphism with lower overall survival and responsiveness to adjuvant radiotherapy in endometrioid endometrial carcinomas*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15**(5): p. 952-63.
232. Engelsens, I.B., et al., *Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(4): p. 979-86.
233. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
234. Berchuck, A., et al., *Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(1 Pt 1): p. 15-21.
235. Spandidos, D.A., et al., *Molecular basis of gynecological cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **900**: p. 56-64.
236. Santin, A.D., et al., *Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1271-9.

237. Prat, J., et al., *Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10-case study of p53 and c-erbB-2 expression and DNA content.* Cancer, 1994. **74**(6): p. 1778-83.
238. Riben, M.W., et al., *Identification of HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in stage I endometrial carcinoma.* Mod Pathol, 1997. **10**(8): p. 823-31.
239. Rasty, G., et al., *Expression of HER-2/neu oncogene in normal, hyperplastic, and malignant endometrium.* Ann Clin Lab Sci, 1998. **28**(3): p. 138-43.
240. Silverman, M.B., et al., *Molecular and cytogenetic pretreatment risk assessment in endometrial carcinoma.* Gynecol Oncol, 2000. **77**(1): p. 1-7.
241. Kamb, A., et al., *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.* Science, 1994. **264**(5157): p. 436-40.
242. Peiffer, S.L., et al., *Low frequency of CDKN2 mutation in endometrial carcinomas.* Mol Carcinog, 1995. **13**(4): p. 210-2.
243. Milde-Langosch, K., et al., *P16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas.* Virchows Arch, 1999. **434**(1): p. 23-8.
244. Nakashima, R., et al., *Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours.* Br J Cancer, 1999. **80**(3-4): p. 458-67.
245. Salvesen, H.B., S. Das, and L.A. Akslen, *Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 153-9.
246. Tashiro, H., et al., *Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma.* Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 75-9.
247. Prat, J., *Prognostic parameters of endometrial carcinoma.* Hum Pathol, 2004. **35**(6): p. 649-62.
248. Boronow, R.C., et al., *Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study.* Obstet Gynecol, 1984. **63**(6): p. 825-32.
249. DiSaia, P.J., et al., *Risk factors and recurrent patterns in Stage I endometrial cancer.* Am J Obstet Gynecol, 1985. **151**(8): p. 1009-15.
250. Creasman, W.T., et al., *Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study.* Cancer, 1987. **60**(8 Suppl): p. 2035-41.
251. Morrow, C.P., et al., *Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study.* Gynecol Oncol, 1991. **40**(1): p. 55-65.
252. Wilson, T.O., et al., *Evaluation of unfavorable histologic subtypes in endometrial adenocarcinoma.* Am J Obstet Gynecol, 1990. **162**(2): p. 418-23; discussion 423-6.

253. Zaino, R.J., et al., *The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study.* Cancer, 1995. **75**(1): p. 81-6.
254. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, *Endometrial adenocarcinoma in Norway. A study of a total population.* Cancer, 1991. **67**(12): p. 3093-103.
255. Carcangiu, M.L. and J.T. Chambers, *Uterine papillary serous carcinoma: a study on 108 cases with emphasis on the prognostic significance of associated endometrioid carcinoma, absence of invasion, and concomitant ovarian carcinoma.* Gynecol Oncol, 1992. **47**(3): p. 298-305.
256. Zaino, R.J., et al., *Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: the importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--a Gynecologic Oncology Group study.* Cancer, 1996. **77**(6): p. 1115-21.
257. Nordstrom, B., et al., *Carcinoma of the endometrium: do the nuclear grade and DNA ploidy provide more prognostic information than do the FIGO and WHO classifications?* Int J Gynecol Pathol, 1996. **15**(3): p. 191-201.
258. Zaino, R.J., et al., *The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study.* Cancer, 1991. **68**(10): p. 2293-302.
259. Taylor, R.R., et al., *An analysis of two versus three grades for endometrial carcinoma.* Gynecol Oncol, 1999. **74**(1): p. 3-6.
260. Lax, S.F., et al., *A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis.* Am J Surg Pathol, 2000. **24**(9): p. 1201-8.
261. Ayhan, A., et al., *The prognostic value of nuclear grading and the revised FIGO grading of endometrial adenocarcinoma.* Int J Gynecol Pathol, 2003. **22**(1): p. 71-4.
262. Gal, D., F.O. Recio, and D. Zamurovic, *The new International Federation of Gynecology and Obstetrics surgical staging and survival rates in early endometrial carcinoma.* Cancer, 1992. **69**(1): p. 200-2.
263. Wolfson, A.H., et al., *The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium.* Gynecol Oncol, 1992. **45**(2): p. 142-6.
264. Kosary, C.L., *FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina.* Semin Surg Oncol, 1994. **10**(1): p. 31-46.
265. Maneschi, M., et al., *Surgical pathological staging of endometrial carcinoma and results of treatment.* Eur J Gynaecol Oncol, 1992. **13**(1 Suppl): p. 30-5.

- 266.Lee, K.R., P.M. Vacek, and J.L. Belinson, *Traditional and nontraditional histopathologic predictors of recurrence in uterine endometrioid adenocarcinoma*. Gynecol Oncol, 1994. **54**(1): p. 10-8.
- 267.Mariani, A., et al., *Hematogenous dissemination in corpus cancer*. Gynecol Oncol, 2001. **80**(2): p. 233-8.
- 268.Hanson, M.B., et al., *The prognostic significance of lymph-vascular space invasion in stage I endometrial cancer*. Cancer, 1985. **55**(8): p. 1753-7.
- 269.Sivridis, E., C.H. Buckley, and H. Fox, *The prognostic significance of lymphatic vascular space invasion in endometrial adenocarcinoma*. Br J Obstet Gynaecol, 1987. **94**(10): p. 991-4.
- 270.Gal, D., et al., *Lymphovascular space involvement--a prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma*. Gynecol Oncol, 1991. **42**(2): p. 142-5.
- 271.Beckner, M.E., T. Mori, and S.G. Silverberg, *Endometrial carcinoma: nontumor factors in prognosis*. Int J Gynecol Pathol, 1985. **4**(2): p. 131-45.
- 272.Katu, T.S., SG; Tsukamoto, N; et al, *Association of endometrial epithelial metaplasias with endometrial carcinoma and hyperplasia in Japanese and American women*. . Int J Gynecol Pathol, 1993. **12**: p. 297-300.
- 273.Fanning, J., et al., *Prognostic significance of the extent of cervical involvement by endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 1991. **40**(1): p. 46-7.
- 274.Eltabbakh, G.H. and A.D. Moore, *Survival of women with surgical stage II endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 1999. **74**(1): p. 80-5.
- 275.Jordan, L.B. and A. Al-Nafussi, *Clinicopathological study of the pattern and significance of cervical involvement in cases of endometrial adenocarcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(1): p. 42-8.
- 276.Boronow, R.C., *Surgical staging of endometrial cancer: evolution, evaluation, and responsible challenge--a personal perspective*. Gynecol Oncol, 1997. **66**(2): p. 179-89.
- 277.Kadar, N., H.D. Homesley, and J.H. Malfetano, *Positive peritoneal cytology is an adverse factor in endometrial carcinoma only if there is other evidence of extrauterine disease*. Gynecol Oncol, 1992. **46**(2): p. 145-9.
- 278.Turner, D.A., et al., *The prognostic significance of peritoneal cytology for stage I endometrial cancer*. Obstet Gynecol, 1989. **74**(5): p. 775-80.
- 279.Grimshaw, R.N., et al., *Prognostic value of peritoneal cytology in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1990. **36**(1): p. 97-100.
- 280.Geisinger, K.R., et al., *Endometrial adenocarcinoma. A multiparameter clinicopathologic analysis including the DNA profile and the sex steroid hormone receptors*. Cancer, 1986. **58**(7): p. 1518-25.

- 281.van der Putten, H.W., et al., *Prognostic value of quantitative pathologic features and DNA content in individual patients with stage I endometrial adenocarcinoma*. *Cancer*, 1989. **63**(7): p. 1378-87.
- 282.Sorbe, B., B. Risberg, and B. Frankendal, *DNA ploidy, morphometry, and nuclear grade as prognostic factors in endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1990. **38**(1): p. 22-7.
- 283.Stendahl, U., et al., *Prognostic significance of proliferation in endometrial adenocarcinomas: a multivariate analysis of clinical and flow cytometric variables*. *Int J Gynecol Pathol*, 1991. **10**(3): p. 271-84.
- 284.Britton, L.C., et al., *Flow cytometric DNA analysis of stage I endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1989. **34**(3): p. 317-22.
- 285.Pisani, A.L., et al., *HER-2/neu, p53, and DNA analyses as prognosticators for survival in endometrial carcinoma*. *Obstet Gynecol*, 1995. **85**(5 Pt 1): p. 729-34.
- 286.Creasman, W.T., *Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer*. *Cancer*, 1993. **71**(4 Suppl): p. 1467-70.
- 287.Deligdisch, L. and C.F. Holinka, *Progesterone receptors in two groups of endometrial carcinoma*. *Cancer*, 1986. **57**(7): p. 1385-8.
- 288.Geisinger, K.R., et al., *Correlation of female sex steroid hormone receptors with histologic and ultrastructural differentiation in adenocarcinoma of the endometrium*. *Cancer*, 1986. **58**(7): p. 1506-17.
- 289.Carcangiu, M.L., et al., *Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations*. *Am J Clin Pathol*, 1990. **94**(3): p. 247-54.
- 290.Kadar, N., J.H. Malfetano, and H.D. Homesley, *Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients*. *Gynecol Oncol*, 1993. **50**(3): p. 281-6.
- 291.Moore, T.D., et al., *Systemic treatment of advanced and recurrent endometrial carcinoma: current status and future directions*. *J Clin Oncol*, 1991. **9**(6): p. 1071-88.
- 292.Williams, J.A., Jr., et al., *Fluorescence in situ hybridization analysis of HER-2/neu, c-myc, and p53 in endometrial cancer*. *Exp Mol Pathol*, 1999. **67**(3): p. 135-43.
- 293.Esteller, M., et al., *The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer*. *Eur J Cancer*, 1997. **33**(10): p. 1572-7.
- 294.Niederacher, D., et al., *Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer*. *Oncology*, 1999. **56**(1): p. 59-65.
- 295.Erdem, O., et al., *Angiogenesis, p53, and bcl-2 expression as prognostic indicators in endometrial cancer: comparison with traditional clinicopathologic variables*. *Int J Gynecol Pathol*, 2003. **22**(3): p. 254-60.

296. Yamauchi, N., et al., *Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity*. Int J Gynecol Pathol, 1996. **15**(3): p. 202-8.
297. Sakuragi, N., et al., *Bcl-2 expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma*. Int J Cancer, 1998. **79**(2): p. 153-8.
298. Bowen, I.B., SM; Jones, AH., *Mitosis and Apoptosis* 1st ed ed. Matters of Life and Death. 1998, London: Chapman & Hall.
299. van Diest, P.J., G. Brugal, and J.P. Baak, *Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value*. J Clin Pathol, 1998. **51**(10): p. 716-24.
300. Nordstrom, B., et al., *A comparison of proliferation markers and their prognostic value for women with endometrial carcinoma. Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and flow cytometric S-phase fraction*. Cancer, 1996. **78**(9): p. 1942-51.
301. Kaleli, S., et al., *A strong prognostic variable in endometrial carcinoma: flow cytometric S-phase fraction*. Cancer, 1997. **79**(5): p. 944-51.
302. Salvesen, H.B., O.E. Iversen, and L.A. Akslen, *Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(11): p. 2779-85.
303. Lynch, H.T., T. Smyrk, and J.F. Lynch, *Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome)*. Int J Cancer, 1996. **69**(1): p. 38-43.
304. Risinger, J.I., et al., *PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4736-8.
305. Tashiro, H., et al., *Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 3935-40.
306. Salvesen, H.B., O.E. Iversen, and L.A. Akslen, *Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study*. J Clin Oncol, 1999. **17**(5): p. 1382-90.
307. Moreno-Bueno, G., et al., *Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 7981-90.
308. Machin, P., et al., *CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas*. Hum Pathol, 2002. **33**(2): p. 206-12.
309. Palacios, J., et al., *Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability*. Virchows Arch, 2001. **438**(5): p. 464-9.
310. Silverberg, S., *Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma*. Mod Pathol, 2000. **13**: p. 309-327.

311. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
312. Thiery, J.P. and M. Morgan, *Breast cancer progression with a Twist*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 777-8.
313. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. **118**(3): p. 277-9.
314. Boyer, B., A.M. Valles, and N. Edme, *Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(8): p. 1091-9.
315. Aberle, H., H. Schwartz, and R. Kemler, *Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function*. J Cell Biochem, 1996. **61**(4): p. 514-23.
316. Rowlands, T.M., et al., *Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues*. Rev Reprod, 2000. **5**(1): p. 53-61.
317. Gottardi, C.J., E. Wong, and B.M. Gumbiner, *E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1049-60.
318. Noe, V., et al., *Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 1)**: p. 127-35.
319. Schlosshauer, P.W., L.H. Ellenson, and R.A. Soslow, *Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype*. Mod Pathol, 2002. **15**(10): p. 1032-7.
320. Holcomb, K., et al., *E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium*. Obstet Gynecol, 2002. **100**(6): p. 1290-5.
321. Hanekamp, E.E., et al., *Progesterone receptors in endometrial cancer invasion and metastasis: development of a mouse model*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 795-800.
322. Hanekamp, E.E., et al., *Differences in invasive capacity of endometrial cancer cell lines expressing different progesterone receptor isoforms: possible involvement of cadherins*. J Soc Gynecol Investig, 2005. **12**(4): p. 278-84.
323. Dai, D., et al., *Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 881-6.
324. Saito, T., et al., *Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium*. Int J Cancer, 2001. **93**(3): p. 317-23.
325. Moreno-Bueno, G., et al., *Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia*. J Pathol, 2003. **199**(4): p. 471-8.

326. Stefansson, I.M., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1242-52.
327. Leblanc, M., et al., *Alteration of CD44 and cadherins expression: possible association with augmented aggressiveness and invasiveness of endometrial carcinoma*. Virchows Arch, 2001. **438**(1): p. 78-85.
328. Kobayashi, K., et al., *Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(1): p. 55-9.
329. Novak, A. and S. Dedhar, *Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(5-6): p. 523-37.
330. Hiscox, S. and W.G. Jiang, *Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin*. J Cell Sci, 1999. **112 Pt 18**: p. 3081-90.
331. Ohtani, K., et al., *Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma*. Cancer Lett, 2002. **179**(1): p. 79-86.
332. Kobel, M., et al., *Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas*. Mod Pathol, 2006. **19**(4): p. 581-7.
333. Simpkins, S.B., et al., *PTEN mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors*. Gynecol Oncol, 1998. **71**(3): p. 391-5.
334. Uegaki, K., et al., *PTEN is involved in the signal transduction pathway of contact inhibition in endometrial cells*. Cell Tissue Res, 2006. **323**(3): p. 523-8.
335. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
336. Sakaguchi, J., et al., *Aberrant expression and mutations of TGF-beta receptor type II gene in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2005. **98**(3): p. 427-33.
337. Parekh, T.V., et al., *Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition*. Cancer Res, 2002. **62**(10): p. 2778-90.
338. Piestrzeniewicz-Ulanska, D., et al., *Expression of TGF-beta type I and II receptors in normal and cancerous human endometrium*. Cancer Lett, 2002. **186**(2): p. 231-9.
339. Yabushita, H., et al., *The association of transforming growth factor-beta 1 with myometrial invasion of endometrial carcinomas through effects on matrix metalloproteinase*. J Obstet Gynaecol Res, 2000. **26**(3): p. 163-70.
340. Yoshida, H., et al., *Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 889-97.

- 341.Kyo, S., et al., *High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival*. Hum Pathol, 2006. **37**(4): p. 431-8.
- 342.Di Nezza, L.A., et al., *Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion*. Cancer, 2002. **94**(5): p. 1466-75.
- 343.Planaguma, J., et al., *A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8846-53.
- 344.Planaguma, J., et al., *Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma*. J Pathol, 2005. **207**(4): p. 422-9.
- 345.Graves, B.J. and J.M. Petersen, *Specificity within the ets family of transcription factors*. Adv Cancer Res, 1998. **75**: p. 1-55.
- 346.Sharrocks, A.D., et al., *The ETS-domain transcription factor family*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1371-87.
- 347.Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
- 348.Oikawa, T. and T. Yamada, *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene, 2003. **303**: p. 11-34.
- 349.Dittmer, J. and A. Nordheim, *Ets transcription factors and human disease*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1377**(2): p. F1-11.
- 350.Sapi, E., et al., *Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent growth and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells*. Cancer Res, 1998. **58**(5): p. 1027-33.
- 351.Sementchenko, V.I., et al., *ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells*. Oncogene, 1998. **17**(22): p. 2883-8.
- 352.Nozawa, M., et al., *Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1348-52.
- 353.Laudet, V., et al., *Molecular phylogeny of the ETS gene family*. Oncogene, 1999. **18**(6): p. 1351-9.
- 354.Watson, D.S., A., *Ets gene family*. Oncogene reviews, ed. J.R. Jenkins, EP. 2000 London: Nature Publishing Group. p. 6393-6548.
- 355.Watson, D.L., R.; Sementchenko, VI.; Mavrothalassitis, G.; Seth, A. , *The ETS genes*. Encyclopedia of cancer. , ed. J. In: Bertino, editor. 2001, San Diego: Academic Press. p. 189-196.
- 356.Dittmer, J., *The biology of the Ets1 proto-oncogene*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 29.

357. Mattot, V., et al., [*Transcription factors of the Ets family and morphogenesis of the vascular tree*]. *J Soc Biol*, 1999. **193**(2): p. 147-53.
358. Valter, M.M., et al., *Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis*. *Cancer Res*, 1999. **59**(21): p. 5608-14.
359. Sementchenko, V.I. and D.K. Watson, *Ets target genes: past, present and future*. *Oncogene*, 2000. **19**(55): p. 6533-48.
360. Monte, D., et al., *Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors*. *Oncogene*, 1994. **9**(5): p. 1397-406.
361. Monte, D., et al., *Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81*. *Oncogene*, 1995. **11**(4): p. 771-9.
362. Xin, J.H., et al., *Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells*. *Genes Dev*, 1992. **6**(3): p. 481-96.
363. de Launoit, Y., et al., *Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors*. *Biochem Mol Med*, 1997. **61**(2): p. 127-35.
364. Schneikert, J., et al., *Androgen receptor-Ets protein interaction is a novel mechanism for steroid hormone-mediated down-modulation of matrix metalloproteinase expression*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(39): p. 23907-13.
365. Liu, Y., G.L. Borchert, and J.M. Phang, *Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18694-700.
366. Defossez, P.A., et al., *The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts TAFII60*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(22): p. 4455-63.
367. Nakae, K., et al., *ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(40): p. 23795-800.
368. Janknecht, R., et al., *The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA*. *Oncogene*, 1996. **13**(8): p. 1745-54.
369. Brown, L.A., et al., *Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor*. *Oncogene*, 1998. **17**(1): p. 93-104.
370. Baert, J.L., et al., *The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity*. *Oncogene*, 2007. **26**(3): p. 415-24.
371. Westermarck, J. and V.M. Kahari, *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*. *Faseb J*, 1999. **13**(8): p. 781-92.

- 372.Horiuchi, S., et al., *Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer*. J Pathol, 2003. **200**(5): p. 568-76.
- 373.Hida, K., et al., *Expression of E1AF, an ets-family transcription factor, is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 1997. **33**(6): p. 426-30.
- 374.Hiroumi, H., et al., *Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion*. Int J Cancer, 2001. **93**(6): p. 786-91.
- 375.Davidson, B., et al., *PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1412-9.
- 376.Galang, C.K., et al., *Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11281-92.
- 377.Protopopova, M.V., et al., *Assignment of the ERM gene (ETV5) coding for the ets-related protein to human chromosome band 3q28 by in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1996. **74**(3): p. 220.
- 378.Baert, J.L., et al., *Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells*. Int J Cancer, 1997. **70**(5): p. 590-7.
- 379.Shepherd, T. and J.A. Hassell, *Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(1): p. 129-40.
- 380.Takai, N., et al., *Clinical relevance of Elf-1 overexpression in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2003. **89**(3): p. 408-13.
- 381.Takai, N., et al., *Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma*. Cancer, 2000. **89**(10): p. 2059-67.
- 382.Potischman, N., et al., *Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(16): p. 1127-35.
- 383.Lax, S.F., et al., *Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation*. Hum Pathol, 1998. **29**(9): p. 924-31.
- 384.Sherman, M.E., et al., *Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas*. Mod Pathol, 1997. **10**(10): p. 963-8.
- 385.Abal, M., et al., *Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors*. Histol Histopathol, 2006. **21**(2): p. 197-204.
- 386.de Launoit, Y., et al., *The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1766**(1): p. 79-87.

- 387.Kaya, M., et al., *A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells*. *Oncogene*, 1996. **12**(2): p. 221-7.
- 388.Abal, M., et al., *Enhanced sensitivity to irinotecan by Cdk1 inhibition in the p53-deficient HT29 human colon cancer cell line*. *Oncogene*, 2004. **23**(9): p. 1737-44.
- 389.Arbo, M.A., et al., *Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration*. *Biomaterials*, 2006. **27**(5): p. 758-68.
- 390.De Hauwer, C., et al., *Dynamic characterization of glioblastoma cell motility*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **232**(2): p. 267-72.
- 391.Aglund, K., et al., *Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage*. *Gynecol Oncol*, 2004. **94**(3): p. 699-704.
- 392.Coussens, L.M., et al., *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis*. *Cell*, 2000. **103**(3): p. 481-90.
- 393.Kotzya, J., et al., *Progelatinase B/matrix metalloproteinase-9 proenzyme as a marker of pleural inflammation*. *Exp Lung Res*, 2004. **30**(4): p. 297-309.
- 394.Wasylyk, C., et al., *The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins*. *Embo J*, 1991. **10**(5): p. 1127-34.
- 395.Gutman, A. and B. Wasylyk, *The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites*. *Embo J*, 1990. **9**(7): p. 2241-6.
- 396.Nerlov, C., et al., *Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity*. *Oncogene*, 1991. **6**(9): p. 1583-92.
- 397.Ozaki, I., et al., *Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1*. *Hepatol Res*, 2003. **27**(4): p. 289-301.
- 398.Hahne, J.C., et al., *Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth*. *Oncogene*, 2005. **24**(34): p. 5384-8.
- 399.Taguchi, K., et al., *Two transcription factors, E1AF and N-myc, correlate with the invasiveness of neuroblastoma cell lines*. *Jpn J Cancer Res*, 1997. **88**(4): p. 394-400.
- 400.Hanzawa, M., et al., *Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(6): p. 1079-85.
- 401.Nishikawa, A., et al., *Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential*. *Gynecol Oncol*, 2000. **79**(2): p. 256-63.

- 402.Fidler, I.J., S. Naito, and S. Pathak, *Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]*. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. **9**(2): p. 149-65.
- 403.Graesslin, O., et al., *Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. **16**(5): p. 1911-7.
- 404.Gupta, G.P., et al., *Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 765-70.
- 405.Monge, M., et al., *ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6753-9.
- 406.Shafiqat, N., et al., *Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(10): p. 1205-13.
- 407.Vignjevic, D. and G. Montagnac, *Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion*. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(1): p. 12-22.
- 408.Yamaguchi, H. and J. Condeelis, *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(5): p. 642-52.
- 409.Gimona, M., et al., *Assembly and biological role of podosomes and invadopodia*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 235-41.
- 410.Acconcia, F., C.J. Barnes, and R. Kumar, *Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells*. *Endocrinology*, 2006. **147**(3): p. 1203-12.
- 411.Jakowlew, S.B., *Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 435-57.
- 412.Leivonen, S.K. and V.M. Kahari, *Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(10): p. 2119-24.
- 413.Piestrzeniewicz-Ulanska, D., et al., *TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas*. *Gynecol Oncol*, 2004. **95**(1): p. 173-80.
- 414.Jornvall, H., et al., *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)*. *Biochemistry*, 1995. **34**(18): p. 6003-13.
- 415.Gabrielli, F., et al., *A nuclear protein, synthesized in growth-arrested human hepatoblastoma cells, is a novel member of the short-chain alcohol dehydrogenase family*. *Eur J Biochem*, 1995. **232**(2): p. 473-7.

