



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,
FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO
CÁNCER: BIOLOGÍA Y CLÍNICA

Alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer de endometrio

Memoria para optar al grado de DOCTOR

Raquel Ramírez Moreno

Fdo. El Director

Juan Carlos Díaz Chico

Fdo. El Director

B. Nicolás Díaz Chico

Fdo. El Director

Fco. Germán Rguez González

Fdo. El Doctorando

Raquel Ramírez Moreno

Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Septiembre de 2010

D. JUAN CARLOS DÍAZ CHICO, PROFESOR TITULAR DE BIOQUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que D^a. Raquel Ramírez Moreno, licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

“ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO”

Una vez revisada la presente memoria, la encuentra apta para su defensa ante el tribunal para la obtención del título de Doctor, mención Doctor Europeo, por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Septiembre de 2010.



Fdo. D. Juan Carlos Díaz Chico

D. B. NICOLÁS DÍAZ CHICO, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLÓGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que D^a. Raquel Ramírez Moreno, licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

“ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO”

Una vez revisada la presente memoria, la encuentra apta para su defensa ante el tribunal para la obtención del título de Doctor, mención Doctor Europeo, por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Septiembre de 2010.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Fdo. D.B. Nicolás Díaz Chico

D. Fco. GERMÁN RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, POSTDOCTORAL RESEARCHER. MEDICAL ONCOLOGY DEPARTMENT. JOSEPHINE NEFKENS INSTITUTE, ERASMUS MEDICAL CENTER, ROTTERDAM.

CERTIFICA,

Que D^a. Raquel Ramírez Moreno, licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

“ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO”

Una vez revisada la presente memoria, la encuentra apta para su defensa ante el tribunal para la obtención del título de Doctor, mención Doctor Europeo, por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende la presente certificación en Rotterdam a 2 de Septiembre de 2010.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above the printed name of the certifier.

Fdo. D. Fco. Germán Rodríguez González



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer de endometrio

Raquel Ramírez Moreno
Las Palmas de Gran Canaria, 2010

Índice

Capítulo 1

Introducción General	17
1. El Endometrio: anatomía, morfología y función	19
2. El carcinoma de endometrio	23
2.1 Epidemiología y etiología	23
2.2 Factores de riesgo	24
2.3 Factores pronóstico y tratamiento	25
3. Bases moleculares del carcinoma endometrial	29
3.1 Principales alteraciones moleculares	29
3.2 La inestabilidad microsatélite (MSI)	30
3.3 La inestabilidad cromosómica (CIN)	33
3.4 Alteraciones de los genes PTEN, PI3K, KRAS y P53	34
4. La ruta de señalización celular Wnt en el carcinoma endometrial	39
4.1 Generalidades	39
4.2 Alteraciones de los genes β -Catenina, APC y E-Cadherina	41
5. Referencias	44

Capítulo 2

Planteamiento y objetivos	55
---------------------------	----

Capítulo 3

Alta incidencia de mutaciones del gen EPHB2 en tumores gástricos pero no en los de endometrio con inestabilidad de microsatélites <i>Oncogene. 2007 Jan 11; 26 (2):308-11</i>	59
--	----

Capítulo 4

Los genes reparadores de roturas en la doble cadena del ADN son frecuentes dianas de la inestabilidad de microsatélites en el cáncer de endometrio
Eur J Cancer. 2010 Jul 16. [Epub ahead of print]. 69

Capítulo 5

El silenciamiento epigenético del gen EPHB4 es un posible marcador pronóstico en cáncer de endometrio 87

Capítulo 6

La metilación conjunta de los genes SFRP1, 2 y 5 está asociada con una peor evolución clínica de las pacientes con cáncer de endometrio 103

Capítulo 7

La metilación del gen PITX2 es un marcador de peor pronóstico en los tumores de endometrio con un contenido diploide de ADN 123

Capítulo 8

Abstract in English 139

Capítulo 9

Conclusiones/Conclusions 147

Anexos

I. Información suplementaria I
II. *Curriculum Vitae* III
III. Financiación VI
IV. Agradecimientos/Acknowledgements VII

Capítulo 1
Introducción general

1. El endometrio: anatomía, morfología y función

El endometrio es la mucosa que tapiza la cavidad del útero (Fig.1A). Su función principal es crear el microambiente necesario para la implantación y el desarrollo del embrión hasta que éste pueda nutrirse de la madre a través de la placenta. Morfológicamente, podemos dividirlo en dos capas: *funcional* y *basal*. La primera se descama y renueva cada mes, durante el ciclo menstrual, mientras que la *basal* permanece y constituye la base para regenerar el endometrio. Los principales componentes histológicos que forman esta mucosa son: el epitelio, el estroma, las arterias espirales y las células inmunitarias residentes (Fig. 1B).