416. Pellegrini, S., et al., *A human short-chain dehydrogenase/reductase gene: structure, chromosomal localization, tissue expression and subcellular localization of its product*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1574**(3): p. 215-22.
417. Wu, W.S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 695-705.
418. Rhyu, D.Y., et al., *Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(3): p. 667-75.
419. Datta, R., et al., *Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase cbeta -dependent and required for SAPK activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41000-3.
420. Gomez, D.E., et al., *The role of protein kinase C and novel phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis (Review)*. Oncol Rep, 1999. **6**(6): p. 1363-70.
421. Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks, *Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 387-99.
422. Javelaud, D. and A. Mauviel, *Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5742-50.
423. Nawshad, A., et al., *Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 11-23.
424. Storz, P., *Reactive oxygen species in tumor progression*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1881-96.
425. Kim, M.H., et al., *Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells*. Int J Oncol, 2005. **26**(6): p. 1669-74.
426. Wilson, L.A., et al., *ets-1 is transcriptionally up-regulated by H2O2 via an antioxidant response element*. FASEB J, 2005. **19**(14): p. 2085-7.
427. Nelson, K.K., et al., *Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14100-10.
428. Yasuda, M., et al., *Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells*. Life Sci, 1999. **64**(4): p. 249-58.
429. Helguera, P., et al., *ets-2 promotes the activation of a mitochondrial death pathway in Down's syndrome neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(9): p. 2295-303.

430. Hayashi, T., et al., *L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13681-6.
431. Oppermann, U., *Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 293-322.
432. Wilson, L.A., H. Yamamoto, and G. Singh, *Role of the transcription factor Ets-1 in cisplatin resistance*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(7): p. 823-32.
433. Dowling, P., N. Walsh, and M. Clynes, *Membrane and membrane-associated proteins involved in the aggressive phenotype displayed by highly invasive cancer cells*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 4054-65.
434. Engelsens, I.B., et al., *Low BMI-1 expression is associated with an activated BMI-1-driven signature, vascular invasion, and hormone receptor loss in endometrial carcinoma*. Br J Cancer, 2008. **98**(10): p. 1662-9.
435. Sivridis, E., *Angiogenesis and endometrial cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(6B): p. 4383-8.
436. Tsukamoto, H., et al., *Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(6): p. 423-9.
437. Greengauz-Roberts, O., et al., *Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens*. Proteomics, 2005. **5**(7): p. 1746-57.
438. Rodriguez, A.S., et al., *Automated laser capture microdissection for tissue proteomics*. Methods Mol Biol, 2008. **441**: p. 71-90.
439. Wilson, K.E., et al., *Comparative proteomic analysis using samples obtained with laser microdissection and saturation dye labelling*. Proteomics, 2005. **5**(15): p. 3851-8.
440. Kondo, T. and S. Hirohashi, *Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2940-56.
441. Doi, D., T. Araki, and G. Asano, *Immunohistochemical localization of tenascin, estrogen receptor and transforming growth factor-beta 1 in human endometrial carcinoma*. Gynecol Obstet Invest, 1996. **41**(1): p. 61-6.
442. Sivridis, E., et al., *Thymidine phosphorylase expression in endometrial carcinomas*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(5): p. 445-50.
443. Sedlmayr, P., et al., *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in carcinoma of human endometrium and uterine cervix*. Adv Exp Med Biol, 2003. **527**: p. 91-5.

- 444.Vignjevic, D., et al., *Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6844-53.
- 445.Rao, A.K., et al., *Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on estrogen responsiveness and oxidative stress in human breast cancer cells*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(5): p. 1113-24.
- 446.Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
- 447.Florczyk, U.M., A. Jozkowicz, and J. Dulak, *Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance*. *Pharmacol Rep*, 2008. **60**(1): p. 38-48.
- 448.Llobet, D., et al., *Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells*. *Anticancer Drugs*, 2008. **19**(2): p. 115-24.

Publicacions

PUBLICACIONS

[Cancer Research 2007;67 (14):6753–9]

ERM/ETV5 Up-regulation Plays a Role during Myometrial Infiltration through Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Endometrial Cancer

Marta Monge¹, Eva Colas¹, Andreas Doll¹, Marta Gonzalez¹, Antonio Gil-Moreno^{2,5}, Jesús Planaguma¹, Maite Quiles¹, Maria Antònia Arbos¹, Àngel Garcia^{3,5}, Josep Castellvi^{3,5}, Marta Llauro¹, Marina Rigau¹, Hafid Alazzouzi¹, Jordi Xercavins^{2,5}, Francesc Alameda^{4,5}, Jaume Reventos^{1,5} and Miguel Abal¹

¹Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón; Departament de ²Ginecologia Oncològica i ³Patologia, Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ⁴Departament de Patologia, Hospital del Mar; ⁵Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya

Recentment en el nostre grup hem descrit la sobreexpressió de ERM/ETV5, factor de transcripció de la família Ets, en el carcinoma endometrial endometriode (EEC) i que es mostra associat a la infiltració miometrial. Els membres de la família Ets mostren correlació amb la progressió tumoral mitjançant la sobreexpressió de proteases degradadores de matriu. En aquest estudi, analitzem la possibilitat que en el carcinoma endometrial, ERM/ETV5 pugui actuar induint l'expressió de gens implicats en la remodelació de la matriu extracel·lular. La possibilitat de desxifrar els successos moleculars associats a l'inici de la invasió tumoral representaria una millora important per a les pacients amb EEC. La sobreexpressió de ERM/ETV5 a la línia cel·lular de càncer d'endometri Hec-1A induïx dispersió cel·lular, fet que correlaciona amb un augment de l'activitat gelatinasa de la metal·loproteinasa MMP-2. Tant els experiments d'immunoprecipitació de cromatina com els experiments amb RNA d'interferència o l'ús d'un inhibidor específic de MMP-2 mostren un nexa funcional entre la sobreexpressió de ERM/ETV5 i l'activació de MMP-2. En el model animal ortotòpic de carcinoma endometrial es demostra que l'augment de l'activitat de MMP-2 associat a la sobreexpressió de ERM/ETV5 confereix major capacitat invasiva als tumors endometrials. Els tumors ortotòpics implantats amb sobreexpressió de ERM/ETV5 mostren un patró més agressiu i infiltrant d'invasió miometrial. I, finalment, la hipòtesis que ens plantejàvem es basava en que ERM/ETV5 tindria un paper en els passos inicials de la disseminació endometrial. Aquesta hipòtesi es confirma en mostrar-se la localització de ERM/ETV5 i MMP-2 en el front d'invasió de mostres de carcinomes endometrials humans amb infiltració miometrial. Analitzant les dades obtingudes, aquests resultats ens permeten proposar que en el EEC, ERM/ETV5 actua a través de l'activitat gelatinolítica de MMP-2 per a donar major capacitat invasiva, associat al punt d'inici de la

infiltració miometrial. Amb les dades obtingudes i els treballs previs realitzats al grup, podria considerar-se ERM/ETV5 com a un potent marcador per a la classificació de les pacients amb EEC, així com per buscar teràpies específicament dirigides als inicis de la disseminació endometrial.

[Cancer Research 2007;67 (14):6753–9]

ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through MMP-2 activation in endometrial cancer

Marta Monge,^{1*} Eva Colas,^{1*} Andreas Doll,¹ Marta Gonzalez,¹ Antonio Gil-Moreno,^{2,5} Jesús Planagumà,¹ Maite Quiles,¹ Maria Antònia Arbos,¹ Àngel Garcia,^{4,5} Josep Castellví,^{4,5} Marta Llaurodo,¹ Marina Rigau,¹ Hafid Alazzouzi,¹ Jordi Xercavins,^{2,5} Francesc Alameda,^{3,5#} Jaume Reventos,^{1,5#} and Miguel Abal^{1#}

¹Research Institute Vall d'Hebron University Hospital; ²Gynecological Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital; ³Pathology Department, Hospital del Mar; ⁴Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital; ⁵Faculty of Medicine, Autònoma University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Running title: ETV5 and an initial switch to endometrial cancer invasion.

Key Words: endometrial cancer, ERM/ETV5, MMP-2, myometrial infiltration.

* Equally contributed

Principal investigators

Request for reprints: Miguel Abal, Biomedical Research Unit, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Email: mabal@ir.vhebron.net

Grant Support: This work was supported in part by Institut Català de la Salut and Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants FIS 02/0733, FIS 05/06771 and FIS CP05/00240), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2005-06771), Fundació La Marató de TV3 (grant 050430), DURSI (grant 2001SGR00391), ISCIII-RETIC RD06/0020. MM is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 02/0733), EC from Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2006-14152) .

Abstract

We have recently described the Ets family transcription factor, ERM/ETV5, specifically up-regulated in endometrioid endometrial carcinoma (EEC), and associated with myometrial infiltration. Ets family members have been correlated to tumor progression by up-regulating the expression of matrix-degrading proteases. In the present study, we investigated the possibility that in EEC ERM/ETV5 may act by inducing the expression of genes involved in extra-cellular matrix remodeling. Unraveling the molecular events associated with the initiation of tumor invasion would represent an obvious improvement for EEC patients.

The overexpression of ERM/ETV5 induced scattering in the endometrial cancer cell line Hec-1A, correlating to increased MMP-2 gelatinase activity. Both chromatin immunoprecipitation and reversion experiments with RNA interference and specific MMP-2 inhibitor demonstrated a functional link between ERM/ETV5 overexpression and MMP-2 activation. The increased MMP-2 activity associated with overexpressed ERM/ETV5 in a mouse model conferred invasive capacity to endometrial tumors. Orthotopically implanted overexpressing ERM/ETV5 tumors presented a more aggressive and infiltrative pattern of myometrial invasion. Finally, the specific localization of ERM/ETV5 and MMP-2 at the invasive front of myometrial infiltrating human endometrial carcinomas further reinforced the hypothesis of a role for ERM/ETV5 in the early steps of endometrial dissemination.

Taken together, these results lead us to propose that in EEC, ERM/ETV5 acts through MMP-2 gelatinolytic activity to confer invasive capabilities, associated with an initial switch to myometrial infiltration. They also postulate ERM/ETV5 as a valuable marker for patient stratification and a transcription pathway that should be evaluated for therapies specifically targeting the initial steps of EEC dissemination.

Introduction

The tumorigenesis of sporadic endometrial cancer, the most common gynecological malignancy encountered in western countries, is commonly explained on the basis of a dualistic model that discriminates between Type I endometrioid (EEC) and Type II non-endometrioid (NEEC) endometrial tumors from both biological and clinical parameters (1). EECs represent the majority of cases of sporadic endometrial cancer (70-80%), with unopposed oestrogen stimulation as the etiological factor associated with the development of the carcinoma (2). EECs usually develop in pre- and peri-menopausal women, express oestrogen (ER) and progesterone (PR) receptors (3), and are associated with elevated levels of serum estradiol (4). Histologically, most tumors are of low grade, they are frequently preceded by endometrial hyperplasia and, overall, are characterized by a favorable prognosis. Nonetheless, myometrial affectation, as the initial event in tumor invasion and distant dissemination, determines an increase in the rate of recurrence after a first surgical treatment and a decrease in survival at the five-year follow-up.

From a molecular point of view, PTEN gene silencing, microsatellite instability associated with defects in DNA mismatch repair genes (i.e., MLH1), and mutations in the K-ras gene have been described as the major alterations defining the activation of EEC tumorigenesis, from normal endometrium to hyperplasia and then on to carcinoma. Nevertheless, the molecular determinants for steps towards advanced tumorigenesis, such as the transitions from a localized to an infiltrating tumor and to a metastatic stage, remain more elusive (5). We have recently characterized the up-regulation of the ERM/ETV5 gene in EEC with a specific and significant increase restricted to those tumor stages associated with myometrial invasion (6, 7). ERM/ETV5 belongs to the PEA3 sub-family, included in the Ets family of transcription factors. This family is characterized by a sequence of approximately 85 amino acids in an evolutionarily-conserved DNA-binding domain that regulates the expression of a variety of genes by binding to a central A/GGAA/T core motif, in cooperation with other transcriptional factors and co-factors (8, 9).

More to the point, tumor progression and the increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs), a family of neutral proteinases that catalyze the destruction of the extracellular matrix, were found to be closely related with the tumor invasive capacities promoted by Ets transcription factors (10). Active gelatinases have been described in endometrial carcinoma, resulting in alterations to the microenvironment that promotes tumor invasion and metastasis (11, 12). In the present study, we investigated the possibility that ERM/ETV5 may play a part in the initial switch to myometrial infiltration by inducing the expression of the genes involved in extra-cellular matrix remodeling.

Materials and Methods

Cell Culture, Constructs and Stable Cell Line Generation. Hec-1A cells (provided by C. Simon from the Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia, Spain), were cultured in McCoy's 5A medium with GlutaMAX™ supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO, Invitrogen, CA).

Plasmid construction consisted of the full-length human ERM/ETV5 being removed with EcoRI from the pSV-hERM/ETV5 construct (a generous gift from Dr. Chotteau-Lelievre, Institut de Biologie de Lille, UMR8117, Lille, France). It was then inserted at the EcoRI position at the multiple cloning site of the pEGFP-C2 vector (BD Biosciences, San Jose, CA). The correct ERM/ETV5 orientation and reading frame were confirmed by sequencing.

Hec-1A cells were transfected with Fugene 6 (Roche Diagnostics, Switzerland) and either the pEGFP-C2 vector alone or the hERM/ETV5 containing pEGFP-C2 vector. Hec-1A cells stably expressing the GFP or GFP-ERM/ETV5 were established by incubation with 500 µg/ml of geneticin G-418 (GIBCO, Invitrogen, CA).

Western Blot. Western blotting was performed as previously described (13). The primary antibodies used were 1/400 mAb α -actin (NeoMarkers, Lab Vision Corporation, CA) and 1/100 rAb ERM/ETV5, and membranes were revealed with HRP-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark) and the SuperSignal® West Dura substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Gelatin zymography. Active gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9) were analyzed in cell lysates by gelatin zymography as previously described (14). The negative bands correlating to gelatinase activity within the zymograms were quantified by densitometric analysis. At least five independent experiments were performed.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). GFP-ERM/ETV5 ChIP on HEC-1A GFP and HEC-1A GFP-ERM/ETV5 cells were performed as per manufacturer's recommendations for mAb GFP (Roche Diagnostics, Switzerland) and rAb ERM/ETV5. Rabbit acetyl-Histone H4 (Upstate, Lake Placid, NY) and normal rabbit IgGs (Upstate, Lake Placid, NY) were used as positive and negative controls, respectively. For PCR analysis, 1 µl of input DNA extraction and 10 µl of immunoprecipitated DNA were used for 35 cycles of amplification (annealing temperature 60°C). The primers for MMP-2 were obtained from the Thermo Electron Corporation (Waltham, MA). The sequences were as follows: reverse primer: TAAAGGAAGCACCC and forward primer: ACCCAGCACTCCAC. The 18S gene (reverse: CTTGTAAGTGGCGTGGATTCTGC; forward: GATGGGCGGCGGAAAAT) was used as a control.

siRNA sequences and transfection. Cells were transfected with 100 nM of eGFP and negative control siRNA (reference: #4626; Ambion, Tx) using standard electrotransfection (10^6 cells/125 μ l in a BioRad (Bio-Rad, Hercules, CA) gene pulser cuvette 0.2 cm, 250 V, 250 μ F, infinite resistance). Following electroporation, samples were immediately combined with fresh culture medium. Cells were plated and incubated at 37°C for 42h, followed by RNA and protein extraction, and videomicroscopy assays.

Total RNA isolation and assay by quantitative real-time PCR (RT-Q-PCR). Total RNA was extracted and purified using RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). RT-Q-PCR was performed as previously described (7). Human actin (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to normalize.

Videomicroscopy. Cells treated with the negative control siRNA or GFP siRNA, or incubated in the presence or not of a specific MMP-2 inhibitor III (12,5 nM; Calbiochem, Darmstadt, Germany), were kept in a computer-controlled mini-incubator which provided stabilized temperature of 37 ± 0.5 °C, with 95% humidity and 5% CO₂, and optical transparency for microscopic observations. The incubator was fastened to an inverted microscope (Live Cell Imaging CellR, Olympus, Japan). Images were taken with the 10X objective every 30 min at least for 24 h.

At least 100 cells per video were manually tracked using the WCIF ImageJ software. Comparisons between cell trajectories from the different cell types and conditions were determined by the maximum relative distance to origin (MRDO) parameter (15). All experiments were done in triplicate, at least.

Animal model. 5-week-old female athymic Swiss Webster mice (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA) were used for this study. The animals were housed in individually ventilated cage units and were maintained under pathogen-free conditions. Food and water were provided *ad libitum*. Animal care and experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Spanish Council on Animal Care.

Subcutaneous xenografts were established by the implantation of 2×10^6 HEC-1A, HEC-1A GFP and HEC-1A GFP-ERM/ETV5 tumor cells in 200 μ l PSB into the subscapular region of two nude mice per cell line. The animals were sacrificed at six weeks, and the tumors were dissected for orthotopic implantation.

For orthotopic implantation, 4 mice per cell line were operated on by medial laparotomy. The retroperitoneum was opened, and a tissue block of approx. 1 mm³ of the generated subcutaneous tumors was implanted onto the posterior face of the uterus, making a pocket to isolate the tumor tissue from the rest of the organs in the abdominal cavity. The organs were reintroduced into the abdominal cavity, and the retroperitoneum and skin were then closed with

surgical suture. Two weeks later, the animals were sacrificed by cervical dislocation, the peritoneal cavity was opened and the tumor was formalin-fixed and processed for histological examination by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry.

Immunohistochemistry and in situ zymography. The EEC invasive front tissue microarray (TMA), constructed with tumors from the Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain), included 100 endometrioid, 12 serous papillary, 7 clear cell, 1 mucinous and 6 adenosquamous carcinomas. The TMA was constructed with cores corresponding to the inner part of the tumor and to the invasive border. The protocol was approved by the Institutional Review Board, and informed consent was obtained from all of the patients.

Immunohistochemistry was performed as described (7). The primary antibodies used were ERM/ETV5 (1:50; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and MMP-2 (prediluted ab15478; Abcam, Cambridge, UK).

Alternatively, DQTM gelatin processing for gelatinase activity on 7 micrometer-thick unfixed frozen sections of stage IC EECs was performed as manufacturers instructions (EnzCheck®; Molecular Probes, OR). Sections incubated either without DQTM gelatin or incubated with 50 μ M 1,10-phenanthroline to block MMP activation were used as controls.

Statistical analysis. The Statistical Package for Social Science (SPSS 12.0) was used. The non-parametric Kruskal-Wallis test was applied to gel and in situ zymography, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test to cell migration data, while comparisons between different groups of samples in the TMA were analyzed using Spearman Rho non-parametric statistics.

Results

ERM/ETV5 over-expression in the Hec-1A cell line resulted in enhanced MMP-2 activity.

The human endometrial cancer cells, Hec-1A, were transfected with pEGFP-ERM/ETV5 or pEGFP without insert as a control (see M&M), and stable transfectants were selected with geneticin following transfection. Western blot analysis showed similar levels of endogenous ERM/ETV5 expression for all three cell lines, while only Hec-1A GFP-ERM/ETV5 expressed the fusion protein GFP-ERM/ETV5 (Fig. 1A). As expected, both the endogenous and the fusion protein were localized in the nucleus (see Suppl. Fig. 1). The homogeneity of the selected cell lines was assessed by flow cytometry (data not shown).

Within the established cell lines, we determined whether the over-expression of ERM/ETV5 could influence protease activity. For this purpose, we examined the activity of the two main MMPs described in endometrial cancer, gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9, respectively), by enzymatic zymography (16). A representative example of a gelatin-embedded gel is shown in Fig. 1B, where the gelatinase activity of the total protein extracts from Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 was directly proportional to the band intensities. Increased intensity, corresponding to the active form of MMP-2, was found in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line when compared to the Hec-1A cells and those transfected with GFP. The densitometry quantification of at least five gelatinase activity assays resulted in a statistically significant increase in MMP-2 activity in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line ($p < 0.005$; Fig. 1C). No significant differences were found between the two control cell lines (Fig. 1C), and no gelatinase MMP-9 activity was found among the three cell lines (Fig. 1B). These data suggested a correlation between ERM/ETV5 over-expression and increased MMP-2 activity in the Hec1A endometrial cancer cell line.

ChIP demonstrated a direct interaction between ERM/ETV5 and the MMP-2 promoter.

Next, by chromatin immunoprecipitation, we assessed whether ERM/ETV5 *in vivo* bound to the MMP-2 promoter in the established cell lines. Briefly, cells were fixed with formaldehyde, and soluble chromatin was fragmented by the sonication of cross-linked nuclei. Chromatin fragments in the range of 500–1000 bp were immunoprecipitated by specific antibodies (GFP and ERM/ETV5). Purified genomic DNA from the immunoprecipitated chromatin was subjected to semi-quantitative PCR using primers covering the 411-bp proximal region of the human MMP-2 promoter (Fig. 2A). Control reactions using IgG isotype did not exhibit specific immunoprecipitation, while reactions containing antibodies to ERM/ETV5 or GFP to a lesser extent demonstrated specific binding to this region of the MMP-2 promoter in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line (Fig. 2B). Further controls showed no specific GFP antibody-mediated immunoprecipitation with fragmented chromatin from the Hec-1A GFP cell line, neither when PCR amplification was performed covering a promoter without putative Ets binding sites as for the gene 18S (Fig. 2B).

ERM/ETV5 over-expression promoted MMP-2 dependent cell migration and scattering in the Hec1A endometrial cancer cell line. Hec-1A cells over-expressing GFP-ERM/ETV5 demonstrated enhanced mobility compared to the control non-transfected or GFP-transfected cell lines, as evidenced by video microscopy and cell migration tracking (Fig. 3). Representative examples of the trajectories followed by the Hec-1A and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells are represented (Fig. 3A-C). Enhanced MRDO values, as the maximal relative distance covered by the cells, corresponding to Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells showed statistical significance when compared to Hec-1A or Hec-1A GFP cells ($p < 0,001$; Fig. 3F). A gradual increase in MRDO levels was found when Hec-1A cells expressing low levels of the fusion protein were compared to high GFP-ERM/ETV5 expressing cells (see Suppl. Fig. 2).

RNA interference directed against the GFP to knockdown the over-expressed fusion protein GFP-ERM/ETV5, without interfering with the endogenous ERM/ETV5, reversed the activation of MMP2 to the levels found in the control cell lines, as shown by gel zymography (Fig. 3E). Likewise, GFP siRNA resulted in the reversion of the increased Hec-1A GFP-ERM/ETV5 migration (Fig. 3F). The resulting MRDO levels for the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells when the expression of the fusion protein was silenced by a 58% (RT-Q-PCR; Fig. 3D) to a 72 % (WB; Fig. 3E), were significantly lowered to those observed within the Hec-1A or Hec-1A GFP control cell lines. MRDO levels in these control cell lines were unaffected by the interference with neither the negative control nor the GFP siRNA ($p < 0,001$; Fig. 3F). Finally, the increased MRDO levels were also restored to those found in the control Hec-1A cell lines by the specific MMP-2 inhibitor III ($p < 0,001$; Fig. 3F), further indicating the mediation of MMP-2 activity in the promotion of migration induced by the over-expression of ERM/ETV5.

Moreover, the evaluation of cell scattering by the percentage of isolated cells (five representative culture fields, approximately 300 cells per field) rendered statistical significance ($p = 0,001$) associated with the over-expression of ERM/ETV5 (10%; Fig. 3C), compared to the non-transfected (4,7%; Fig. 3B) or the GFP transfected (4,3%; not shown) Hec-1A cells. Again, this effect could be reversed by incubation with an inhibitor of MMPs (50 μ M 1,10-phenanthroline), reinforcing a functional link between ERM/ETV5 and MMP-2.

All together, the results obtained with the developed Hec-1A cell lines indicated that ERM/ETV5 promotes the migratory capacity of endometrial tumor cells by activating MMP-2 gelatinase through direct interaction with its promoter region.

Increased gelatinase activity in ERM/ETV5 over-expressing tumors was related to myometrial infiltrating phenotypes in a mouse model. To analyze the implications of overexpressed ERM/ETV5 for tumor invasion in a three-dimensional system within an accurate tissue environment, we generated *in vivo* orthotopic models for endometrial cancer (Doll et al., unpublished). Briefly, we generated tumors in nude mice by subcutaneous injection of the Hec-1A GFP-ERM/ETV5, Hec-1A GFP, and untransfected Hec-1A cell lines. Then, tumor pieces of 1mm³ originating from each cell line were implanted onto the posterior face of the uterus, and

two weeks post-implantation, the tumors were analyzed for MMP-2 expression and activity and for myometrial infiltration.