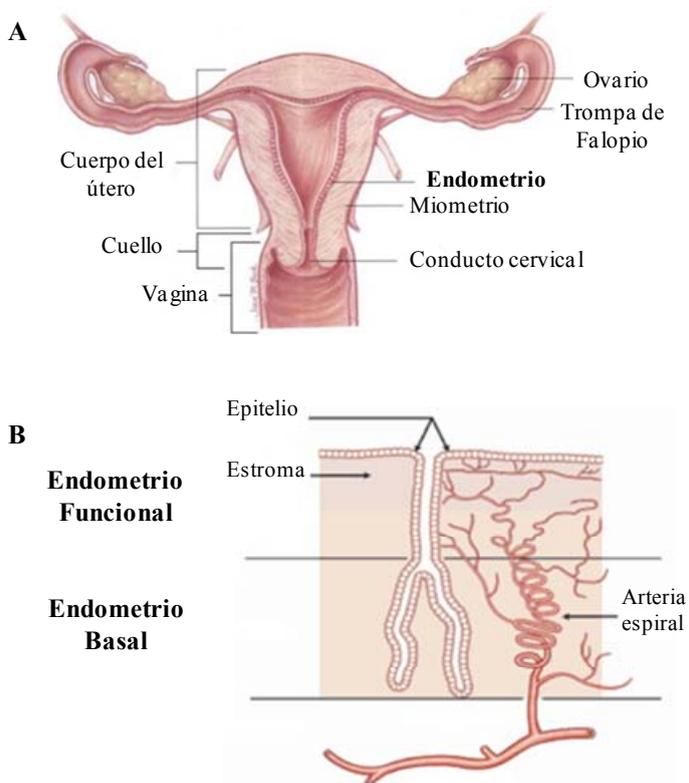


Figura 1. A: Esquema del aparato reproductivo femenino. **B:** Anatomía funcional del endometrio. Una monocapa de células epiteliales recubre la superficie del estroma, y penetra en él con profundas invaginaciones (estructuras glandulares) que casi alcanzan la superficie del miometrio. El estroma está formado por células fibroblásticas estromales, arterias espirales que atraviesan todo el grosor del endometrio y células inmunitarias residentes (1).

El ciclo menstrual es un proceso coordinado. Mientras el ovocito madura para ser fecundado, el endometrio se prepara para recibir al futuro embrión. Los cambios histológicos producidos durante el ciclo endometrial están íntimamente ligados a la producción cíclica de estrógenos y progesterona del ovario.

A pesar de ser un proceso gradual, el ciclo endometrial se puede dividir en tres fases principales: menstrual, proliferativa y secretora.

Fase menstrual: comprende del día 1 al 4 del ciclo. Predominan bajos niveles de estrógenos y progesterona produciendo en el endometrio un cambio en el flujo sanguíneo, lo que desencadena la hemorragia que acompaña al desprendimiento de la capa *funcional* (menstruación). El primer día de la menstruación representa el inicio del ciclo menstrual. Después de esta fase, queda un endometrio delgado, donde únicamente está presente la capa *basal*.

Fase Proliferativa: del día 5 al 14 del ciclo. Durante el desarrollo del folículo ovárico, éste secreta estrógenos que hacen que el endometrio se vuelva a regenerar. Crece el número y la longitud de las estructuras glandulares adoptando formas rectilíneas. El estroma incrementa su masa y se produce el alargamiento de las arterias espirales. En esta etapa el espesor del endometrio aumenta de 0,5mm a 5mm aproximadamente.