Immunohistochemistry showed that the basal levels of MMP-2 expression associated with the endogenous ERM/ETV5 in the tumors originating from the control Hec-1A (not shown) or Hec-1A GFP (Fig. 4A) cell lines. In contrast, the tumors derived from the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line markedly stained for MMP-2 (Fig. 4B). Extracts from these tumors were incubated in the presence of a fluorescent-conjugate of gelatin, DQTM Gelatin, in order to assess their gelatinolytic activity (see M&M). In those tumors derived from the Hec-1A GFP-ERM/ETV5, the increase ($p=0,008$) in fluorescence was indicative of further processing of the gelatin conjugate (Fig. 4C).

Interestingly, when we analyzed the interface between the orthotopic tumors and the myometrium of the mice, we observed differences at the initial steps of myometrial invasion. Tumors originating from Hec1A GFP-ERM/ETV5 presented an infiltrative pattern at two weeks post-implantation (Fig. 4E), compared to a more expansive pattern of invasion in the Hec1A (data not shown) or Hec1A GFP (Fig. 4D) tumors. Three out of four animals presented tumoral lesions that internalized into the myometrium associated with the overexpression of ERM/ETV5, compared to only one out of four animals in the Hec-1A GFP derived tumors. The median number of invasive lesions for the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 tumors was 16 ± 5.9 , while 12 lesions per 2 mm of myometrium interface in the unique GFP control animal that presented myometrial infiltration.

These results permitted us to translate the association between ERM/ETV5 and MMP-2 to the three dimensional structure of an *in vivo* model. Furthermore, they revealed the contribution of ERM/ETV5 overexpression to a more aggressive and infiltrative pattern at the initial steps of myometrial invasion in endometrial cancer.

Gelatinolytic activity in human endometrial carcinoma. Using *in situ* zymography with the fluorescent-conjugate gelatin, DQTM Gelatin, we next examined the gelatinase activity in tumoral tissue sections from human samples with elevated levels of ERM/ETV5 expression as assessed by RT-Q-PCR (7). A representative tissue section corresponding to a stage IC EEC demonstrated, in an area with profuse tumoral glands (see DAPI staining in Fig. 5B), a specific fluorescent labeling indicative of gelatinase activity, mainly within the epithelial glands and with low activity in the stromal compartment (Fig. 5A). The specificity of the assay was further demonstrated on a consecutive section from the same stage IC EEC sample, incubated with DQTM Gelatin and the gelatinase inhibitor 1,10-phenanthroline (Fig. 5C), which showed almost completely reversed gelatinase activity in the same epithelial glands (Fig. 5D). A consecutive section incubated without DQTM gelatin as an auto-fluorescence control rendered negative results (data not shown).

These data broaden the correlation found in the *in vitro* and *in vivo* models between ERM/ETV5 expression and MMP-2 gelatinase activity to human samples.

MMP-2 protein expression correlated to ERM/ETV5 up-regulation in human endometrial carcinomas with a marked increase at the invasive front. We finally examined the association between ERM/ETV5 and MMP-2 in human EEC tumor samples. First, we performed immunohistochemistry on a TMA constructed with representative areas from 74 EECs (6). The statistical treatment of the TMA assay indicated a strong correlation between MMP-2 and ERM/ETV5 protein expression ($p < 0,001$; see Suppl. Fig. 3). Second, we analyzed in more detail the eventual role of these proteins in myometrial infiltration using an invasive front TMA constructed with a series of 126 infiltrative human endometrial cancer samples (see M&M). ERM/ETV5 was found positive in 107 cases (84.9%) and MMP-2 in 114 (90.5%), confirming that the high levels of these proteins were associated with myometrial infiltration. More interestingly, when we examined the interface between the tumor and the myometrium, we could find a marked increase in ERM/ETV5 and MMP-2 expression at the invasive cores in 77.2% of the MMP-2 positive cases and 61.7% of the ERM/ETV5 positive cases. In those areas where the tumor glands infiltrated the myometrium at the invasive front, the intensity of both ERM/ETV5 (Fig. 6B) and MMP-2 (Fig. 6D) staining increased compared to the inner areas of the tumor (Fig. 6A-B). These results demonstrated the concomitant up-regulation of ERM/ETV5 and MMP-2 at the invasive front of myometrial infiltrating human carcinomas.

Discussion

In the present study, we have characterized the gelatinase activity associated with ERM/ETV5 up-regulation during the early stages of endometrial tumorigenesis, associated with an initial switch to myometrial infiltration. First, we demonstrated that the overexpression of the transcription factor ERM/ETV5 in the endometrial cancer cell line, Hec-1A, resulted in enhanced MMP-2 gelatinase activity. Gelatinase A (MMP-2, 72 kDa) is primarily responsible for the degradation of the helical domains of type IV collagen, the principal collagen of basement membranes. Conserved PEA3 elements, which bind members of the Ets transcription factors, have been found in all inducible matrix metalloproteinase promoters (17). Correspondingly, we could demonstrate the specific binding of ERM/ETV5 to the promoter region of the MMP-2 in the established Hec-1A cell lines. Second, ERM/ETV5 up-regulation and MMP-2 gelatinase activity were further confirmed in orthotopic mouse models originating from the different cell lines. The overexpression of ERM/ETV5 resulted in both increased MMP-2 levels and proteolytic cleavage of a fluorescent derivative of gelatin. Finally, TMA immunohistochemistry demonstrated a significant correlation between ERM/ETV5 and MMP-2 protein expression in the epithelial glands of more than 70 human carcinoma samples, representative of the tumorigenesis process in EEC. In accordance with these results, MMP-2 expression has recently been proposed to have a predictive value for stage I endometrial cancers (16). Likewise, the *in situ* zymography demonstrated that increased MMP-2 expression corresponded to enhanced gelatinolytic activity, localized to the epithelial glands in endometrial carcinoma sections from stages IC, where ERM/ETV5 had been described to be specifically up-regulated (7). The other gelatinase, MMP-9, has been mainly associated with inflammatory infiltration (18, 19). The fact that no inflammatory infiltration was present in the EEC sections analyzed in this study suggests that the gelatinolytic activity we observed in our *in situ* zymography series was mainly the result of MMP-2 activity.

These results extend to endometrial cancer the results of those studies that describe a correlation between the expression of members of the Ets family and genes involved in extracellular matrix remodeling. Ets-1 controls the expression of two metalloproteinase gene promoters, stromelysin-1 (MMP-3) (20) and collagenase-1 (MMP-13) (21), and the urokinase-type plasminogen activator (u-PA) promoter (22). Induced by the hepatocyte growth factor, it stimulates the over-expression of MMP-7 in human hepatocellular carcinoma (23). ETV4, another Ets family transcription factor, has been implicated in tumor progression through the induction of MMP expression in human colorectal and gastric cancer (24). However, no correlation in ERM/ETV5 expression and MMP activity has been found in gastric and colorectal cancer (24).

We went further and analyzed what this correlation could mean to endometrial carcinoma. We were able to find a functional link between the over-expression of ERM/ETV5, resulting in enhanced motility and scattering of the Hec-1A cells, and the increased gelatinase activity that modifies the cell-substrate interface. Both RNA interference and specific inhibition of the gelatinase activity were able to reverse the scatter effect of ERM/ETV5 over-expression.

Accordingly, Ets-1 over-expression demonstrated improved migratory properties in tumoral epithelial HeLa cells (25). Moreover, it has been found to be involved in cell migration and tumor invasion, correlating to the increase in the proteolytic activity of the invading cancer cells (26). Similarly, ETV4 has been involved in the invasive potential of cancer cell lines, such as neuroblastoma (27), oral squamous cell carcinoma (28), and ovarian cancer (29).

Furthermore, we demonstrated within the animal model that the migratory capabilities conferred by ERM/ETV5 were translated into a more aggressive pattern of myometrial invasion, with an infiltrative profile at the invasion front of the tumor. These results also reinforced the accuracy of orthotopic models, compared to subcutaneous tumor implantations, for the study of the mechanisms involved in the metastasis process, comprising the initial steps of adjacent tissue invasion (i.e., myometrial infiltration in EEC). Tumor implantation at the original tissue site is essential, since the outcome of metastasis depends on the interaction of the metastatic cells with the different organ environments (30). Finally, the invasive properties of ERM/ETV5 overexpressing tumors were corroborated at the human carcinoma level. In addition to the characterization of the specific ERM/ETV5 up-regulation in IC stage EECs, associated with >50% of myometrial infiltration (7), we were able to demonstrate a marked increase in ERM/ETV5 and MMP-2 labeling at the invasive front of the tumor, suggesting an active and coordinated role for these proteins at the time of myometrial infiltration. In accordance with all this data, high MMP-2 and low TIMP-2 expression were described as the most potent markers of endometrial tumors with a high risk for local and distant spread (31). Also, MMP-2 has been recently involved in the sequential promotion of pulmonary metastasis when expressed in human breast cancer cells (32).

All of this prompts us to suggest that in EEC, ERM/ETV5 could be acting through MMP-2 to confer the invasive capabilities associated with an initial switch to myometrial infiltration. Unraveling the molecular events in EEC associated with the initiation of tumor invasion, would represent an obvious improvement in the pursuit of rational targets for the onset of metastasis. This knowledge would also be a valuable tool for the molecular stratification of patients, since myometrial affectation determines an increase in the rate of recurrence after a first surgical treatment and a decrease in survival at the five-year follow-up.

Acknowledgements

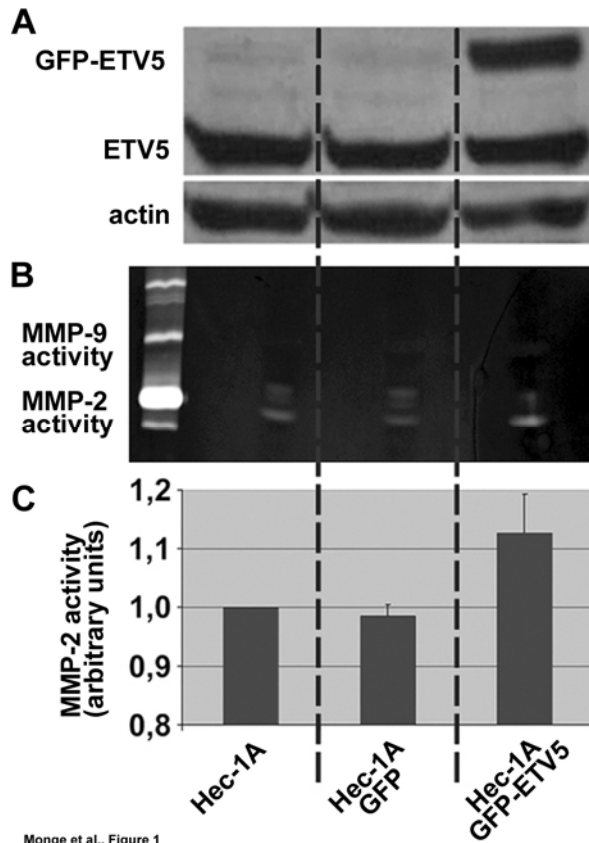
The authors would like to thank J. Seoane for consulting on CHIP, S. Martinez-Arca and J.C. Rodriguez-Manzaneque for critical discussion, and L. Piccione for correction of the manuscript.

References

1. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997;81:228-32.
2. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1127-35.
3. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation. *Hum Pathol* 1998;29:924-31.
4. Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, et al. Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod Pathol* 1997;10:963-8.
5. Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histol Histopathol* 2006;21:197-204.
6. Planaguma J, Diaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, et al. A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:8846-53.
7. Planaguma J, Abal M, Gil-Moreno A, et al. Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005;207:422-9.
8. de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:79-87.
9. Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998;75:1-55.
10. Kaya M, Yoshida K, Higashino F, et al. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* 1996;12:221-7.
11. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer* 2000;89:2059-67.
12. Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002;94:1466-75.
13. Abal M, Bras-Goncalves R, Judde JG, et al. Enhanced sensitivity to irinotecan by Cdk1 inhibition in the p53-deficient HT29 human colon cancer cell line. *Oncogene* 2004;23:1737-44.

14. Arbos MA, Ferrando JM, Quiles MT, et al. Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration. *Biomaterials* 2006;27:758-68.
15. De Hauwer C, Camby I, Darro F, et al. Dynamic characterization of glioblastoma cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:267-72.
16. Aglund K, Rauvala M, Puistola U, et al. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 2004;94:699-704.
17. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 1999;13:781-92.
18. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000;103:481-90.
19. Kotyza J, Pesek M, Puzman P, Havel D. Progelatinase B/matrix metalloproteinase-9 proenzyme as a marker of pleural inflammation. *Exp Lung Res* 2004;30:297-309.
20. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J* 1991;10:1127-34.
21. Gutman A, Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J* 1990;9:2241-6.
22. Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* 1991;6:1583-92.
23. Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepato Res* 2003;27:289-301.
24. Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, et al. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003;200:568-76.
25. Hahne JC, Okuducu AF, Kaminski A, et al. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth. *Oncogene* 2005;24:5384-8.
26. Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2003;2:29.
27. Taguchi K, Yoshida K, Sasaki F, Fujinaga K. Two transcription factors, E1AF and N-myc, correlate with the invasiveness of neuroblastoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:394-400.

28. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, et al. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 2000;21:1079-85.
29. Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, et al. Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol Oncol* 2000;79:256-63.
30. Fidler IJ, Naito S, Pathak S. Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:149-65.
31. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, et al. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1911-1917.
32. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007;446:765-70.

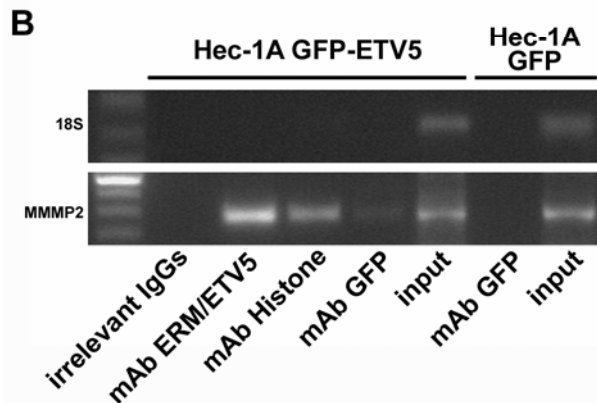


Monge et al., Figure 1

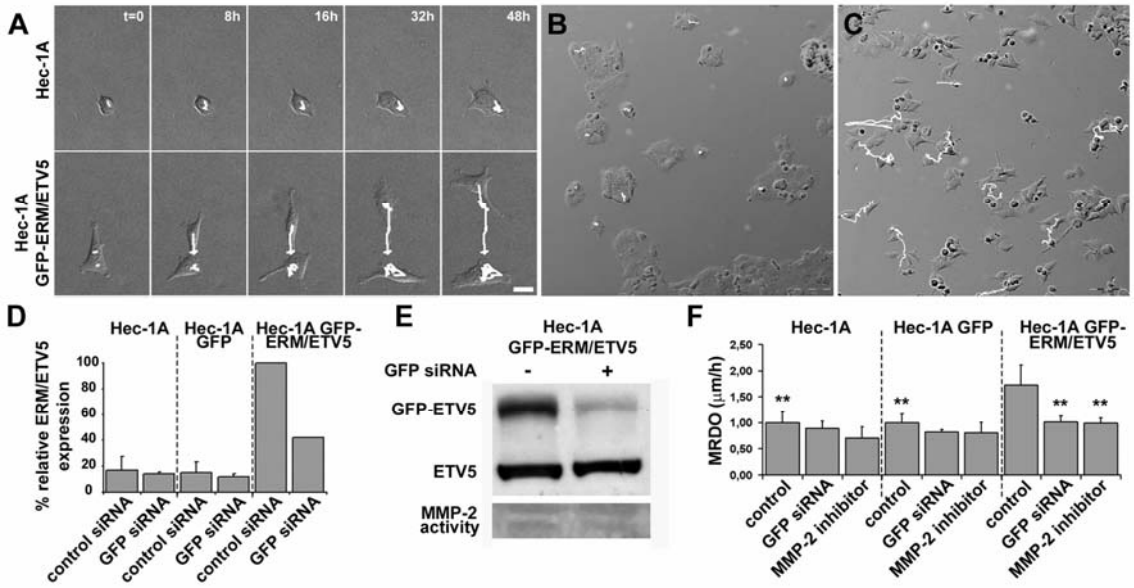
A

```

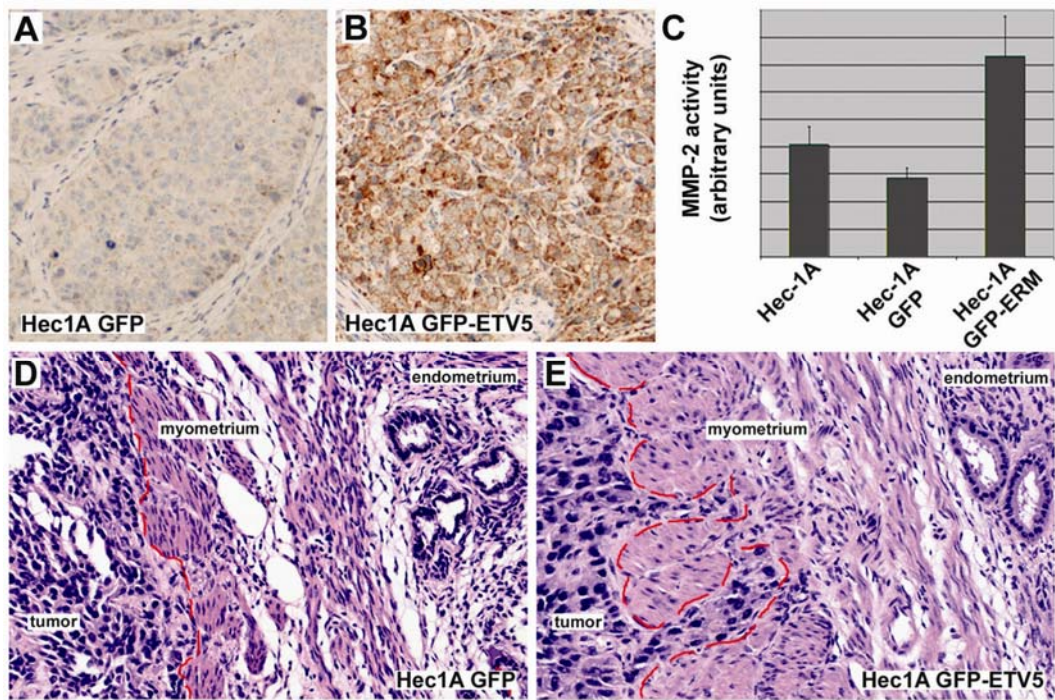
aaacttcttccagtgcccttgctgttttcatctctgggccattgtcaatgtccctaaaa
cattccccatattccccaccagcactccactctttagctctcaggctcagctcaga
MMP2 P3F →
agtcacttctccaggaagcctccttgattgtcttactagttaggggctgaagtcaggc
Ets-1
gtcccaacagcctgctggagttcccatcacagcttatctcaactgtcttctgagag
agggagaagacattcctcagagacggtgtcacagggagaacttcaaattggatt
PEA3
cgacctgagaggccacatggattcttgctggcgcaggaaggattcaagagtgagt
ggggaattcgtggaactgaggctcctccccttttagaccatagggtaaacctccc
acattgccatggcattatacactgccatggcactggtgggtgcttctttaacatgcta
ATGcat
← MMP2 P3R
→ MMP2 PEA3
    
```



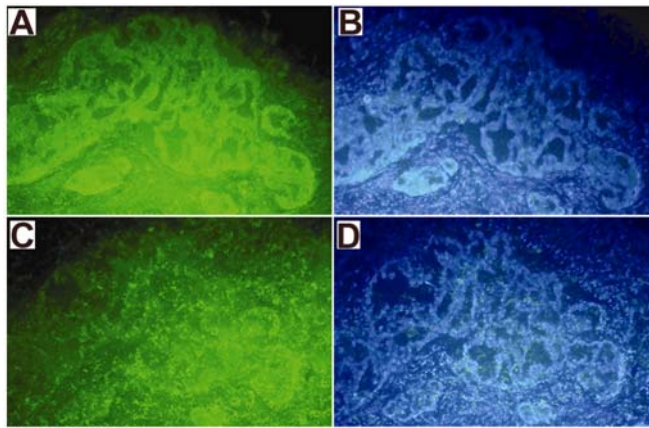
Monge et al., Figure 2



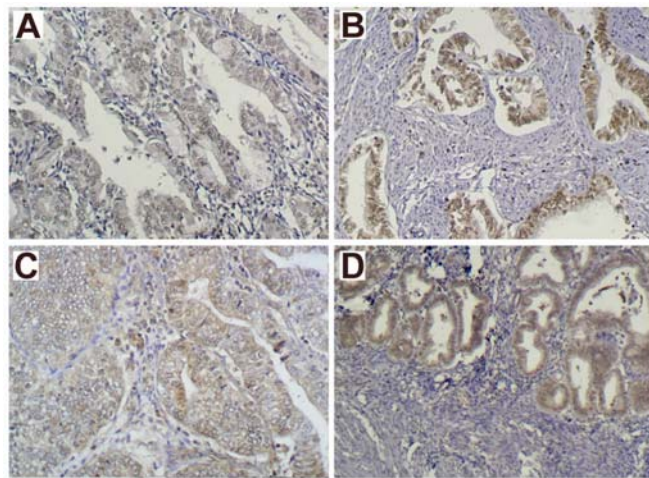
Monge et al., Figure 3



Monge et al., Figure 4



Monge et al., Figure 5



Monge et al., Figure 6

Figure Legends

Figure 1. Enhanced MMP-2 activity upon expression of the fusion protein GFP-ERM/ETV5. *A*, Western blot detection of endogenous human ERM/ETV5 protein and transfected GFP-ERM/ETV5 protein in the cell lines developed. Actin was used as a loading control. *B*, Expression of GFP-ERM/ETV5 enhances gelatinase MMP-2 activity. Upper panel shows a representative zymogram performed with cell lysates from the Hec-1A (first line), Hec-1A GFP (second line) and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 (third line) cells. MMP-2 activity is shown as directly proportional to the band intensities. No MMP-9 activity was detected in these cell lines. Quantification of at least five gelatinase activity assays among the three established cell lines (lower panel).

Figure 2. Direct interaction of ERM/ETV5 to the promoter region of MMP-2. *A*, The analysis of the promoter region of MMP-2 shows one Ets and two PEA3 putative binding sites. The forward and reverse primers for MMP-2 promoter region PCR are shown underlined. *B*, PCR analysis of the chromatin immunoprecipitated with antibodies directed against the GFP and ERM/ETV5, shows specific binding to the promoter region of MMP-2. ChIP performed with antibodies against the GFP in the Hec-1A GFP control cell line showed no specific binding of the GFP to the promoter region of MMP-2. Irrelevant IgGs and antibodies directed against the acetylated histone are shown as negative and positive controls, respectively. The 18S gene was used as a negative control for a promoter not regulated by Ets-factors.

Figure 3. GFP-ERM/ETV5 expression results in enhanced cell migration mediated by increased MMP-2 activity. *A*, Sequential phase contrast images showing representative examples of the trajectories followed by Hec-1A cells stably expressing or not the GFP-ERM/ETV5. Hec-1A cells transfected with the GFP behaved as the non-transfected Hec-1A cells (data not shown). Elapsed time is indicated in hours; bar=10 μ m. *B-C*, Phase contrast images of Hec-1A and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells, at the end of video-recording, showing representative examples of the increased migration that resulted in larger trajectories and in enhanced scattering in those cells over-expressing ERM/ETV5. Bar=0,1mm. *D*, Histogram representing the percentage of ERM/ETV5 expression determined by RT-Q-PCR, after treatment of the cell lines with the negative control siRNA and the GFP siRNA. *E*, Western-Blot demonstrating the specific silencing of the fusion protein GFP-ERM/ETV5 and not the endogenous ERM/ETV5 in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells treated as in (C), with the resulting MMP-2 activity reduction demonstrated by gel zymography. *F*, MRDO levels for the three cell lines treated with the negative control siRNA or with the GFP siRNA, and in the presence or not of the specific MMP-2 inhibitor III. The MRDO levels from the siRNA negative control and those obtained in the absence of the MMP-2 inhibitor were pooled together (control). Statistical signification (** $p < 0,001$) was obtained when the MRDO levels from the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells were

compared to those from the Hec-1A and Hec-1A GFP control cell lines, as well as when treated with the GFP siRNA or the MMP-2 inhibitor III.

Figure 4. MMP-2 increased activity in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line confers invasive properties to tumors in an orthotopic endometrial cancer model. Immunohistochemistry of primary tumors originating from Hec-1A GFP *A*, or Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells *B*, shows increased MMP-2 levels associated with the overexpression of ERM/ETV5. *C*, The quantification of gelatinase activity in these tumors presents enhanced gelatin processing in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line. *D-E*, Hematoxylin-eosin staining of orthotopically implanted tumors, showing the interface between the generated tumor and the myometrium of the mice, illustrates a more aggressive pattern of invasion with an infiltrative profile associated with the overexpression of ERM/ETV5 (*E*) compared to GFP as a control (*D*). The dashed red line highlights the interface between the myometrium and the orthotopically implanted tumors.

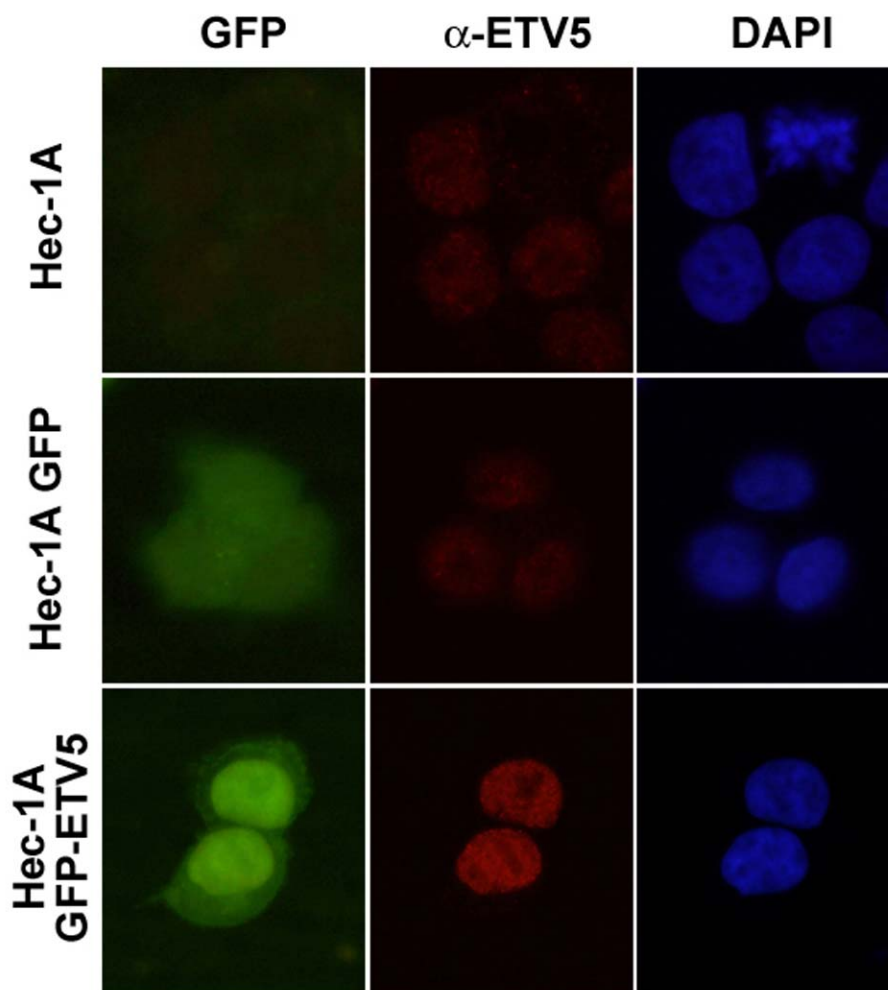
Figure 5. *In situ* zymography of endometrial carcinoma tissues. Serial frozen sections incubated with 40 µg/ml fluorescein conjugated DQTM gelatin *A*, DAPI localized to the profuse epithelial glands of IC endometrial cancer tissue *B*, and with 50 µM 1.10-phenanthroline, as a control (*C-D*). Note that in the same glands from a consecutive section, specific fluorescence corresponding to gelatinase activity in the tumoral epithelial glands was abolished when the gelatin conjugate was incubated in the presence of the MMP-inhibitor (see corresponding DAPI in *D*). Images were taken at 20x.

Figure 6. Marked increase in ERM/ETV5 and MMP-2 proteins at the invasive front in human carcinoma samples. ERM/ETV5 (*A-B*) and MMP-2 (*C-D*) staining at the invasive front of human endometrial carcinomas (*B-D*) present enhanced intensity levels compared to the inner parts of the tumors (*A-C*). Images were taken at 40x.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Cells cultured on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 10-15 min and permeabilized for 30 min in PBS 0.1% saponin. Cells were sequentially incubated with 1/100 rAb ERM/ETV5 (Sta. Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and with anti-rabbit secondary antibodies conjugated with TRITC (Sigma, Saint Louis, MO) for 1 hr at RT. Coverslips were mounted using the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc., CA), and fluorescence was visualized and imaged on a DM-IRBE inverted fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) coupled to a TCS-NT argon/krypton confocal laser (Leica, Wetzlar, Germany).

As expected, immunofluorescence showed positive GFP staining in the Hec-1A GFP cells, localized in both the nucleus and the cytoplasm, and low nuclear ERM/ETV5 staining corresponding to the endogenous protein, similar to the non-transfected Hec-1A cells (Suppl. Fig. 1). In contrast, Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells showed mainly nuclear GFP fluorescence co-localizing with increased ERM/ETV5 signal that corresponded to both the transfected construct and the endogenous proteins (Suppl. Fig. 1).

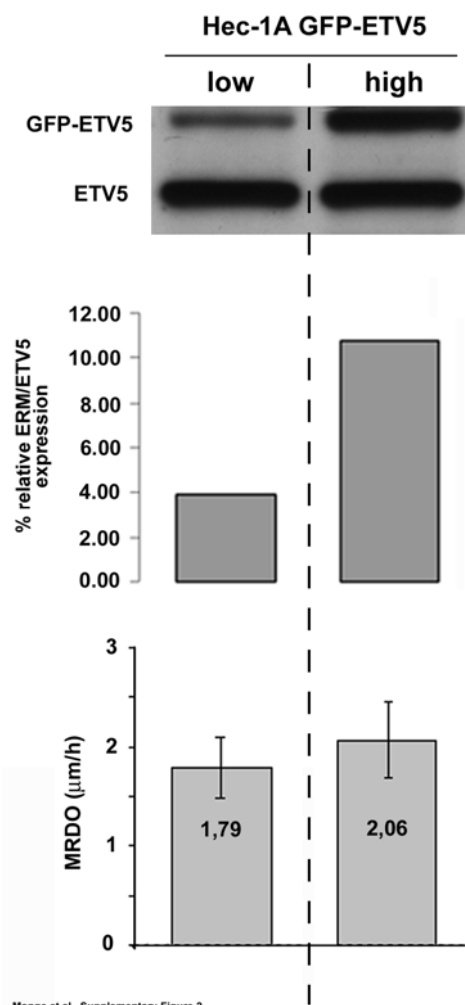


Monge et al., Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2. Two different populations from the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line expressing low and high levels of the fusion protein GFP-ERM/ETV5, were selected by flow cytometry and cell sorting depending on the GFP fluorescence. Flow cytometry was performed using a Cell Sorter (BD FACS Aria, Becton and Dickinson) equipped with a blue laser tuned to 488 nm. Data acquisition and analysis was carried out using CELLQuest software (Becton Dickinson). Forward angle and side-scatter light gating was used to exclude dead cells and debris. A 502 nm filter with a band-pass of 530/30 nm was used to collect the EGFP signal.

The procedure allowed us to collect GFP positive cells in two tubes depending on its GFP levels, one fraction with high levels of GFP-ERM/ETV5 and another one with low levels of fusion protein. These populations were further cultivated and processed for cell migration assay by video-microscopy.

Western blotting (upper panel; Suppl. Fig. 2) and RT-Q-PCR (middle panel; Suppl. Fig. 2) demonstrated the different levels of expression of the selected populations, without any change on the levels of the endogenous ERM/ETV5 protein. Cell migration assays demonstrated a gradation in the promotion of migration by the expression of the fusion protein, as shown by the MRDO quantification of 100 cells tracked from each population (lower panel; Suppl. Fig. 2).

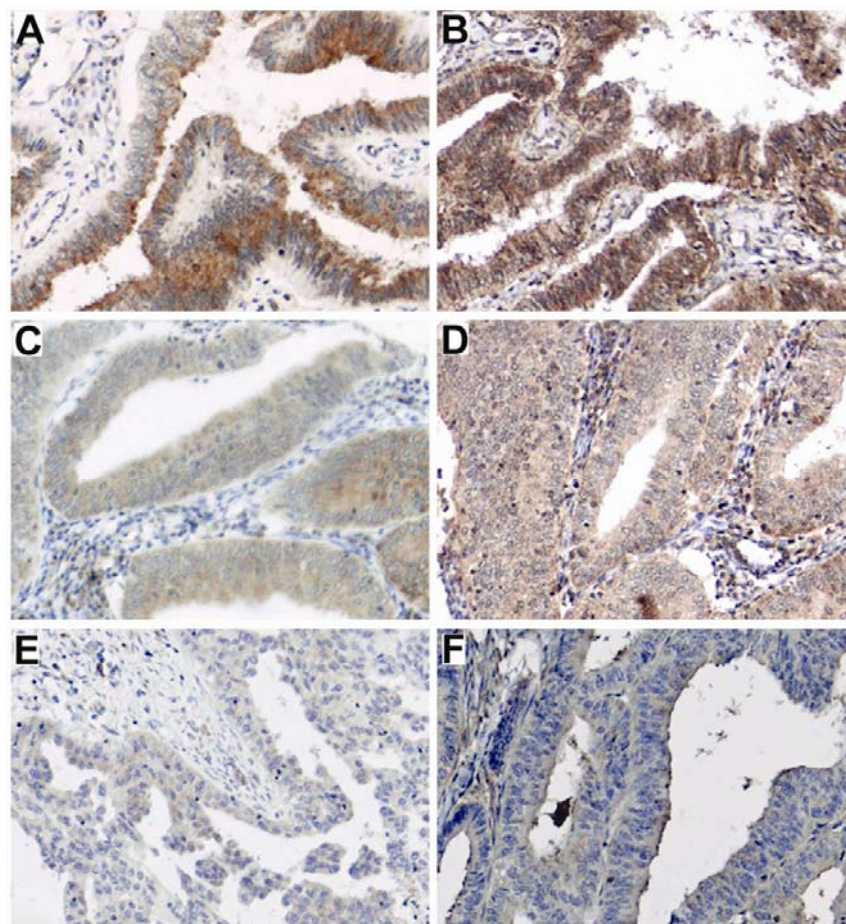


Monge et al., Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3. Endometrial tissue-array for ERM/ETV5 and MMP-2 protein expression. For the global analysis of ERM/ETV5 and MMP-2 expression, 74 endometrial carcinomas from patients of the Hospital del Mar in Barcelona (Spain) were evaluated on a TMA described elsewhere [343].

Representative examples of corresponding immunohistochemical intensities in different sections from the same cores in the TMA are shown, stained for MMP-2 (left panels) and ERM/ETV5 (right panels). Both ERM/ETV5 and MMP-2 proteins showed specific staining in the epithelial glands of the endometrial cancer tissues, while they showed negative labelling in the stroma.

High-levels of MMP-2 correlated to strong ERM/ETV5 up-regulation (Suppl. Fig. 3A-B); intermediate MMP-2 labeling coincided with medium ERM/ETV5 expression (Suppl. Fig. 3C-D); and, MMP-2 and ERM/ETV5 showed corresponding levels of low intensity staining (Suppl. Fig. 3E-F). Images were taken at 20x.



Monge et al., Supplementary Figure 3

[Carcinogenesis, submitted]

Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress

¹**Marta Monge**, ¹Andreas Doll, ¹Eva Colas, ²Antonio Gil-Moreno, ³Josep Castellvi, ²Berta Diaz, ¹Marta Gonzalez, ²Jordi Xercavins, ⁴Francesc Alameda, ⁶Francesc Canals, ⁵Franco Gabrielli, ¹Jaume Reventos and ¹Miguel Abal

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ²Department de Ginecologia Oncològica, Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ³Department de Patologia, Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ⁴Department de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Espanya; ⁵Department de Patologia Experimental i Biotecnologia Mèdica, Universitat de Pisa, Itàlia; ⁶Laboratori de Proteòmica, Programa de Recerca Oncològica Mèdica, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Barcelona, Espanya

El càncer d'endometri és una de les malalties ginecològiques més habituals en els països occidentals i es caracteritza per presentar un pronòstic favorable. De totes maneres, la invasió miometrial profunda correlaciona amb tumors més indiferenciats, invasió limfo-vascular, afectació limfàtica i una disminució de la supervivència. Previ a aquest estudi, vam descriure que ERM/ETV5, factor de transcripció de la família Ets, es troba específicament sobreexpressat en el EEC associat a la infiltració miometrial. Per entendre el paper d'aquest factor de transcripció durant la infiltració miometrial, vam analitzar les proteïnes diferencialment expressades en la línia cel·lular estable de càncer d'endometri que sobreexpressa ERM/ETV5 mitjançant la tecnologia 2D-DIGE. L'anàlisi de les rutes moleculars implicades assenyalen la regulació d'actina i la senyalització per TGF-beta i progesterona com els processos regulats per ERM/ETV5. A més, vam poder caracteritzar la sobreexpressió específica de la proteïna Hep27, una deshidrogenasa/reductasa nuclear, que també presenta localització mitocondrial depenent de ERM/ETV5. Estudis funcionals van demostrar associació amb l'estrès oxidatiu. Analitzant els resultats obtinguts, podem concloure que l'anàlisi proteòmic dut a terme amb la línia cel·lular Hec-1A que sobreexpressa de forma estable ERM/ETV5, reforça el paper d'aquest factor de transcripció com a factor regulador de la migració i invasió tumoral, i assenjala la seva implicació en la resposta a l'estrès oxidatiu associat a l'inici de la invasió en el carcinoma endometrial. L'aclariment dels successos moleculars que esdevenen en el EEC associats a l'inici de la invasió tumoral, representaria una millora clara per a la cerca de dianes implicades en l'inici del procés metastàtic. Aquest coneixement seria alhora de gran utilitat per a la classificació de les pacients, ja que l'afectació miometrial determina un augment en la taxa de recidives després d'un primer tractament quirúrgic i una disminució en la supervivència després de 5 anys.

[Carcinogenesis, submitted]

Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress

¹Marta Monge, ¹Andreas Doll, ¹Eva Colas, ²Antonio Gil-Moreno, ³Josep Castellví, ²Berta Diaz, ¹Marta Gonzalez, ²Jordi Xercavins, ⁴Francesc Alameda, ⁶Francesc Canals, ⁵Franco Gabrielli, ¹Jaume Reventos and ¹Miguel Abal

¹Biomedical Research Unit, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital; ²Department of Gynecological Oncology, Vall d'Hebron University Hospital; ³Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital; ⁴Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁵Department of Experimental Pathology and Medical Biotechnology, University of Pisa, Italy; ⁶Proteomics Laboratory, Medical Oncology Research Programme, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

Keywords: ETV5, endometrial cancer, tumor invasion, Hep27, oxidative stress

Corresponding author: Miguel Abal, Biomedical Research Unit, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. mabal@ir.vhebron.net

Abstract

Endometrial cancer, the most common gynecological malignancy encountered in western countries, is characterized by a favourable prognosis. Nonetheless, deep myometrial invasion correlates with more undifferentiated tumors, lymph-vascular invasion, node affectation and decreased global survival. We have previously described the Ets family member ERM/ETV5 specifically up-regulated in EEC associated with myometrial infiltration.

To understand the role of this transcription factor during myometrial infiltration, we analysed by 2D-DIGE technology those proteins whose expression was altered in endometrial cell lines stably over-expressing ERM/ETV5. Pathway analysis pointed to actin regulation and TGF-beta and progesterone signalling as processes regulated by ERM/ETV5. In addition, we characterized the specific up-regulation of the nuclear dehydrogenase/reductase Hep27, its ERM/ETV5-dependent mitochondrial localization, and functional studies demonstrated a link with oxidative stress.

Overall, the ETV5-related proteomic approach performed in the Hec-1A cell line reinforces a role of this transcription factor in the regulation of the migratory and invasive tumour behaviour, and points to a modulated response to oxidative stress associated with the promotion of invasion in endometrial cancer. Unraveling the molecular events in EEC associated with the initiation of tumor invasion, would represent an obvious improvement in the pursuit of rational targets for the onset of metastasis. This knowledge would also be a valuable tool for the molecular stratification of patients, since myometrial affectation determines an increase in the rate of recurrence after a first surgical treatment and a decrease in survival at the five-year follow-up.

Introduction

The tumorigenesis of sporadic endometrial cancer, the most common gynecological malignancy encountered in western countries, is commonly explained on the basis of a dualistic model that discriminates between Type I endometrioid (EEC) and Type II non-endometrioid (NEEC) endometrial tumors from both biological and clinical parameters (1). EECs represent the majority of cases of sporadic endometrial cancer (70-80%), with unopposed oestrogen stimulation as the etiological factor associated with the development of the carcinoma (2). EECs usually develop in pre- and peri-menopausal women, express oestrogen (ER) and progesterone (PR) receptors (3), and are associated with elevated levels of serum estradiol (4). Histologically, most tumors are of low grade, they are frequently preceded by endometrial hyperplasia and, overall, are characterized by a favourable prognosis. Nonetheless, deep myometrial invasion correlates with more undifferentiated tumors, lymph-vascular invasion, node affectation and decreased global survival. As the initial event in tumor invasion and distant dissemination, myometrial infiltration determines an increase in the rate of recurrence after a first surgical treatment and a decrease in survival at the five-year follow-up (5).

Despite the characterisation of molecular events associated with the development of endometrial carcinoma, those associated with the early steps of infiltration and invasion in endometrial cancer are less known. The molecular pathology of myometrial infiltration that defines the initial steps of invasion in endometrial cancer correlates with the downregulation of E-cadherin as a main player of epithelial to mesenchymal transition, as well as modifications on other molecules involved in cell-cell contacts that render cells with a migratory phenotype. In addition, altered signalling pathways and transcription factors associate with myometrial invasion, histological grade and metastasis (5).

One of these transcription factors involved in endometrial cancer invasion is the Ets family member ERM/ETV5, described specifically up-regulated in EEC associated with myometrial infiltration (6). Ets family members have been correlated to tumor progression by up-regulating the expression of matrix-degrading proteases. The acquisition of a migratory phenotype by the epithelial tumor cells together with the remodeling of the extracellular matrix must accompany the process of cancer cell invasion. Indeed, ERM/ETV5 has been shown to act through MMP-2 gelatinolytic activity to confer invasive capabilities, associated with an initial switch to myometrial infiltration (7).

Proteomic approaches to the molecular interactions underlying pathophysiological states within the field of cancer research are nowadays unravelling protein networks that play pivotal roles in the establishment and maintenance of the hallmarks of malignancy, including cell invasion and migration. To understand the role of the transcription factor ERM/ETV5 during myometrial infiltration, we analysed by 2D-DIGE technology those proteins whose expression was altered in endometrial cell lines stably over-expressing ERM/ETV5, thus presumptively under the control of its transcriptional activity. Specific deregulation of a reduced group of proteins indicated changes in actin cytoskeleton or RNA processing. Interestingly, functional studies demonstrated

an association between endometrial cancer invasion promoted by ERM/ETV5 and oxidative stress, through the induction of Hep27, a member of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDR).

Materials and Methods

Cell lines. The human endometrial carcinoma cell line, Hec-1A, was cultured in McCoy's 5A medium. Plasmid construction consisted of the full-length human ERM/ETV5 inserted at the EcoRI position at the multiple cloning site of the pEGFP-C2 vector (BD Biosciences, USA), and stable Hec-1A cell lines either transfected with the pEGFP-C2 vector alone (Hec-1A GFP) or the hERM/ETV5 containing pEGFP-C2 vector (Hec-1A GFP-ERM/ETV5) were selected with G-418, as described (7).

Proteomic analysis:

Sample preparation. Triplicates from each Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line were lysed with 400 μ L of DIGE lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30mM Tris, pH 8.5), for protein extraction. After sonication, the cleared protein extract was further purified by a modified TCA-acetone precipitation (2-D-CleanUp kit, Amersham Biosciences, Munich, Germany), and redissolved in DIGE lysis buffer. Protein concentration was determined using the BioRad RCDC Protein Assay (BioRad, California, USA).

Two-dimensional gel electrophoresis (2D-DIGE). A pool consisting of equal amounts of each of the samples analyzed in a DIGE experiment was prepared to be used as internal standard for quantitative comparisons (8). The triplicates from each Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell lines were labeled with Cy3 and Cy5 cyanine dyes while internal standard pooled sample was labeled with Cy2 dye, by the addition of 400 pmol of Cy dye in 1 μ L of anhydrous N,N-dimethylformamide per 50 μ g of protein. To avoid any possible bias introduced by labelling efficiency, the samples from each group were alternatively labelled with both Cy3 and Cy5 dyes. After 30 min incubation on ice in the dark, the reaction was quenched with 10mM lysine and further incubated for 10 min. Samples were finally combined according to the experimental design, at 50 μ g of protein per Cy dye per gel, and diluted twofold with IEF sample buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 2% DTT, 2% pharmalytes pH 3–10, 0.002% bromophenol blue). The 2-DE was performed using GE-Healthcare reagents and equipment. First dimension isoelectric focusing was performed on IPG strips (24 cm; linear gradient pH 3–10) using an Ettan IPGphor system. Firstly strips were incubated overnight in 450 μ L of rehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 1% pharmalytes pH 3–10, 100mM DeStreak, 0.002% bromophenol blue). Then samples were applied via cup loading near the acidic end of the strips. After focusing at a global voltage of 67 kV, strips were equilibrated first for 15 min in 6 mL of reducing solution (6M urea, 100mM Tris-HCl pH 8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 5 mg/mL DTT, 0.002% bromophenol blue) and then in 6 mL of alkylation solution (6M urea, 100mM Tris-HCl pH 8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 22.5 mg/mL iodoacetamide, 0.002% bromophenol blue) for 15 min, on a rocking platform. Second dimension SDS-PAGE were run by overlaying the strips on 12.5% isocratic Laemmli gels (24 x 20 cm), casted in low fluorescence glass plates, on an Ettan DALTSix system. Gels were run at 20°C, at constant

power 2.5 W/gel for 30 min followed by 17 W/gel until the bromophenol blue tracking front reached the end of the gel.

Fluorescence images of the gels were acquired on a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Cy2, Cy3 and Cy5 images were scanned at 488 nm/520 nm, 532 nm/580 nm and 633 nm/670 nm excitation/emission wavelengths, respectively, at a 100 μ m resolution. Image analysis and statistical quantification of relative protein abundances were performed using DeCyder V. 6.0 software (GE Healthcare).

Protein identification by mass spectrometry. Protein spots were excised from the gel using an automated Spot Picker (GE Healthcare). In-gel trypsin digestion was performed as described (9) using autolysis-stabilized trypsin (Promega, Madison, USA). Tryptic digests were purified using ZipTip microtiter plates (Millipore, Cork, Ireland). MALDI-MS analysis of tryptic peptides was performed on an Ultraflex TOF-TOF Instrument (Bruker, Bremen, Germany). Samples were prepared using CHCA as matrix on anchor-chip targets (Bruker, Bremen, Germany). Identification of the proteins was carried out by PMF data and/or by TOF-TOF PSD fragmentation spectra. Database searches were performed using the MASCOT program (Matrix Science, Boston, USA). Alternatively, proteins were confirmed or identified by ion trap mass spectrometry as described (10).

Signaling pathways analysis. Functional pathway and network analyses were generated through the use of Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (version 2.0, Ingenuity[®] Systems, Mountain View, Ca). IPA identified those canonical pathways, biological processes and gene interaction networks that were most significant to the proteins selected from the 2D-DIGE analysis. Each protein designation was mapped in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. Proteins that met the expression ratio cut-off of 1.3, a p-value cut-off of 0.005 for differential expression and were associated with a canonical pathway in the Ingenuity Pathways Knowledge Base were considered for the analysis.

Western Blot and subcellular fractionation. Whole protein extracts were prepared as described (7). Proteins separated in SDS-10% polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes were then incubated with primary antibodies 1/400 mAb anti-actin (NeoMarkers, Lab Vision Corporation, CA), 1/1500 mAb anti-Hep27 (11) and 1/100 rAb ERM/ETV5 (Sta. Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and developed with HRP-conjugated rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit immunoglobulins (DAKO, Glostrup, Denmark) and the SuperSignal[®] West Dura substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Alternatively, mitochondrial, cytosolic and nuclei fractions were obtained by differential centrifugation of Hec-1A and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 homogenates. Cells were trypsinized, pelleted, washed with PBS and then redissolved in ice-cold isolation buffer containing 0.3M

Mannitol, 0.1% BSA, 0.2mM EDTA, 10mM Hepes, adjust pH at 7.4 and protease inhibitors (Sigma). Cells were homogenized on ice and were centrifuged 1000g at 4°C for 10 min. The pellets with nuclei were stored at -80° C until used for SDS-PAGE, while the supernatants were collected and further centrifuged 14000g for 15 min at 4°C. The resulting supernatants were considered as the cytosolic fraction, while the pellets with the mitochondrial fraction were washed twice with cold isolation buffer. Each fraction was redissolved in Laemmli's loading buffer and proteins were separated as described.

Immunofluorescence. Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells cultured on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized for 30 min in PBS 0.1% saponin. Cells were sequentially incubated with 1/100 rAb ERM/ETV5 and with anti-rabbit secondary antibodies conjugated with TRITC (Sigma, Saint Louis, MO) for 1 hr at RT in dark. Alternatively, Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells were fixed with methanol for 6 min at -20° C and incubated with 1/10 mAb Hep27 and with anti-mouse secondary antibody conjugated with 488-alexa fluor (Molecular Probes, Invitrogen) for 1 hour at RT in dark. Coverslips were mounted using the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc., CA), and fluorescence was visualized and imaged on a DM-IRBE inverted fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) coupled to a TCS-NT argon/krypton confocal laser (Leica, Wetzlar, Germany).

Finally, Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells were incubated with growth medium containing 250nM MitoTracker® (Molecular Probes, Invitrogen) for 45 minutes at 37° C and then rinsed three times with PBS before processing for Hep27 localization at the mitochondria.

Immunohistochemistry. Paraffin-embedded sections from human endometrial carcinomas and from tumors originated from Hec-1A and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells and orthotopically implanted in mice (7), were stained for Hep27 pattern of expression by indirect immunoperoxidase assay. Sections were treated with heat in 1mM EDTA pH 8 buffer for antigen retrieval, and endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H₂O₂. Sections were incubated overnight with the primary antibody against Hep27 at a 1:300 dilution, washed and incubated with peroxidase conjugated goat antimouse immunoglobulin (EnVision Dual System, DAKO). Subsequently, sections were washed, and reactions were developed with diaminobenzidine, followed by counterstaining with hematoxylin. Quantitative evaluation of Hep27 cytoplasmic immunostaining on nine different fields per orthotopic tumor section (approximately 30,000 cells), was performed by three independent investigators.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). ChIP on Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells was performed with rAb ERM/ETV5 as described (7). Rabbit acetyl-Histone H4 (Upstate, Lake Placid, NY) was used as positive control. For PCR analysis, 1 µl of input DNA extraction and 10

µl of immunoprecipitated DNA were used for 40 cycles of amplification (annealing temperature 60°C), with the following primers for Hep27: reverse primer: CAGAAAAGGCCTCACCCACAAC and forward primer: TCTTTCCACAAGCAGCAAGCAGC.

Oxidative stress. Hec-1A and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 were treated with 1 µM H₂O₂ (Sigma Chemical Co., Oakville, Canada) for 30 min, and allowed to recover for 5h before protein extraction and processing for western blotting. Alternatively, cells were treated with 50mM NAC (Sigma) for 4 hours, before the extraction of protein lysates.

Results

Proteomic comparisons for the characterisation of ERM/ETV5 regulated proteins in Hec-1A. Stable transfectants were established in the human endometrial cancer cell line Hec-1A expressing the transcription factor ERM/ETV5 in fusion with the green fluorescent protein (GFP), and further compared to the non-transfected cell line and the Hec-1A cells stably expressing the empty vector with the GFP. As expected, immunofluorescence showed positive GFP staining in the Hec-1A GFP expressing cells, localized in both the nucleus and the cytoplasm, and low nuclear ERM/ETV5 staining corresponding to the endogenous protein, similar to the non-transfected Hec-1A cells (Figure 1A). In contrast, Hec-1A GFP-ERM/ETV5 expressing cells showed mainly nuclear GFP fluorescence co-localizing with increased ERM/ETV5 signal that corresponded to both the transfected construct and the endogenous proteins (Figure 1A).

Protein extracts from the three cell lines were compared by 2D-DIGE technology. Triplicates of each cell line were extracted, cleared and purified as indicated (Materials and Methods section), labelled with electrophilic forms of 1-(5-carboxypentyl)-1'-propylindocarbocyanine halide (Cy3) N-hydroxy-succinimidyl ester and 1-(5-carboxypentyl)-1'-methylindodi-carbocyanine halide (Cy5) N-hydroxysuccinimidyl ester fluorescent dyes, and analysed as mixtures. Analysis was repeated with reciprocal labelling. The proteins were separated in a 12,5% acrylamide gel after a linear gradient of pH 3–10 (Figure 1B). Approximately 2,900 spots were detected in the gels, and statistical processing of the results considering a threshold of ± 1.3 fold variation and a p-value < 0.005 , rendered 60 spots differentially expressed in the ERM/ETV5 over-expressing cell line compared to the two control cell lines (Figure 1C-E). Of those, 47 proteins could be identified by Maldi-TOF MS (Table I).

Data mining using the Ingenuity Pathway Analysis software showed up cancer as the main biological alteration, principally focused on genes related to tumorigenesis. RNA post-transcriptional modification, mainly due to the up-regulation of a group of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HNRNPs), was also emphasized. Glycolysis/gluconeogenesis was stressed as the major canonical pathway altered, with ALDH1A1, ALDH7A1, ALDOA, HEP27, PGK1, PKM2 and TPI1 genes deregulated in ERM/ETV5 over-expressing Hec-1A cells. A more detailed analysis, based on gene interactions and molecular relationships, pointed to cell migration and invasion as the most relevantly perturbed biological processes upon the induction of the transcription factor ERM/ETV5: TGF β and progesterone signalling, actin cytoskeleton regulation, annexin and tropomyosin modulation composed the main molecular network altered under the control of ERM/ETV5 in the Hec-1A endometrial cancer cell line (Figure 2).

ERM/ETV5-dependent up-regulation of mitochondrial Hep27. Among the up-regulated proteins Hep27 expression was found 12 and 10 fold increased compared to the control non-transfected and GFP-expressing Hec-1A cells, respectively. Hep27 a member of the short-chain dehydrogenase/reductase enzymes (SDR family), is a NADPH-dependent reductase enzyme

active on cytotoxic α -dicarbonyl compounds (12)[406]. The induction of Hep27 upon ERM/ETV5 over-expression was further validated by Western blotting, confirming the notable induction of Hep27 concomitant to the expression of the fusion protein GFP-ERM/ETV5, and independently of the expression of the GFP or the unchanged levels of the endogenous ERM/ETV5 (Figure 3A).

To better understand the significance of the induction of Hep27 upon ERM/ETV5 over-expression, we analysed the cellular localization of Hep27 in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 expressing cell line. As already described (13), Hep27 presented a faint punctuated nuclear pattern of expression (Figure 3B). In addition, a strong cytoplasmic labelling was found in some cells that over-expressed ERM/ETV5 (Figure 3B). On the contrary to this heterogeneously distributed cytoplasmic profile, the faint punctuated nuclear labelling was homogeneous throughout the cell culture (Figure 3B). Control non-transfected or GFP-expressing Hec-1A cells presented the same Hep27 nuclear pattern of expression, but the cytoplasmic staining was specific of the cells over-expressing ERM/ETV5 (data not shown). Both immunofluorescence and cytometry experiments showed that this pattern of expression was independent of the GFP-ERM/ETV5 levels of expression (data not shown). This cytoplasmic staining suggested that Hep27 could be localized at the mitochondria, and thus we performed subcellular fractionation in ERM/ETV5 over-expressing Hec-1A cells that confirmed the mitochondrial localization of Hep27 in addition to its nuclear profile (Figure 3C). We further analysed by confocal immunofluorescence its co-localization with a specific marker of these organelles, showing a clear co-localization between Hep27 and mitotracker (Figure 3D).

***In vivo* characterisation of Hep27 expression.** We next investigated whether this pattern of expression was reproduced in tissue samples both from an *in vivo* model and human carcinoma. Hep27 immunoassaying was first performed in orthotopic tumours generated in nude mice by subcutaneous injection of the Hec-1A GFP-ERM/ETV5, Hec-1A GFP, and untransfected Hec-1A cell lines, and subsequent implantation onto the posterior face of the uterus (7)[405]. As can be observed, the heterogeneous pattern of Hep27 expression with a marked cytoplasmic staining in a reduced number of cells and a homogeneously distributed nuclear labelling was reproduced in *in vivo* conditions (upper panels; Figure 4). In addition, and compared to the orthotopic tumours generated from the control cell lines, those originated from the GFP-ERM/ETV5 Hec-1A cells showed an increased number of cells presenting the mitochondrial pattern, translating to an *in vivo* model the results obtained *in vitro* on the ERM/ETV5 dependent induction of Hep27 (lower left panel; Figure 4). Next, the pattern of Hep27 expression was analysed in representative samples of endometrioid endometrial carcinomas where ERM/ETV5 was found to be related to the initial steps of myometrial infiltration and dissemination (6). This confirmed the diffuse staining at the cytoplasm and nucleus, and the presence of isolated cells with a marked cytoplasmic labelling compatible with the mitochondria profile characterised in the cell cultures (lower right panel; Figure 4).

Up-regulation of ERM/ETV5 and Hep27 in response to oxidative stress. To investigate a functional link between ERM/ETV5 over-expression and Hep27 up-regulation, we first analysed by chromatin immunoprecipitation whether the transcription factor ERM/ETV5 binds to the promoter of Hep27. Second, and based on the mitochondrial localization of Hep27 as well as its active role in inactivation of cytotoxic α -dicarbonyl xenobiotics that are generated through oxidative stress, we evaluated the response of both proteins to oxidative stress (12, 14)

ChIP was performed by immunoprecipitation with ERM/ETV5 mAb in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line as described elsewhere (7). PCR amplification clearly demonstrated that ERM/ETV5 specifically binds to the upstream region of the Hep27 gene, where two putative Ets-binding sites were identified by bioinformatic prediction (Figure 5A). These results suggested that the up-regulation of Hep27 found in the ERM/ETV5 over-expressing endometrial cancer cells could be induced by direct binding of ERM/ETV5 to its promoter region.

Finally, to explore the possibility that this direct link could be related to oxidative stress, Hec-1A cells over-expressing ERM/ETV5 were exposed to 1mM concentrations of the H₂O₂ oxidizing agent. This resulted in an increase of both endogenous and the GFP-fusion ERM/ETV5, concomitant to that of Hep27 (Figure 5B). Conversely, when exposed to the antioxidant agent N-acetyl-L-cystein (NAC), both proteins dramatically decreased (Figure 5B). These data suggest a role for ERM/ETV5 in the induction of Hep27 as a protective response to oxidative stress: the stress-increased Hep27 reductase activity can cope with the stress-induced formation of cytotoxic α -dicarbonyls (12, 14).

Discussion

In this work, we approached the proteome associated with ERM/ETV5 up-regulation during myometrial infiltration in endometrial cancer. We used highly sensitive two dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) technology that involve labeling proteins from different samples with different fluorescent dyes, size- and charge-matched as well as spectrally distinct. This allows co-separation of different DIGE fluor-labeled samples in the same gel and ensures that all samples will be subjected to exactly the same first- and second-dimension electrophoresis running conditions, limiting experimental variation and ensuring accurate within-gel matching. In addition, an internal standard resulting from the pooling of aliquots of all biological samples in the experiment permits normalization and accurate quantitative comparisons. Endometrial cancer cells stably over-expressing ERM/ETV5 were compared to both control non-transfected cells and cells transfected with the empty vector. Around fifty proteins under the presumptive control of ERM/ETV5 could be identified by MALDI-TOF MS (Table I).

Data mining founded on gene interactions and molecular relationships with the aim of detecting those biological processes relevantly perturbed upon the induction of the transcription factor ERM/ETV5, pointed to cellular migration and invasion as the main molecular network altered through TGF β and progesterone signalling, and actin cytoskeleton regulation. Previous work from the group described ERM/ETV5 up-regulation in endometrial cancer to correlate with the degree of myometrial infiltration (6). More recently, *in vitro* and *in vivo* results demonstrated ERM/ETV5 to act through MMP-2 to confer the migratory and invasive capabilities associated with an initial switch to myometrial infiltration (7). In addition to the well-known growth inhibiting effect of progesterone on endometrial cancer, progesterone and its receptors play an important role in regulating invasive properties of endometrial cancer cells (15). It is also well known the reorganization of the actin network during cancer cell migration and invasion (16). Molecules that link migratory signals to the actin cytoskeleton are up-regulated in invasive and metastatic cancer cells (17). Moreover, membrane protrusions in response to migratory and chemotactic stimuli and focal extracellular matrix degradation by podosomes and invadopodia are related to localized polymerization of submembrane actin filaments (18). Finally, hormone-dependent migration in endometrial cancer cells was related to dissolution of stress fibers, dynamic actin accumulation at the cell periphery, and formation of lamellipodia, filopodia, and membrane spikes (19). Regarding TGF-beta, and in the context of its dual role as a tumor suppressor and pro-oncogenic factor, it can exert effects on tumor and stromal cells in advanced disease stages to stimulate invasion, angiogenesis, and metastasis, and to inhibit immune surveillance (20). These evidences support new therapeutic strategies targeting TGF-beta signaling as a basis for inhibiting its activity as an autocrine tumor promoting factor that enhances cancer invasion and metastasis (21). Concerning endometrial tumor invasion, disturbances of the TGF beta signalling as well as localization of SMADs may be important to the infiltration of the myometrial wall by the type I endometrial carcinomas (22). Moreover, myometrial invasion of endometrial

cancers involves an increase in gelatinase activity, regulated to some extent by TGF-beta 1 in an autocrine or paracrine fashion (23)[339].

The gene expression fold change of significantly altered genes under the control of ERM/ETV5 ranged 1.3-2, which represents reasonable changes in protein expression for a cell line stably expressing a transcription factor. Nonetheless, the most altered gene showed more than ten fold induction in the ERM/ETV5 over-expressing cell line. Hep27, a member of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), was first identified in human hepatoblastoma HepG2 cells (11). The important induction of this gene associated with the up-regulation of ERM/ETV5 was further confirmed by western blot analysis in the endometrial cancer cell lines generated, and its both nuclear and cytoplasmic localization corresponded to that described in the HepG2 cells (13).

The fact that Hep27 was localized at the mitochondria suggested a physiological function linked to oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) have been proposed to be involved in tumour metastasis as mediators of key genes relevant to cell adhesion, epithelial-mesenchymal transition and migration (24). Alternatively, ROS have also been demonstrated to induce apoptosis, cell cycle arrest and cellular senescence through the uncoupling of the electron transport chain in mitochondria and to a decrease in mitochondrial membrane potential (25). Interestingly, in tumour cells ROS may be an important factor in directly regulating the expression of ets-1, the founder member of the Ets family of transcription factors to which ERM/ETV5 belongs (26). Indeed, ets-1 regulation of matrix metalloproteinase-1 expression has been described to be redox sensitive (27). Likewise, H₂O₂-induced angiogenesis has been shown to be mediated by ets-1 (28), as well as angiotensin II-induced inflammation (29). Finally, in Down's syndrome and Alzheimer's disease (30), or in high-cholesterol diet-induced atherosclerosis (31), oxidative stress has also been related to up-regulation of diverse ets transcription factors. Likewise, in this study we demonstrated that exogenous H₂O₂ is capable of inducing an increase in ERM/ETV5 protein in the Hec-1A endometrial cancer cell line. Antioxidant treatment led to a decrease in ERM/ETV5 expression, indicating that the oxidative stress-induced response is likely specific. The concomitant regulation of Hep27 gene through the direct binding of ETV5 to its promoter region suggests a contribution to protect mitochondria from the cytotoxic effect of α -dicarbonyl compounds. These reactive dicarbonyls, which are generated through oxidative stress (or are found as dietary constituents), can be cytotoxic causing chromosome loss (12) or processed into advanced glycation endproducts (AGEs) that are thought to cause complex underlying pathologies, including inflammation or sclerotic effects found in chronic diseases (14). Accordingly, Hep27 could play an important role as scavenging enzymes of reactive α -dicarbonyls. To this regard, microarray analysis to identify putative targets of Ets-1 described enzymes involved in antioxidant defence by quenching the effects of the oxidative stress (32).

In conclusion, the analysis of proteins under the control of ETV5 in the Hec-1A cell line reinforces a role of this transcription factor in the regulation of the migratory and invasive tumour behaviour in endometrial cancer. We further characterised a role for ETV5 in a modulated

response to oxidative stress associated with the promotion of invasion in endometrial cancer. Our results contribute to unravel the molecular events in EEC associated with the initiation of tumor invasion. In addition to represent an improvement in the pursuit of rational targets for the onset of metastasis, this knowledge would also be a valuable tool for the molecular stratification of patients, since myometrial affectation determines an increase in the rate of recurrence after a first surgical treatment and a decrease in survival at the five-year follow-up.

Funding

Spanish Ministry of Education and Science (SAF 2005-06771), Spanish Ministry of Health (RTICC RD06/0020/0058; FIS CP05/00240), Catalan Institute of Health (DURSI 2005SGR00553), and Fundacio La Marato de TV3 (grant 050431). MM is the recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Health (FI05/00090), EC from the Spanish Ministry of Education and Science (BES-2006-14152).

Acknowledgements

The authors wish to thank Sonia Martinez for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Lax,S.F. and Kurman,R.J. (1997) A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, **81**, 228-232.
2. Potischman,N., Hoover,R.N., Brinton,L.A., Siiteri,P., Dorgan,J.F., Swanson,C.A., Berman,M.L., Mortel,R., Twiggs,L.B., Barrett,R.J., Wilbanks,G.D., Persky,V. and Lurain,J.R. (1996) Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1127-1135.
3. Lax,S.F., Pizer,E.S., Ronnett,B.M. and Kurman,R.J. (1998) Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation. *Hum. Pathol.*, **29**, 924-931.
4. Sherman,M.E., Sturgeon,S., Brinton,L.A., Potischman,N., Kurman,R.J., Berman,M.L., Mortel,R., Twiggs,L.B., Barrett,R.J. and Wilbanks,G.D. (1997) Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod. Pathol.*, **10**, 963-968.
5. Abal,M., Llaurodo,M., Doll,A., Monge,M., Colas,E., Gonzalez,M., Rigau,M., Alazzouzi,H., Demajo,S., Castellvi,J., Garcia,A., Ramon y Cajal,S., Xercavins,J., Vazquez-Levin,M.H., Alameda,F., Gil-Moreno,A. and Reventos,J. (2007) Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin. Transl. Oncol.*, **9**, 272-277.
6. Planaguma,J., Abal,M., Gil-Moreno,A., Diaz-Fuertes,M., Monge,M., Garcia,A., Baro,T., Xercavins,J., Reventos,J. and Alameda,F. (2005) Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J. Pathol.*, **207**, 422-429.
7. Monge,M., Colas,E., Doll,A., Gonzalez,M., Gil-Moreno,A., Planaguma,J., Quiles,M., Arbos,M.A., Garcia,A., Castellvi,J., Llaurodo,M., Rigau,M., Alazzouzi,H., Xercavins,J., Alameda,F., Reventos,J. and Abal,M. (2007) ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res.*, **67**, 6753-6759.
8. Alban,A., David,S.O., Bjorkesten,L., Andersson,C., Sloge,E., Lewis,S. and Currie,I. (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*, **3**, 36-44.
9. Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O. and Mann,M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.

10. Esselens,C.W., Malapeira,J., Colome,N., Moss,M., Canals,F. and Arribas,J. (2008) Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol. Chem.*, **389**, 1075-1084.
11. Gabrielli,F., Donadel,G., Bensi,G., Heguy,A. and Melli,M. (1995) A nuclear protein, synthesized in growth-arrested human hepatoblastoma cells, is a novel member of the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 473-477.
12. Shafqat,N., Shafqat,J., Eissner,G., Marschall,H.U., Tryggvason,K., Eriksson,U., Gabrielli,F., Lardy,H., Jornvall,H. and Oppermann,U. (2006) Hep27, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase family, is an NADPH-dependent dicarbonyl reductase expressed in vascular endothelial tissue. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1205-1213.
13. Pellegrini,S., Censini,S., Guidotti,S., Iacopetti,P., Rocchi,M., Bianchi,M., Covacci,A. and Gabrielli,F. (2002) A human short-chain dehydrogenase/reductase gene: structure, chromosomal localization, tissue expression and subcellular localization of its product. *Biochim. Biophys. Acta*, **1574**, 215-222.
14. Oppermann,U. (2007) Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 293-322.
15. Hanekamp,E.E., Gielen,S.C., Smid-Koopman,E., Kuhne,L.C., de Ruiter,P.E., Chadha-Ajwani,S., Brinkmann,A.O., Grootegoed,J.A., Burger,C.W., Huikeshoven,F.J. and Blok,L.J. (2003) Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 4190-4199.
16. Vignjevic,D. and Montagnac,G. (2008) Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 12-22.
17. Yamaguchi,H. and Condeelis,J. (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 642-652.
18. Gimona,M., Buccione,R., Courtneidge,S.A. and Linder,S. (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 235-241.
19. Acconcia,F., Barnes,C.J. and Kumar,R. (2006) Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology*, **147**, 1203-1212.
20. Jakowlew,S.B. (2006) Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 435-457.
21. Leivonen,S.K. and Kahari,V.M. (2007) Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int. J. Cancer*, **121**, 2119-2124.

22. Piestrzeniewicz-Ulanska,D., Brys,M., Semczuk,A., Rechberger,T., Jakowicki,J.A. and Krajewska,W.M. (2004) TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Gynecol. Oncol.*, **95**, 173-180.
23. Yabushita,H., Narumiya,H., Hiratake,K., Yamada,H., Shimazu,M., Sawaguchi,K., Noguchi,M. and Nakanishi,M. (2000) The association of transforming growth factor-beta 1 with myometrial invasion of endometrial carcinomas through effects on matrix metalloproteinase. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **26**, 163-170.
24. Wu,W.S. (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 695-705.
25. Storz,P. (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.*, **10**, 1881-1896.
26. Wilson,L.A., Gemin,A., Espiritu,R. and Singh,G. (2005) ets-1 is transcriptionally up-regulated by H₂O₂ via an antioxidant response element. *Faseb J.*, **19**, 2085-2087.
27. Nelson,K.K., Subbaram,S., Connor,K.M., Dasgupta,J., Ha,X.F., Meng,T.C., Tonks,N.K. and Melendez,J.A. (2006) Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14100-14110.
28. Yasuda,M., Ohzeki,Y., Shimizu,S., Naito,S., Ohtsuru,A., Yamamoto,T. and Kuroiwa,Y. (1999) Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.*, **64**, 249-258.
29. Ni,W., Zhan,Y., He,H., Maynard,E., Balschi,J.A. and Oettgen,P. (2007) Ets-1 is a critical transcriptional regulator of reactive oxygen species and p47(phox) gene expression in response to angiotensin II. *Circ. Res.*, **101**, 985-994.
30. Helguera,P., Pelsman,A., Pigino,G., Wolvetang,E., Head,E. and Busciglio,J. (2005) ets-2 promotes the activation of a mitochondrial death pathway in Down's syndrome neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 2295-2303.
31. Hayashi,T., Juliet,P.A., Matsui-Hirai,H., Miyazaki,A., Fukatsu,A., Funami,J., Iguchi,A. and Ignarro,L.J. (2005) L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 13681-13686.
32. Wilson,L.A., Yamamoto,H. and Singh,G. (2004) Role of the transcription factor Ets-1 in cisplatin resistance. *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 823-832.

Tables

Table I. Identities of differentially expressed proteins in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line.

Spot number	Average abundance ratio (a)	Protein description	Protein designation	Accession number (b)	Theor. MW (Da) (c)	Observed app. MW (Da)	Mascot score	Pep match (d)	% seq (d)
674	-1,44	Ezrin	EZR	P15311	69484	71379	167	28	44,0
703	-1,36	glycine-tRNA ligase	GARS	P41250	83828	70543	69	13	21
704	-1,37	glycine-tRNA ligase	GARS	P41250	83828	83828	153	19	30
959	1,56	heterogeneous ribonuclear particle protein L	HNRNPL	P14866	60719	64860	103	21	42
969	1,62	heterogeneous ribonuclear particle protein L	HNRNPL	P14866	60719	64479	79	13	27,8
970	1,51	heterogeneous ribonuclear particle protein L	HNRNPL	P14866	60719	64479	84	13	27,8
1085	-1,43	pyruvate Kinase, M1 isozyme	PKM2	P14618	58339	61509	157	24	46
1150	1,32	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit MCCB	MCCC2	Q9HCC0	61808	59899	79	11	20
1164	-1,61	tryptophan -tRNA ligase	WARS	P23381	53474	59023	88	10	27,2
1168	-1,36	similar to tubulin alpha 2	TUBA1B	Q8WU19	37707	58849	110	10	39
1198*	-1,78	tryptophan -tRNA ligase	WARS	P23381	53474	58849	48	9	27,6
1215*	-1,4	adenyl cyclase-associated protein 1	CAP1	Q01518	51795	58590	78	8	29
1233	-1,31	FK506-binding protein 4 (PPIase)	FKBP4	Q02790	51926	57903	108	14	28
1242	1,38	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRPH1	P31943	49484	57394	86	17	44
1277	-1,48	Testin	TES	Q9UGI8	48703	56721	87	7	24,8
1349	1,52	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	ALDH7A1	P49419	55714	55155	64	7	18,4
1361	1,38	Spliceosome RNA helicase BAT1	BAT1	Q13838	49416	54912	69	11	40
1362*	-1,33	GDP dissociation inhibitor 2	GDI2	P50395	51087	54912	81	16	33
1362**	-1,33	methionine adenosyltransferase	MAT2A	P31153	43975	54912	69	2	6
1378*	1,37	Spliceosome RNA helicase BAT1	BAT1	Q13838	49416	54188	78	14	35
1378**	1,37	RuvB-like 2	RUVBL2	Q9Y230	48489	54188	116	19	8
1378**	1,37	similar to eukaryotic translation termination factor 1	ETF1	Q96CG1	45662	54188	62	4	11
1409	-1,81	Guanine aminohydrolase	GAH	Q9H335	53316	53317	106	10	28,2
1534*	1,34	TAR DNA - binding protein-43	TARDBP	Q13148	44711	50563	67	7	35
1561	-1,44	keratin 8	KRT8	P05787	53671	49239	121	18	47
1568**	1,51	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	P51991	39799	49530	65	1	20,0
1570	-1,72	Isocitrate dehydrogenase	IDH1	O75874	46944	49603	87	8	19,6
1571*	1,45	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	P51991	39799	49384	74	11	32
1573	-1,48	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	P00558	44568	49384	167	27	73
1607	1,58	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRPA3	P51991	39799	48519	88	13	40,2
1634	-1,38	Fructose-bisphosphate, aldolase A	ALDOA	P04075	39720	47880	138	19	65
1682*	-1,44	aspartate aminotransferase	GOT1	P17174	46316	46971	55	8	17
1682*	-1,44	acyl-CoA hydrolase	ACOT7	O00154	37795	46971	54	9	26
1715	1,45	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1	HNRPA2B1	P22626	37464	45809	82	11	38
1725	1,39	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	HNRNPC	Q86SF8	32375	45540	66	10	37
1733	1,59	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRPA3	Q99729	30683	45406	81	9	27
1735*	1,64	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRPA3	Q99729	30683	45339	93	10	30,5
1747	1,4	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRPA3	Q99729	30569	44940	89	15	42

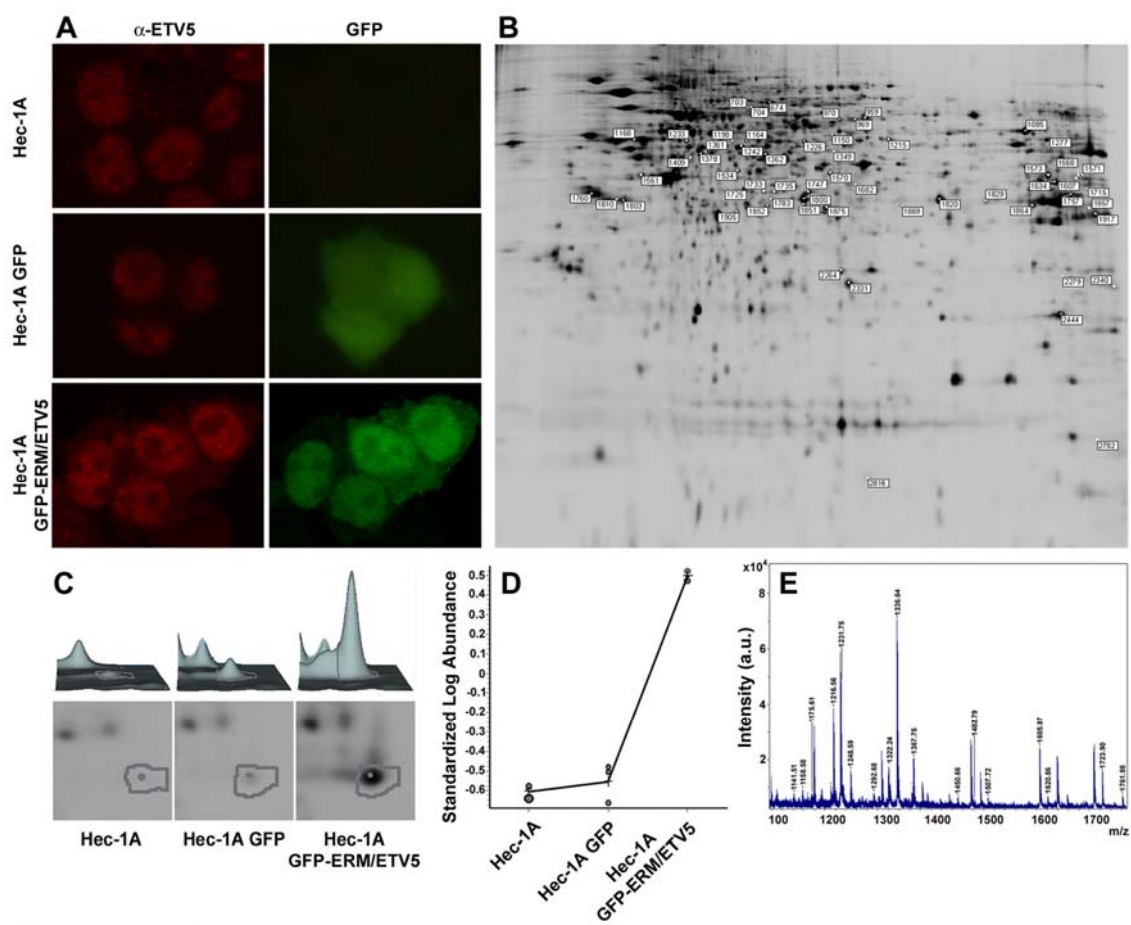
1757	1,37	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1	HNRNPA2B1	P22626	37464	44676	74	15	47
1760	1,43	nucleophosmin	NPM1	P06748	32726	44742	90	12	33
1783	-1,57	Annexin A1	ANXA1	P04083	38787	43828	109	11	40,0
1800	-1,98	Annexin A1 (AnnexinII) (Lipocortin)	ANXA2	P04083	38787	43507	149	16	49,9
1803	1,46	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	HNRPC	Q86SF8	32318	43379	75	12	29
1810*	1,43	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	HNRPC	Q86SF8	4,94	32318	63	14	41
1820	-1,41	Annexin A2 (Annexin II) (LipocortinII)	ANXA2	P07355	38677	43379	140	20	50,6
1829	1,4	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1	HNRNPA2B1	P22626	37407	42997	88	13	37
1851*	-1,4	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9	HNRPH3	P31942	31505	42368	86	15	51
1852	-1,34	transaldolase	TALDO1	P37837	36531	42243	68	10	30
1857	1,53	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1	P09651	38805	41933	154	16	38
1864	-1,97	3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	AKR1C3	P52895	37111	41933	72	10	45,5
1869	-3,23	3alpha-hydroxycholanate dehydrogenase	AKR1C2	P52895	37111	41687	108	13	37,2
1875	1,34	A+U-rich element RNA binding factor	HNRPDL	O14979	30337	41625	72	10	25
1905	-1,34	transaldolase	TALDO1	P37837	36531	40536	58	8	25
1917	1,45	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	P09651	38805	40655	199	19	50
2264	-1,34	phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	P18669	28769	30012	80	9	35
2331	-1,38	Triosephosphate isomerase	TPI1	P00938	26807	28004	94	11	58
2340	10,99	α -dicarbonyl reductase	HEP27	Q13268	29926	27307	101	12	38,9
2444	-1,39	probable thioredoxin peroxidase	PRDX1	Q06830	22324	24060	150	13	55
2782	1,43	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	P07741	19635	12806	48	5	22
2816*	-1,41	Cystatin B	CSTB	P04080	11167	11167	46	4	55,1

*protein identification was confirmed by ion trap mass spectrometer

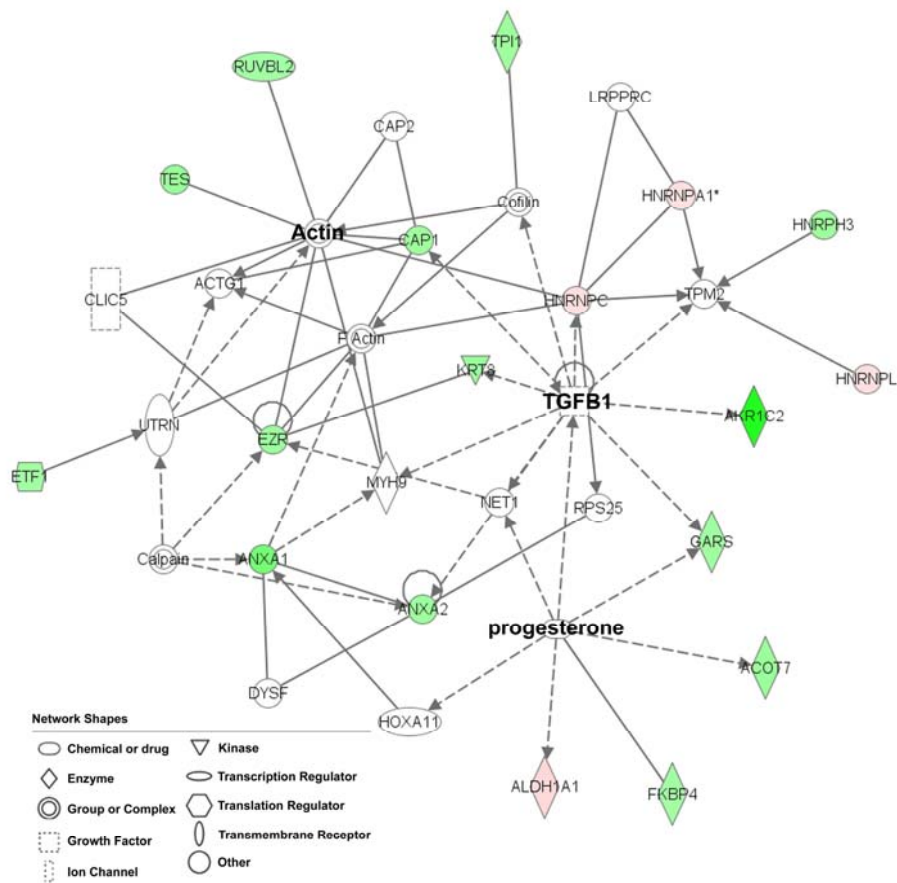
**protein was identified by ion trap mass spectrometer

- a) Abundance ratio averaged from the different gels of the DIGE experiment.
- b) Accession numbers of proteins were derived from Uniprot database.
- c) Theoretical molecular mass calculated from the amino acid sequence and mature protein, respectively.
- d) Number of peptides matched and percentage of sequence coverage.

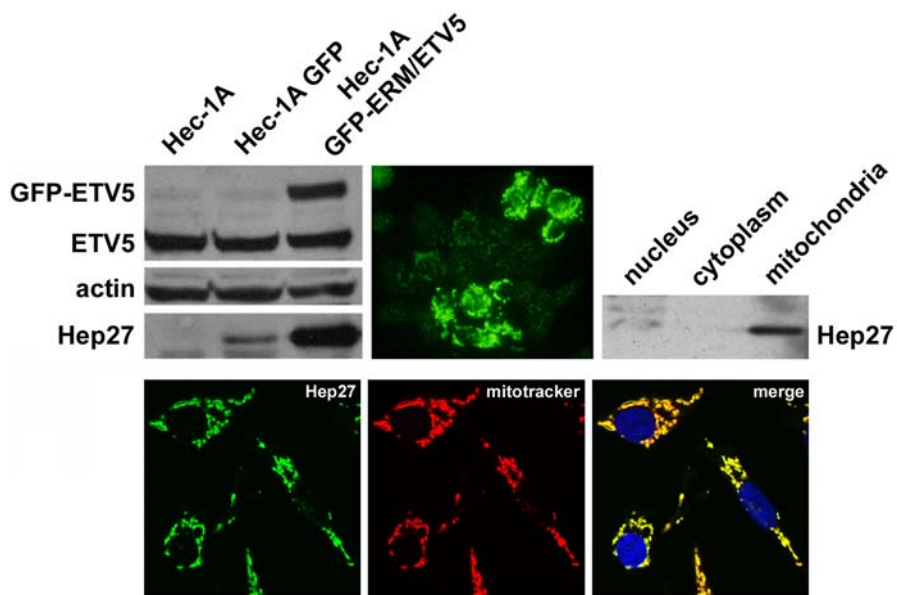
Figures



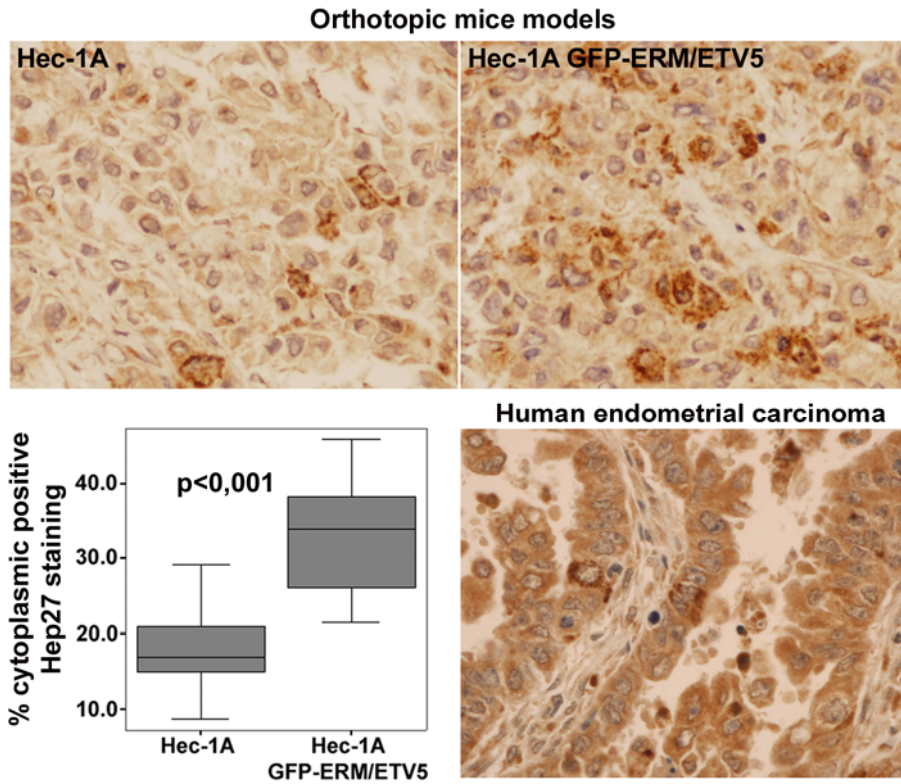
Monge et al., Figure 1



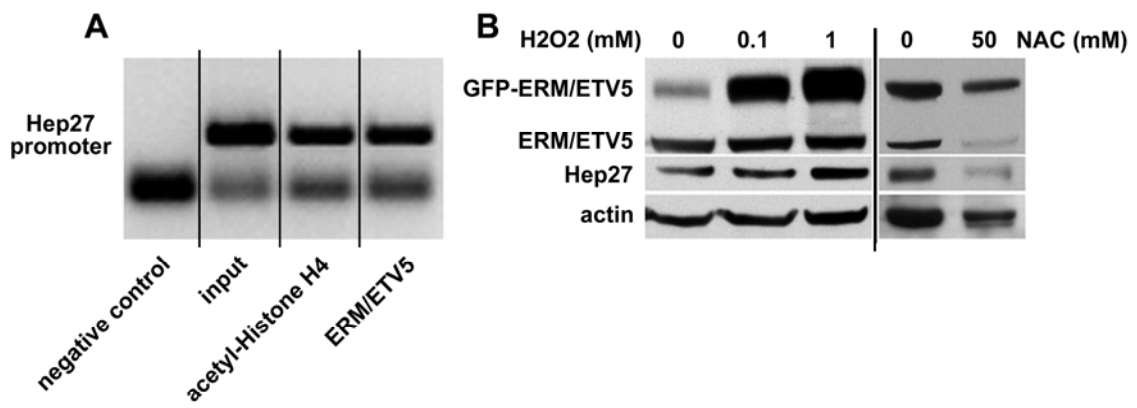
Monge et al., Figure 2



Monge et al., Figure 3



Monge et al., figure 4



Monge et al., Figure 5

Legends to Figures

Fig. 1. 2D-DIGE analysis of ERM/ETV5 regulated proteins in Hec-1A cell line. A, Immunofluorescence against GFP and ERM/ETV5 in the Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 endometrial cancer cell lines. B, Protein extract from the three cell lines were labeled with fluorescent Cy dyes, combined and separated by 2-DE on a pH 3–10 non-linear gradient IPG strip and a 12.5% acrylamide gels. The image shows a fluorescence image in which the relevant spots that were submitted to MALDI-TOF MS identification were marked with its Master spot number. The differences were detected with a fold variation of plus-minus 1.3 and a p-value <0.005. C, 3-D view and fluorescence image gel amplification for 2340 spot. D, Standardised abundance plots for spot #2340, identifies by MS as Hep27. The graph displays the abundance observed for spot #2340 in each of the nine gel images corresponding to Hec-1A, Hec-1A GFP and Hec-1A GFP-ERM/ETV5 samples, after standardising the values using the internal standard pool images (Cy2) of each of the nine gels. The line links the average abundance values for each group of samples (crosses). E, MALDI reflector mass spectrum of the tryptic digest of spot #2340, allowed the identification by PMF of Hep27.

Fig. 2. Pathway analysis of proteins differentially expressed under the control of ERM/ETV5 in the Hec-1A endometrial cancer cell and analysed by 2D-DIGE. When the 60 spots differentially expressed in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line were input into IPA, it mapped them to a network with TGF α , progesterone and actin in the main nodes. Information about the analysis of biological functions and pathways, as well as network interactions is available at the IPA website (Ingenuity Systems 2008). Color shading corresponds to the type of deregulation, red for up-regulated genes, and green for down-regulated. White open nodes are not from among the protein list but are proteins associated with the regulation of some of these proteins identified by 2D-DIGE. A line denotes binding of proteins while a line with an arrow denotes 'acts on'. A dotted line denotes an indirect interaction. Descriptions of the genes, including *P* value (<0.005) and average fold change (ranging ± 1.3) are provided in Table I.

Fig. 3. Over expression of ERM/ETV5 induces mitochondrial Hep27 up-regulation. A, Western blot detection of endogenous human ERM/ETV5 protein, transfected GFP-ERM/ETV5 protein and Hep27 in the cell lines developed. Actin was used as a loading control. B, Hep27 immunofluorescence detection in the stable cell line Hec-1A GFP-ERM/ETV5. C, Hep27 protein expression after subcellular fractionation in ERM/ETV5 over-expressing Hec-1A cells. D, Laser scanning confocal microscopy showing the results of double-labeling experiments on Hec-1A GFP-ERM/ETV5. In green immunolocalization of Hep27 protein which colocalizes with the red signal produced by the MitoTracker marker.

Fig. 4. Increased Hep27 expression in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 orthotopic endometrial cancer model. Upper panels: Hep27 immunostaining of primary tumors originated from Hec-1A or Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cells, showed increased Hep27 positive cells associated with the overexpression of ERM/ETV5. Lower left panel: the graphic represents the quantification of cytoplasmic positive Hep27 staining and evaluated by three independent investigators. Lower right panel: Hep27 staining in human endometrial carcinoma tissue sections.

Fig. 5. Up-regulation of ERM/ETV5 and Hep27 in response to oxidative stress. A, The analysis of the promoter region of Hep27 shows Ets putative binding sites. PCR analysis of the chromatin immunoprecipitated with antibodies directed against ERM/ETV5 shows specific binding to the promoter region of Hep27 in the Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line. Irrelevant IgGs and antibodies directed against the acetylated histone are shown as negative and positive controls, respectively. B, Hec-1A GFP-ERM/ETV5 cell line was treated with 0.1 and 1 mM of H₂O₂ for 30min. In the same way, stable cell line Hec-1A GFP-ERM/ETV5 was treated for 4h with 50mM NAC. The protein extracts were analysed by western blot against ETV5 and Hep27, and actin was used as a loading control.

[Molecular & Cellular Proteomics, submitted]

Proteomic approach to endometrial carcinoma invasion front

Marta Monge¹, Andreas Doll¹, Eva Colas¹, Antonio Gil-Moreno^{2,5}, Josep Castellvi^{3,5}, Angel Garcia^{3,5}, Nuria Colome⁴, Asumpcio Perez-Benavente², Nuria Pedrola¹, Xavier Dolcet⁶, Santiago Ramon y Cajal^{3,5}, Jordi Xercavins^{2,5}, Xavier Matias-Guiu⁶, Francesc Canals⁴, Jaume Reventos^{1,5} and Miguel Abal¹

¹Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ²Departament de Ginecologia Oncològica, Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ³Departament de Patologia, Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ⁴Laboratori de Proteòmica, Programa de Recerca Oncològica Mèdica, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón; ⁵Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya; ⁶Departament de Patologia i Genètica Molecular, Hospital Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida, IRB-LLEIDA, Espanya

La invasió tumoral defineix la transició entre carcinomes restringits al teixit, amb un bon pronòstic ja que és possible aplicar cirurgia, i els tumors metastàtics associats a mal pronòstic i amb una disminució considerable de la supervivència. En el carcinoma endometrial, la infiltració miometrial representa un paràmetre molt valuós per a determinar el pronòstic de la malaltia. En el front d'invasió existeix una forta regulació espaietemps provinent del tumor i de l'estroma que l'envolta. Fins ara, la immunohistoquímica ha estat l'eina utilitzada per a la identificació de proteïnes implicades en la invasió del carcinoma endometrial, sense tenir en compte la percepció global del front d'invasió. En aquest treball hem dut a terme una aproximació proteòmica per a caracteritzar components específics del front d'invasió o l'estroma reactiu mitjançant la comparació de l'àrea invasiva d'un carcinoma endometrial anvers l'àrea tumoral superficial no invasiva i el teixit normal provinents de la mateixa pacient. Aquesta estratègia ens ha permès identificar proteïnes diferencialment expressades en el front d'invasió i que es troben implicades en la morfologia cel·lular, acoblament i moviment, així com els mecanismes moleculars relacionats amb la senyalització i interacció cèl·lula-cèl·lula i la resposta moduladora a l'estrès oxidatiu. En resum, ha estat possible descriure una nova estratègia proteòmica que puntualitza específicament en el front d'invasió del carcinoma endometrial, permetent la identificació de nous protagonistes implicats en la infiltració miometrial.

[Molecular & Cellular Proteomics, submitted]

Proteomic approach to endometrial carcinoma invasion front

Marta Monge¹, Andreas Doll¹, Eva Colas¹, Antonio Gil-Moreno^{2,5}, Josep Castellví^{3,5}, Àngel Garcia^{3,5}, Núria Colomé⁴, Assumpció Perez-Benavente^{3,5}, Núria Pedrola⁶, Xavier Dolcet⁴, Santiago Ramon y Cajal^{1,5}, Jordi Xercavins^{2,5}, Xavier Matias-Guiu⁴, Francesc Canals⁴, Jaume Reventos^{1,5} and Miguel Abal¹

¹ Biomedical Research Unit, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital; ² Department of Gynecological Oncology, Vall d'Hebron University Hospital; ³ Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital; ⁴ Proteomics Laboratory, Medical Oncology Research Program, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital; ⁵ University Autònoma of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶ Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Spain

Running title: Proteomic approach to endometrial carcinoma invasion front

Corresponding author: Miguel Abal, Biomedical Research Unit, Research Institute Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. mabal@ir.vhebron.net

Supported by grants: Spanish Ministry of Education and Science (SAF 2005-06771), Spanish Ministry of Health (RTICC RD06/0020/0058 to JR; RD06/0020/1034 to XM; FIS CP05/00240 to MA; FIS CP05/00028 to XD), Catalan Institute of Health (DURSI 2005SGR00553), and Fundacio La Marato de TV3 (2005-47; 050431). MM is the recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Health (FIS 05/00090), EC from the Spanish Ministry of Education and Science (BES-2006-14152).

Abbreviations

2D-DIGE: Two dimensional differential in gel electrophoresis; MALDI-MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry; CHCA: α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; NAC: N-acetyl-L-cystein; SOD1: Superoxide dismutase 1; BLVRB: Biliverdin reductase B; N: normal tissue; ST: superficial tumor; DT: deep tumor; LCM: laser capture microdissection; ROS: reactive oxygen species; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition.

Summary

Tumor invasion defines the transition between tissue-restricted carcinomas, with good outcome as optimal surgery becomes possible, and metastatic tumors associated with poor prognosis and a dramatic decreased in survival. In endometrial cancer, myometrial infiltration represents a determinant parameter highly valuable in prognosis. A profound spatio-temporal regulation from both the tumor and the surrounding stroma occurs at the invasive front. To date, the identification of proteins involved in endometrial carcinoma invasion has been essentially conducted by immunohistochemical methods, without a global perception on the invasive front. In this work we attempted a proteomic approach to characterise specific components of the invasive front or reactive stroma by comparing the invasive area of an endometrial carcinoma with the noninvasive superficial area and normal tissue from the same patients. This strategy led us to identify proteins involved in cellular morphology, assembly and movement, differentially expressed at the invasive front, as well as pathways like cell-to-cell signalling and interaction and a modulated response to oxidative stress as events related to endometrial carcinoma invasion. In conclusion, we describe a novel proteomic approach that specifically deals with endometrial carcinoma invasion front, allowing the identification of new players of myometrial infiltration.

Introduction

The heterogeneity of tumor tissues has been largely illustrated not only in terms of space with miscellany in morphology and biology among different areas of the same tumor but also in terms of time as a continuous tumor evolution. These evidences are nurturing functional proteomics and genomics as a more realistic perspective in cancer research than a steady state analysis where gene modifications on bulk tumor specimens are correlated with carcinogenesis (1). In this context, one of the areas of a tumor tissue where protein expression has been observed to be dynamically adapted is the invasive front, as a principal component of the interaction between a tumor and the surroundings. This has been evidenced not only on those tumor modifications that are induced by the microenvironment as cytokines or inflammatory mediators but also on those associated with the phenotype of the epithelial cells that become invasive (i.e., epithelial to mesenchymal transition). All this has led tumor invasion to become an active and promising field of research (2). From a clinical point of view, tumor invasion defines the frontier between tissue-restricted carcinoma and disseminated tumor cells. The former represents good outcome as optimal surgery, the best therapeutic alternative nowadays, becomes possible. The later is associated with poor prognosis and a dramatic decreased in survival, with therapeutic options based on radiotherapy and chemotherapy showing limited efficacy and being still a promise when dissemination and metastasis are present. Endometrial cancer, the most frequently diagnosed malignancy of the female genital tract in industrialized countries, represents an example of this dichotomy. Endometrial carcinomas are usually well to moderately differentiated, showing endometrioid morphology, and confined to the uterine corpus at diagnosis, and thus most can be cured. Notwithstanding its excellent prognosis, myometrial infiltration and distant metastasis are the most devastating points in endometrial cancer; approximately 25% of the patients who have undergone surgical staging are found to have extrauterine disease (3, 4). Indeed, myometrial invasion is the most valuable parameter for prognosis, together with grade. Tumor stratification is revised after pathology examination and the therapeutic intervention is defined by these parameters.

The precise molecular events that occur during the development, progression/invasion and formation of metastasis in endometrial carcinoma are largely uncharacterised and are still relatively poorly understood (5). Gradually, the complexity of endometrial tumor invasion is being characterised. Players during invasion are not restricted to the tumor cells that conform the epithelial glands infiltrating the myometrium, but also the reactive stroma in close interaction with these glands, the inflammatory components activated in reaction to the act of invasion, and the activated endothelia associated with angiogenesis play essential roles in the initial achievement of infiltration and dissemination (6-8).

At the same time, immunohistochemical methods describing the pattern of expression of a particular protein have been the standard in the study of endometrial tumor invasion, without a global perspective to the invasive front of endometrial carcinomas. In this article, we designed a novel approach based on proteomics to the study of endometrial tumor invasion. By comparing areas of tumor infiltration with areas of no tumor infiltration and normal endometrium from the

same patients, we characterised new proteins differentially expressed at the invading front.

Experimental Procedures

Patients and sample collection. In this study we included a group of patients, who underwent surgery for endometrial carcinoma in the Departments of Gynecological Oncology at the Hospital Vall d'Hebron in Barcelona, and at the Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. Patients ranged from 50 to 80 years of age. None of the patients had received radiation and/or hormonal therapy or chemotherapy treatment prior to surgery. The protocol was previously approved by the Institutional Review Boards, and informed consent was obtained from all of the patients involved in the study. After surgery, each tissue sample was immediately dissected by a pathologist, with normal tissue, superficial and deep tumor sections being collected from each patient, and stored at -80°C and paraffin-embedded until analysis. The proteomic analysis was performed in a four patient series of endometrial carcinomas from stage IC. An additional confirmation series was formed by specimens from five independent patients also diagnosed for stage IC invasive endometrial carcinomas, and finally, a set of thirty tissue sections from invasive and non-invasive endometrial carcinomas from stages IA, IB and IC were selected for protein analysis by immunohistochemistry.

Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis proteomic analysis. Normal tissue, superficial and deep tumor sections were lysed by the addition of 500 μL of lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5). The mixture was sonicated 8 times for 10 seconds on ice and then centrifuged at 12,000 g at 4°C for 3 min. 100 μL of each protein extract was further purified by a modified TCA-acetone precipitation (2-D-CleanUp kit, Amersham Biosciences, Munich, Germany) and, finally, resuspended in lysis buffer. Protein concentration was determined using the BioRad RCDC Protein Assay (BioRad, Madrid, Spain).

Two dimensional differential in gel electrophoresis (2D-DIGE). A pool consisting of equal amounts of each of the samples analyzed in the DIGE experiment was prepared to be used as internal standard for quantitative comparisons (9). Tissue samples were labeled with Cy3 or Cy5 cyanine dyes while internal standard pooled sample was labeled with Cy2 dye, by the addition of 400 pmol of Cy dye in 1 μL of anhydrous N,Ndimethylformamide per 50 μg of protein. To avoid any possible bias introduced by labelling efficiency, half of the samples from each group were labelled with Cy3 dye and the other half with Cy5 dye. After 30 min of incubation on ice in the dark, the reaction was quenched with 10 mM lysine and additionally incubated for 10 min. Samples were finally combined according to the experimental design, at 50 μg of protein per Cy dye per gel, and diluted twofold with IEF sample buffer (7 M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 2% DTT, 2% pharmalytes pH 3–10, 0.002% bromophenol blue). The 2D-DIGE was performed using GE-Healthcare reagents and equipment (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). First dimension IEF was performed on IPG strips (24 cm; linear gradient pH 3–10) using an Ettan IPGphor system (Amersham Biosciences). Initially, strips were incubated overnight in 450 μL of rehydration buffer (7 M urea, 2M thiourea, 4% w/v CHAPS, 1% pharmalytes pH 3–10, 100 mM

DeStreak, 0.002% bromophenol blue). Then samples were applied via cup loading near the acidic end of the strips. After focusing for a total of 67 kV x h, strips were equilibrated first for 15 min in 6 mL of reducing solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 5 mg/mL DTT, 0.002% bromophenol blue) and then in 6 mL of alkylating solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 22.5 mg/mL iodoacetamide, 0.002% bromophenol blue) for 15 min, on a rocking platform. Second dimension SDS-PAGE were run by overlaying the strips on 12.5% isocratic Laemmli gels (24 x 20 cm), casted in low fluorescence glass plates, on an Ettan DALTsix system (Amersham Biosciences). Gels were run at 20°C, at constant power 2.5 W/gel for 30 min followed by 17 W/gel until the bromophenol blue tracking front reached the end of the gel. Fluorescence images of the gels were acquired on a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare). Cy2, Cy3 and Cy5 images were scanned at 488 nm/520 nm, 532 nm/580 nm and 633 nm/670 nm excitation/emission wavelengths respectively, at a 100 μ m resolution. Image analysis and statistical quantification of relative protein abundances was performed using Progenesis SameSpots v2.0 software (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK).

Protein identification. Protein spots of interest were excised from the gel using an automated Spot Picker (GE Healthcare). In-gel trypsin digestion was performed as described (10), using autolysis-stabilized trypsin (Promega, Wisconsin, USA). Tryptic digests were purified using ZipTip microtiter plates (Millipore, Bedford, USA). MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry) analysis of tryptic peptides was performed on an Ultraflex TOF-TOF Instrument (Bruker, Bremen, Germany). Samples were prepared using α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) as matrix on anchor-chip targets (Bruker). Calibration was performed in the external mode using a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). The spectra were processed using Flex Analysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Peak lists were generated using the signals in the m/z 800 to 4000 region, with a signal to noise threshold of greater than 3. The SNAP algorithm included in the software was used to select the monoisotopic peaks from the isotopic distributions observed. After removing m/z values corresponding to usually observed matrix cluster ions, an internal statistical calibration was applied. Peaks corresponding to frequently seen keratin and trypsin autolysis peptides were then removed. The resulting final peak list was used for identification of the proteins by peptide mass fingerprint. Mascot 2.2 program (Matrix Science Ltd, London UK) was used to search the Swissprot 55.4 database, limiting the search to human proteins (19630 sequences). Search parameters were as follows: trypsin cleavages excluding N-terminal to P, 1 or 2 missed cleavages allowed, carbamidomethylation set as fixed modification, methionine oxidation as variable modification, mass tolerance less than 50 ppm, monoisotopic mass values. In the case of the identified fragments of proteins, the searched protein mass was set to the observed mass according to the gel position. Criteria for positive identification were a significant Mascot probability score (score >55, p < 0.05). Alternatively, proteins were identified by ion trap mass spectrometry as described (12).

Functional pathway and network analyses were generated through the use of Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (version 2.0, Ingenuity® Systems, Mountain View, Ca).

Western-blot. Protein lysates from normal tissue, superficial and deep tumor from five independent stage IC endometrial carcinomas were used to validate protein identification as described (13). Membranes were incubated with primary antibodies 1/1000 mAb β -SOD1 (Sta. Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and 1/200 mAb α -actin (Sta. Cruz Biotechnology), and were revealed with HRP-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Glostrup, Denmark) and the SuperSignal West Dura substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

Cellular treatment and immunofluorescence. The human endometrial carcinoma cell line Hec-1A was cultured as previously described (13). Hec-1A cell line was cultured to confluence on coverslips, and a small area was disrupted by scratching a line through the layer with a pipette tip. The remaining cellular debris was removed and cells were then cultured in fresh medium with 2% FBS. After 48 hours, cells were treated with 50mM NAC (N-acetyl-L-cystein, Sigma Chemical Co., Oakville, Canada) for 30 min and fixed and permeabilized as described (13). Cells were then sequentially incubated with 1/50 mAb BLVRB (Abcam, Cambridge, UK) for 2 hours and with anti-mouse secondary antibody conjugated with 488-alexa fluor (Molecular Probes, Invitrogen, UK) for 1 hour at RT in dark. Coverslips were mounted using the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc., CA), and fluorescence was visualized and imaged on a DM-IRBE inverted fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) coupled to a TCS-NT argon/krypton confocal laser (Leica).

Immunohistochemistry. BLVRB was detected by indirect immunoperoxidase assay in 3- μ m paraffin-embedded sections, treated with heat in citrate buffer pH 7.3 for antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H₂O₂; sections were incubated with the primary antibody against BLVRB (Abcam) overnight at a 1:1000 dilution. Then sections were washed and were incubated with peroxidase conjugated goat antimouse immunoglobulin (EnVision Dual System, DAKO). Subsequently, sections were washed, and reactions were developed with diaminobenzidine, followed by counterstaining with hematoxylin. Quantitative and qualitative evaluation for BLVRB-positive immunostaining was performed by three independent investigators. The intensity of positive immunostaining was evaluated as follows: 0= negative, 1=low, 2=medium, and 3=high, and the statistical Wilcoxon analysis performed with the Statistical Package for Social Science (SPSS 12.0).

Results

Sample selection and description of the experimental approach.

To identify proteins differentially expressed at the invasive front of endometrial carcinomas, the following parts were macroscopically isolated from the same patient (Figure 1): the normal atrophic epithelia (normal tissue), the superficial part of the tumor (superficial tumor), and the invasive area of the tumor, where the epithelial glands infiltrate the myometrium (deep tumor). In the last case, the sample is mainly composed of infiltrating tumor glands and reactive stroma, with a minor contribution of non-infiltrating tumor glands and non-reactive stroma, as well as myometrium with vessels and inflammatory components (blow-up in Figure 1). The superficial part of the tumor is composed almost exclusively by tumor epithelial glands with a minimal proportion of stroma and vessels (blow-up in Figure 1). Finally, the normal tissue is participated by a thin layer of atrophic endometrial glands surrounded by non-reactive stroma, in close vicinity with the myometrium (blow-up in Figure 1). By comparing the proteome of whole extracts of each of these three areas from a number of invading carcinomas, we sought to identify specific components of the invasive front of endometrial tumors. The comparison of the deep tumor with the superficial tumor samples would render proteins differentially expressed in the infiltrating area, independently of its epithelial or reactive stromal origin. Likewise, the contribution of the residual myometrial component of the deep tumor sample should be solved by comparing the deep tumor sample with the normal tissue, which is mainly composed of myometrium. This approach should also address to what extent the features of the invasive area of a tumor are the result of specific proteins expressed in the contact area, in addition to the mere mix of epithelial tumor glands, reactive stroma and myometrium in a variable proportion.

DIGE analysis and identification of proteins differentially expressed at the invasive tumor front.

We analysed these three areas from four different patients by DIGE technology, to identify specific proteins of the invasive front. DIGE permits direct comparison of all components from all patients as protein gels are normalized with a pool of proteins from all the samples included in the study. The proteins were resolved in a 12.5% acrylamide gel after an IEF in linear gradient strips of pH 3– 10, and the statistical analysis performed with the Progenesis SameSpots v2.0 software (Nonlinear Dynamics, UK). To avoid any possible bias derived from the labeling efficiency, half of the samples of each group were labeled with Cy3 dye and the other half with Cy5 dye. A third fluorescent dye, Cy2, was used to label the internal standard sample. Two samples and an aliquot of the internal standard pool were then separated by 2D-DIGE in each one of the gels. We found 715 spots differentially expressed with a significant value (T test ≤ 0.05 and fold change ± 1.3), when we compared deep tumor samples with both superficial tumor or normal tissue samples. Correlation analysis and hierarchical clustering classified the detected spots depending on their behaviour among the three types of samples. Of these

differentially expressed spots, 63% corresponded to proteins that increased their expression from normal endometrial tissue to tumor tissue (Figure 2). Focussing on the deep tumor samples, the vast majority of these proteins presented intermediate levels between the normal tissue levels and the superficial tumor samples. A group of them showed levels of expression in the deep tumor sample similar to those in the normal endometrial tissue (42% of total differentially expressed spots; Figure 2A), and another group presented levels of expression similar to that of the superficial tumor samples (20.3% of total differentially expressed spots; Figure 2B). These results suggested that the majority of the proteins in the deep tumor specimens behaved as a mix of normal and tumor tissue components. Moreover, the fact that in the deep tumor samples the expression of a particular protein was similar to the normal tissue or to the superficial tumor tissue levels must be a reflection of the contribution of each component to the invasive tumor area. More interestingly, a small number of proteins showed increased levels of expression in the deep tumor samples compared to both the normal and superficial tumor tissues (1.4% of total differentially expressed spots; Figure 2C). The experimental approach that we conducted implied that these proteins should be specifically over-expressed in the invasive tumor glands or in the reactive stroma, independently of the different contribution of the normal and superficial tumor components. This same profiling accounted for the reverse behaviour where the tumor samples presented decreased levels of expression compared to the normal endometrial tissue, and a reduced set of proteins whose expression also decreased when compared between the superficial and deep tumor specimens (data not shown). Once selected, this small group of spots representing proteins differentially expressed in the tumor invasive front were submitted to digestion and MALDI-TOF identification. Of those spots in which the identification was possible, proteins are described in Table I. Interestingly, the biological interpretation of these results by Ingenuity Pathway Analysis showed that among the biological processes most significantly perturbed in the deep tumor area, we found cell morphology, cellular assembly and organization, cellular movement or tissue morphology, with a number of proteins involved in several pathways as DES, MSN, SERPINH1, FSCN1, SOD1 and TPM4. Likewise, the protein interactions and molecular relationships pointed to cell-to-cell signalling and interaction as the main network altered, with the antioxidant enzyme Superoxide Dismutase 1 (SOD1) as a main player (14).

Validation of SOD1 expression profile in normal tissue and in superficial and deep tumor samples.

To confirm the expression profile of proteins specific of the deep tumor specimens, we first analysed by western-blot the levels of expression of SOD1. For this, five additional patients with their respective normal tissue, superficial and deep tumor specimens, were analysed. In Figure 3, two representative examples of the levels of SOD1 are shown, corresponding to two different patients (upper panel), and the overall normalized evaluation of the SOD1 levels in the different specimens from the five patients is represented in the histogram (lower panel). As can be observed, SOD1 levels dropped from normal to superficial tumor tissue and continued to

decrease when compared the superficial with the deep area of the tumor. These results confirmed those obtained in the DIGE analysis and suggested a specific inhibition of SOD1 at the invasive front of the tumor.

Validation of BLVRB as a protein differentially expressed in the invasive front of endometrial carcinomas.

We further sought to evaluate by immunohistochemistry the precise expression of one of the proteins identified as differentially expressed in the deep tumor specimens. To this purpose, we analyzed the expression of Biliverdin Reductase B (BLVRB), a possible protector of cells from oxidative damage (15), in a series of tumor samples with a focus on the invasive tumor region (Figure 4). Thirty-three endometrial carcinoma samples presenting different degrees of myometrial infiltration (9 stage IA EECs, 14 stage IB EECs and 10 stage IC EECs) were analyzed. Overall, BLVRB positively labelled the normal atrophic endometrial glands, the myometrium and the tumor with a cytoplasmic and nuclear staining. More specifically, the intensity of the labelling was markedly increased at the epithelial glands in contact with the myometrium that define the tumor front, while reduced at the reactive stroma (left panel, Figure 4). When analysed BLVRB staining in those samples that presented a certain degree of myometrial infiltration (stages IB and IC, n=24), the statistical treatment of the data rendered significance to an increased expression of BLVRB at the tumor invasion front when compared to the superficial mass of the tumor ($p < 0,001$; right panel, Figure 4). No differences on BLVRB expression were found between the tumor boundary and the contiguous stromal tissue in the endometrial carcinoma samples that do not present myometrial invasion (stage IA, n=9; not shown). Finally, we sought to further confirm the specific location of BLVRB at the tumor invasion front by analysing its expression profile in a model system as the invasive front of a monolayer of endometrial cancer cells, Hec-1A, after a wound with a tip. Twenty-four hours after the wound-healing, when the monolayer of Hec-1A cells presented an active invasive front, BLVRB showed increased levels at the migrating front cellular region as compared to the inner mass of the monolayer (upper panel, Figure 5). We further evidenced the specificity of this pattern of expression by incubating the wounded cells with the antioxidant agent N-acetyl-L-cysteine (NAC) (lower panel, Figure 5).

Discussion

The immediate tumor cell microenvironment concentrates crucial events that define tumor invasion, with a profound spatio-temporal regulation from both the tumor and the surrounding stroma in the so called invasion front. In this work we attempted a proteomic approach to characterise specific components of the invasive front or reactive stroma by comparing the invasive area of a tumor with the superficial tumor area and normal tissue from the same patients. Independently of the contribution of the myometrium to the invasive area, we could identify proteins specifically up-or down-regulated in the invasion front. Traditionally, tissue complexity required the isolation of specific cell types and laser capture microdissection (LCM) provided the capability to isolate and analyse small numbers of cells from a specific area of a histology section. Microdissection of areas involved in tumor infiltration has been the standard procedure for the study of specific actors of invasion, mainly by genomics and combining LCM and software assisted image analysis. Saturation dyes are making microdissection techniques to become compatible with downstream proteomic analyses (16, 17). This will also require the use of highly sensitive MS techniques to identify the significantly altered proteins isolated using methods such as LCM (18), to end on the execution of large-scale proteomics in an efficient, accurate and reproducible way (19). Nevertheless, and in spite of the promising future of these technologies, to date the identification of proteins involved in tumor invasion has been essentially conducted by immunohistochemical methods. This was the case for the identification of the extracellular matrix glycoprotein Tenascin (20), the angiogenic Thymidine phosphorylase (21), or the Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme (22), as proteins involved at the invasive front of endometrial carcinomas. The approach that we conducted indicates that the protein composition of the contact area between an invading endometrial tumor and its adjacent myometrium is mainly represented by a mixture of these two tissue types, but it also reveals that there is a reduced group of proteins specifically up-or down-regulated at the invasive front. Taking into account that the deep tumor sample is composed of tumor epithelial glands and myometrium, with a contact layer of invasive tumor glands and reactive stroma, we envisaged that a protein differentially expressed in this invasive front should present higher or lower expression levels when compared to the pure tumor epithelial glands and to the myometrium. The validation of our results by western-blot and immunohistochemistry, confirmed this hypothesis. Another approach would consist in evaluating the contribution of each component of the deep tumor sample by histopathology, to then normalize the differential expression of each detected spot. However, the complexity when working with samples from different patients with different percentages of myometrial or tumor contribution to the deep tumor samples, in addition to the heterogeneity of cell types that compose the different tissue areas analysed, avoid nowadays a global approach to the invasive front comparable to the one we conducted. Concerning the limitations of our study, we are aware that we are probably missing proteins whose increased expression at the invasive front of endometrial carcinomas compared to the superficial tumor can be masked by a major contribution to the deep tumor sample of a low expressing myometrium (or viceversa). This would result in a lower level of expression of the

whole deep tumor sample compared to the superficial tumor, and our approach identifies proteins whose expression in the deep tumor samples is higher (or lower) to both the superficial tumor and the normal tissue. Some of the proteins that we identified as differentially expressed at the invasive front of endometrial carcinomas, have been already described as specific of the invasive tumor front, like Fascin1 in colorectal cancer, with a transient up-regulation that promotes the acquisition of migratory and invasive phenotypes that led to metastasis (23). Likewise, cellular assembly and cell-to-cell interactions are considered as key events in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), during the acquisition of an invasive phenotype by epithelial endometrial carcinoma cells (5). The identification of different enzymes involved in oxidative stress, as SOD1 or BLVRB was especially interesting. Reactive oxygen species (ROS) have been recently proposed to be involved in tumor metastasis. ROS is generated during tumor progression and ROS targets downstream molecules to trigger tumor metastasis, especially in the initial stage that includes EMT and cell migration (24). Changes in cellular redox state have been coupled to the control of actin cytoskeleton rearrangements by Rho GTPases (25). Alternatively, ROS have also been demonstrated to induce apoptosis, cell cycle arrest and cellular senescence through the uncoupling of the electron transport chain in mitochondria and to a decrease in mitochondrial membrane potential (26). ROS and tumor invasion has been connected through the transcriptional activation of nuclear factor (NF)-kappaB (27, 28), the extracellular signal-regulated kinase (ERK) (29), or the AP-1 signaling pathway (30). Indeed, we described a role for the transcription factor ETV5 in a modulated response to oxidative stress associated with the promotion of invasion in endometrial cancer (Monge et al., adjunct manuscript on review). We propose a regulation of enzymes protective against ROS that are generated during and promote the process of tumor invasion, specifically located at the invasive front. These findings led us to strengthen the value of ROS induction and response during myometrial infiltration in endometrial cancer, in the design of anti-invasive drug cancer therapies. The potential combination with an effect on proteasome inhibition and induction of apoptosis (31), makes it an attractive therapeutic approach to explore. Although early detected in its initial stages by disease-related symptoms, 20% of patients present myometrial invasion and/or lymph node affectation, main indicators related to poor prognosis and decrease in survival rate. After primary surgical treatment, chemotherapy demonstrated no proven benefit in advanced tumors that do not respond to hormones, highlighting the necessity of developing new therapies in endometrial cancer associated with myometrial infiltration, tumor dissemination and metastasis (32). To conclude, we present a novel proteomic approach that specifically deals with endometrial carcinoma invasion front, allowing the identification of new players of myometrial infiltration and thus potential targets for therapies directed against the initial steps of endometrial metastasis.

Acknowledgements

Proteomics Laboratory is a member of the Spanish National Institute for Proteomics (PROTEORED) funded by Fundación Genoma España. The authors wish to thank Sonia Martinez for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Alaoui-Jamali, M. A., and Xu, Y. J. (2006) Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 7, 411-420
2. Dowling, P., Walsh, N., and Clynes, M. (2008) Membrane and membrane-associated proteins involved in the aggressive phenotype displayed by highly invasive cancer cells. *Proteomics* 8, 40544065
3. Creasman, W. T., Morrow, C. P., Bundy, B. N., Homesley, H. D., Graham, J. E., and Heller, P. B. (1987) Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 60, 2035-2041
4. Vardi, J. R., Tadros, G. H., Anselmo, M. T., and Rafla, S. D. (1992) The value of exploratory laparotomy in patients with endometrial carcinoma according to the new International Federation of Gynecology and Obstetrics staging. *Obstet. Gynecol.* 80, 204-208
5. Abal, M., Llauro, M., Doll, A., Monge, M., Colas, E., Gonzalez, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Demajo, S., Castellvi, J., Garcia, A., Ramon y Cajal, S., Xercavins, J., Vazquez-Levin, M. H., Alameda, F., Gil-Moreno, A., and Reventos, J. (2007) Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 272-277
6. Engelsen, I. B., Mannelqvist, M., Stefansson, I. M., Carter, S. L., Beroukhi, R., Oyan, A. M., Otte, A. P., Kalland, K. H., Akslen, L. A., and Salvesen, H. B. (2008) Low BMI-1 expression is associated with an activated BMI-1-driven signature, vascular invasion, and hormone receptor loss in endometrial carcinoma. *Br. J. Cancer* 98, 1662-1669
7. Sivridis, E. (2001) Angiogenesis and endometrial cancer. *Anticancer Res.* 21, 4383-4388
8. Tsukamoto, H., Shibata, K., Kajiyama, H., Terauchi, M., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2007) Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction. *Clin. Exp. Metastasis* 24, 423-429
9. Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., and Currie, I. (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3, 36-44
10. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858
11. Garcia-Ramirez, M., Canals, F., Hernandez, C., Colome, N., Ferrer, C., Carrasco, E., Garcia-Arumi, J., and Simo, R. (2007) Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50, 1294-1303
12. Esselens, C. W., Malapeira, J., Colome, N., Moss, M., Canals, F., and Arribas, J. (2008)

- Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol. Chem.* 389, 1075-1084
13. Monge, M., Colas, E., Doll, A., Gonzalez, M., Gil-Moreno, A., Planaguma, J., Quiles, M., Arbos, M. A., Garcia, A., Castellvi, J., Llaurodo, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Xercavins, J., Alameda, F., Reventos, J., and Abal, M. (2007) ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res.* 67, 6753-6759
 14. Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112
 15. Pereira, P. J., Macedo-Ribeiro, S., Parraga, A., Perez-Luque, R., Cunningham, O., Darcy, K., Mantle, T. J., and Coll, M. (2001) Structure of human biliverdin IXbeta reductase, an early fetal bilirubin IXbeta producing enzyme. *Nat. Struct. Biol.* 8, 215-220
 16. Greengauz-Roberts, O., Stoppler, H., Nomura, S., Yamaguchi, H., Goldenring, J. R., Podolsky, R. H., Lee, J. R., and Dynan, W. S. (2005) Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens. *Proteomics* 5, 1746-1757
 17. Rodriguez, A. S., Espina, B. H., Espina, V., and Liotta, L. A. (2008) Automated laser capture microdissection for tissue proteomics. *Methods Mol. Biol.* 441, 71-90
 18. Wilson, K. E., Marouga, R., Prime, J. E., Pashby, D. P., Orange, P. R., Crosier, S., Keith, A. B., Lathe, R., Mullins, J., Estibeiro, P., Bergling, H., Hawkins, E., and Morris, C. M. (2005) Comparative proteomic analysis using samples obtained with laser microdissection and saturation dye labelling. *Proteomics* 5, 3851-3858
 19. Kondo, T., and Hirohashi, S. (2006) Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat. Protoc.* 1, 2940-2956
 20. Doi, D., Araki, T., and Asano, G. (1996) Immunohistochemical localization of tenascin, estrogen receptor and transforming growth factor-beta 1 in human endometrial carcinoma. *Gynecol. Obstet. Invest.* 41, 61-66
 21. Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Bicknell, R., Harris, A. L., and Gatter, K. C. (1999) Thymidine phosphorylase expression in endometrial carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 445-450
 22. Sedlmayr, P., Semlitsch, M., Gebru, G., Karpf, E., Reich, O., Tang, T., Wintersteiger, R., Takikawa, O., and Dohr, G. (2003) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in carcinoma of human endometrium and uterine cervix. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 91-95
 23. Vignjevic, D., Schoumacher, M., Gavert, N., Janssen, K. P., Jih, G., Lae, M., Louvard, D., Ben-Ze'ev, A., and Robine, S. (2007) Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res.* 67, 6844-6853

24. Wu, W. S. (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*
25. 695-705 25. Nimnual, A. S., Taylor, L. J., and Bar-Sagi, D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236-241
26. Storz, P. (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 10, 1881-1896
27. Lee, K. J., Hwang, S. J., Choi, J. H., and Jeong, H. G. (2008) Saponins derived from the roots of *Platycodon grandiflorum* inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NFkappaB activation via ROS signal pathway. *Cancer Lett.* 268, 233-243
28. Park, M. J., Lee, J. Y., Kwak, H. J., Park, C. M., Lee, H. C., Woo, S. H., Jin, H. O., Han, C. J., An, S., Lee, S. H., Chung, H. Y., Park, I. C., Hong, S. I., and Rhee, C. H. (2005) Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor-kappaB and reactive oxygen species. *J. Cell. Biochem.* 95, 955-969
29. Kim, K. H., Cho, Y. S., Park, J. M., Yoon, S. O., Kim, K. W., and Chung, A. S. (2007) Pro-MMP-2 activation by the PPARgamma agonist, ciglitazone, induces cell invasion through the generation of ROS and the activation of ERK. *FEBS Lett.* 581, 3303-3310
30. Kim, M. H., Cho, H. S., Jung, M., Hong, M. H., Lee, S. K., Shin, B. A., Ahn, B. W., and Jung, Y. D. (2005) Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* 26, 1669-1674
31. Llobet, D., Eritja, N., Encinas, M., Sorolla, A., Yeramian, A., Schoenenberger, J. A., Llombart-Cussac, A., Marti, R. M., Matias-Guiu, X., and Dolcet, X. (2008) Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 19, 115-124
32. Abal, M., Planaguma, J., Gil-Moreno, A., Monge, M., Gonzalez, M., Baro, T., Garcia, A., Castellvi, J., Ramon, Y. C. S., Xercavins, J., Alameda, F., and Reventos, J. (2006) Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histol. Histopathol.* 21, 197-204

Figure Legends

Figure 1. Myometrial infiltration in endometrial cancer. Hematoxylin/Eosin images of a representative area of endometrial tumor infiltration where we depict in the blow-ups the different areas selected for the proteomic approach: the normal atrophic epithelia (normal tissue), the deep bulk of the tumour (superficial tumour), and the invasion front where the epithelial tumor glands infiltrate the myometrium (deep tumour).

Figure 2. Correlation Analysis enables the clustering of proteins according to their expression profile among normal tissue and superficial and deep tumor. A. Selected red nodes in the dendrogram correspond to spots whose expression is higher in the deep tumor samples compared with normal endometrial tissue samples, but lower than in the superficial tumor sample. B. Group of spots with similar expression profiles between the invasive area and superficial tumor rather than normal tissue samples. C. Set of proteins whose expression is increased in deep tumor samples compared with both normal and superficial tumor specimens.

Figure 3. Western blot detection of human SOD1 protein in human endometrial carcinoma tissue samples validates DIGE analysis. The expression levels of SOD1 were compared by western blot in normal tissue, superficial and deep tumor from five independent human endometrial cancer patients. Two representative examples are shown in the upper panel, with actin as a loading control. In the histogram are represented the median normalized values for all samples analyzed (lower panel). Error bars represent standard deviation of five measurements.

Figure 4. Specific BLVRB expression at the invasive front of human endometrial tumor tissue sections. A. BLVRB expression at the invasive tumour region of a representative human endometrial carcinoma. Note the increased BLVRB staining at the deep tumor (DT), compared to normal atrophic endometrial glands (EN), the myometrium (M) and the superficial tumor (SP). Magnification: 40x. B. Statistical analysis of BLVRB expression in human endometrial carcinomas with a certain degree of myometrial infiltration (stages IB and IC, n=24) reveals increased BLVRB expression at the tumour invasion front ($p < 0,001$, Wilcoxon Analysis).

Figure 5. BLVRB localizes at the invasive front in a monolayer of Hec-1A endometrial cancer cell line. Hec-1A cell line cultured to confluence were subjected to a wound by lightly scratching with a pipette tip, and further processed for BLVRB immunofluorescence staining. BLVRB is specifically expressed at the invasive front of the monolayer after 24h of wounding (upper panel). The specificity of this labeling was assessed by treatment with the antioxidant agent N-acetyl-L-cystein (NAC), revealing the complete inhibition of BLVRB expression at the invasive front (lower panel). The invasive front is marked with a red dotted line.

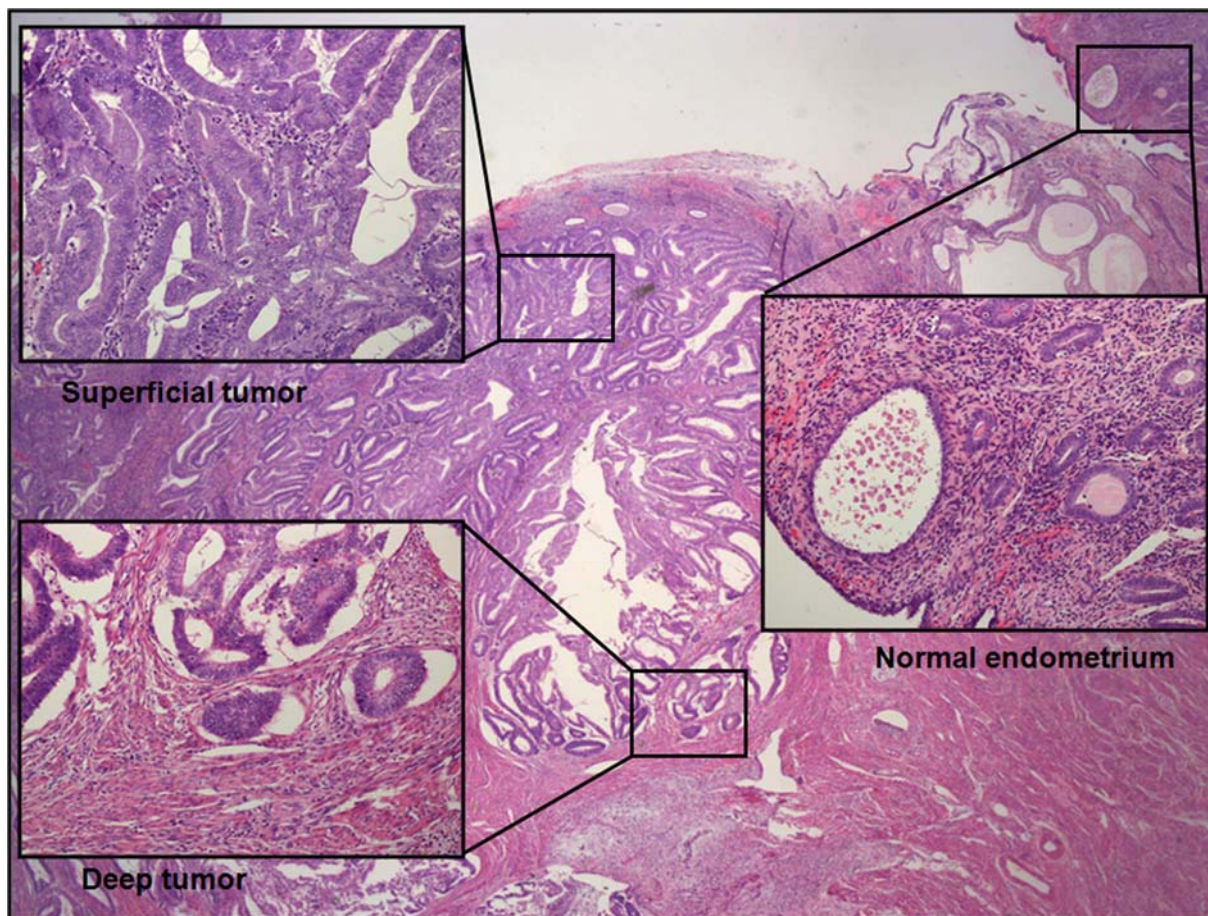
Tables Table1. Identities of proteins differentially expressed specifically in the invasive area of the tumor. Spots were selected according to their expression profile as indicated in Fig. 2C.

Spot number	Protein Identification	Uniprot Access #	Theoretical		Observed		Mascot Score	Matched peptides	Sequence Coverage %	Average abundance ratio		
			pI	MW (Da)	pI	MW (kDa)				N vs ST	N vs DT	ST vs DT
103	Serpin H1	P50454	8,75	46525	≈ 8,5	48	95 (41)	13 (35)	34	-2,21	-3,72	-1,68
155	Nicotinamide N-methyltransferase*	P40261	5,56	30011	≈ 5,3	28	47,22	1	3,79	-1,52	-3,18	-2,09
269	Tropomyosin alpha-4 chain)	P67936	4,67	28487	≈ 4,5	29	159 (40)	16 (26)	52	-1,71	-2,51	-1,47
288	Desmin	P17661	5,21	53429	≈ 5,5	30	61 (40)	10 (26)	28	1,84	2,43	1,32
358	Transthyretin	P02766	5,33	12835	≈ 5,3	14	84 (45)	6 (20)	46	1,61	2,24	1,39
586	Biliverdin reductase B	P30043	7,31	22088	≈ 7,4	23	74 (40)	5 (8)	27	1,23	1,71	1,39
615	Transport protein Sec23 isoform A	T09574	6,64	87004	≈ 6,8	90	115 (44)	16 (30)	24	-1,24	-1,67	-1,35
648	Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	P21912	9,14	32406	≈ 8,7	30	79 (50)	12 (35)	37	1,30	1,59	1,23
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q53GD8	9,43	25245	≈ 8,7	30	86 (41)	9 (26)	35			
676	Human Superoxid dismutase	P00441	5,7	16023	≈ 5,7	18	112 (54)	8 (22)	69	1,33	1,51	1,14
704	Fascin	Q16658	6,81	54992	≈ 6,9	52	70 (53)	8 (20)	20	-1,29	-1,39	-1,08
1023	Moesin	P26038	6,09	67761	≈ 6,2	73	242 (47)	42 (28)	49	-1,19	-1,71	-1,44

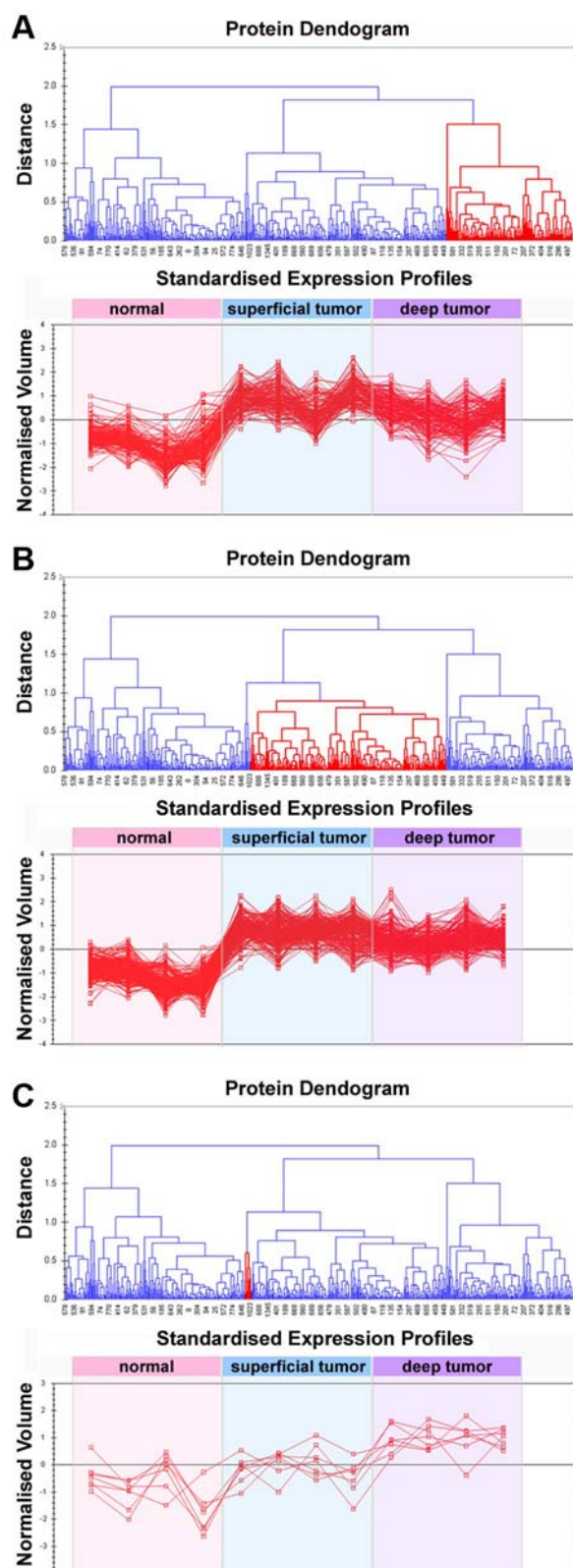
* NNMT protein identification was performed by ion trap mass spectrometer

Mascot search scores are shown for the top match and, in parenthesis, for the highest ranked hit to a non-homologous protein. "Matched peptides" column shows the number of peptides matching to the top-match protein and, in parenthesis, the number of unmatched peptides in the spectra. Average abundance ratios between normal (N), superficial (ST) and deep tumor (DT) tissue, are shown in the last three columns.

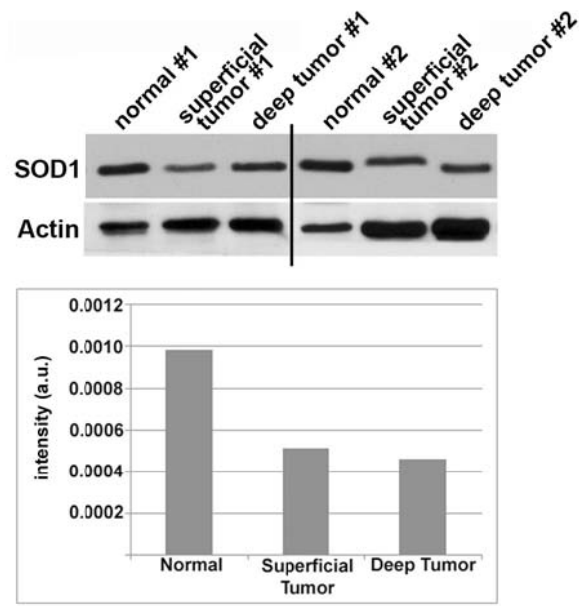
Figures



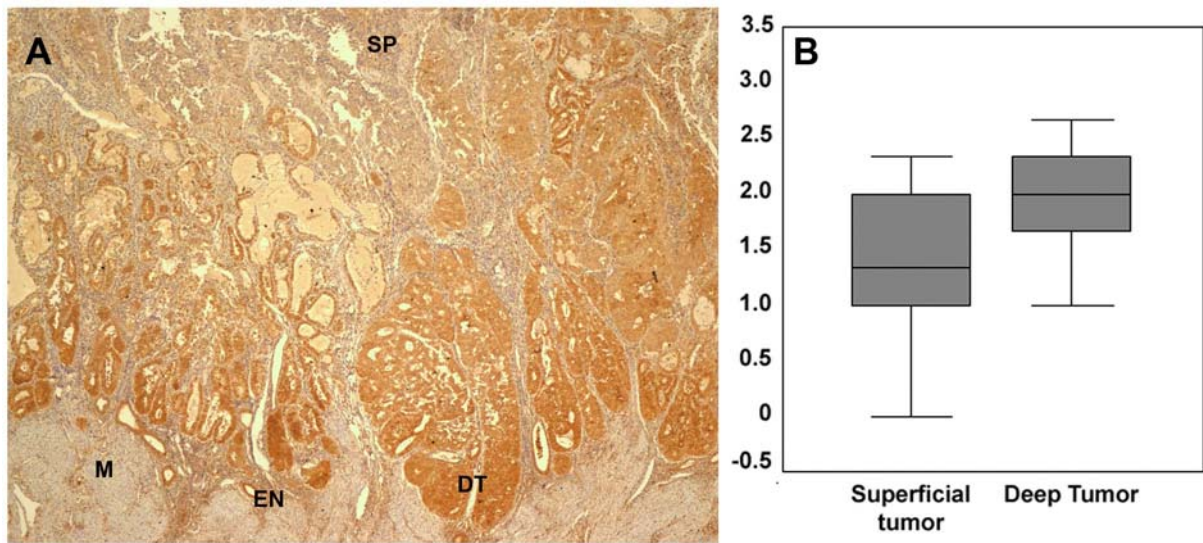
Monge et al., figure 1



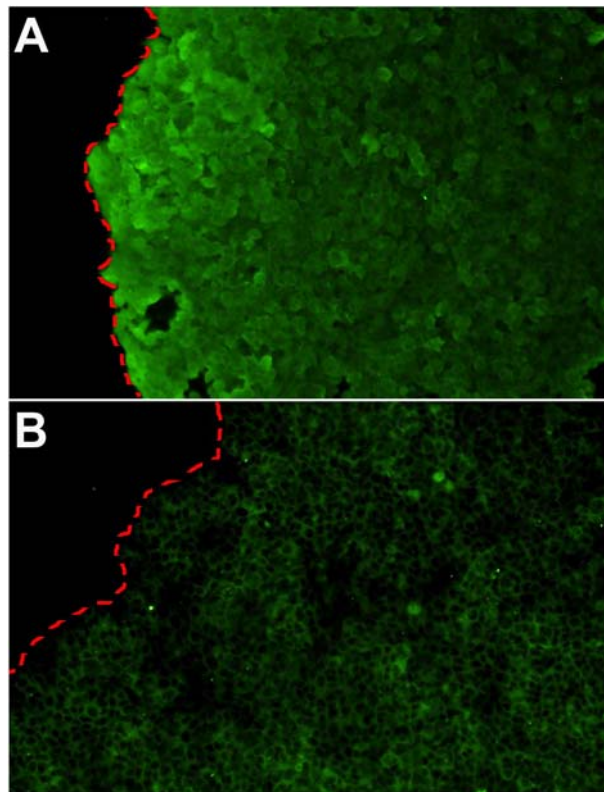
Monge et al., figure 2



Monge et al., figure 3



Monge et al., figure 4



Monge et al., figure 5