Fase secretora: del día 15 al 28. Tras la ovulación (mitad del ciclo) se secretan grandes cantidades de estrógenos y progesterona por parte del cuerpo lúteo. Los estrógenos provocan una ligera proliferación adicional, y la progesterona una notable diferenciación del endometrio. Las células del epitelio secretan material rico en glucógeno y mucopolisacáridos, y las estructuras glandulares se ensanchan. El aporte sanguíneo al endometrio sigue aumentando de forma proporcional al desarrollo de la actividad secretora, con gran tortuosidad de los vasos sanguíneos. Del día 20 al 24 del ciclo supone el periodo de máxima receptividad endometrial (Fig.2).

Si el óvulo es fecundado, la implantación comienza aproximadamente en el sexto día de la fase secretora (día 21 del ciclo). Para ello el endometrio secretor se transforma en un endometrio gestante o decidua, que dará origen a la porción materna de la placenta. Las células diferenciadas del estroma se transforman en

células deciduales que acumulan glucógeno y lípidos en su citoplasma. A medida que el óvulo fecundado invade el endometrio las células deciduales degeneran en la proximidad del saco coriónico, y junto con la sangre materna y las secreciones endometriales suponen una rica fuente de nutrientes para el embrión. Si no ocurre la fecundación, las concentraciones de estrógenos y progesterona disminuyen debido a la degeneración del cuerpo lúteo. Entonces, el endometrio secretor se transforma en un endometrio isquémico, disminuyendo la perfusión sanguínea por vasoconstricción de las arterias espirales, se detiene la secreción glandular y se pierde líquido intersticial. El resultado final es la menstruación y el comienzo de un nuevo ciclo.

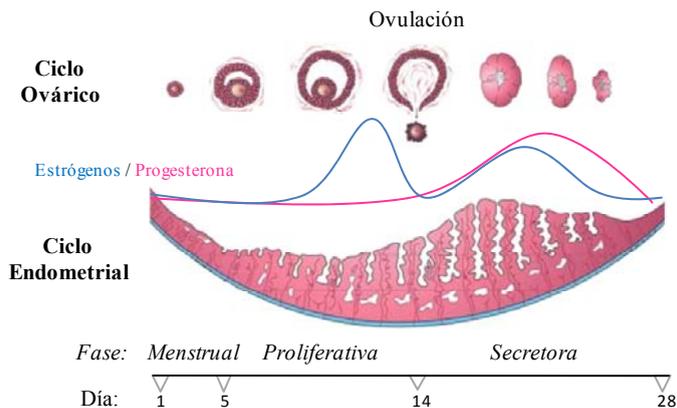


Figura 2. Esquema que muestra las relaciones entre el ovario y el endometrio durante el ciclo menstrual. Las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) promueven las modificaciones cíclicas de la estructura y función del endometrio (2).

Excepto durante el embarazo, el ciclo menstrual se repite cada 28 días a lo largo de la vida reproductiva de la mujer, desde la menarquia (primera menstruación) hasta la menopausia (cese permanente de la menstruación).

La menopausia, un estado fisiológico que forma parte del proceso natural de envejecimiento, se produce a una edad media de 50 años. Y se caracteriza por el cese de la secreción hormonal ovárica, dando lugar a cambios que afectan al aparato urogenital, sistema cardiovascular y óseo. Estos cambios, anatómicos y fisiológicos,

son progresivos. Al aproximarse la menopausia es cada vez mayor la porción del endometrio que no responde completamente al estímulo hormonal. Cuando esta estimulación cesa, desaparece definitivamente el ciclo menstrual y el endometrio regresa a su estado prepuberal o inactivo. El epitelio endometrial queda reducido a un tejido monocapa, las glándulas adoptan una forma esférica y el componente estromal se convierte en el más abundante con una morfología densa y fibrosa. Se reserva el término perimenopausia para el periodo de tiempo que precede a la última menstruación y los doce meses posteriores, y postmenopausia para todos los años que siguen tras la última menstruación (1-4).

2. El carcinoma de endometrio (CE)

El tejido endometrial, está sometido a un complejo proceso de regulación para llevar a cabo su función correctamente. Este proceso es el resultado del equilibrio entre los factores reguladores que lo estimulan e inhiben: principalmente hormonas esteroideas como los estrógenos y la progesterona, que coordinan los diferentes tipos celulares que lo forman. Los elementos que modulan el crecimiento y la proliferación celular pueden ser susceptibles de alteraciones moleculares (genéticas y epigenéticas) y/o ambientales, que conducen a la alteración del proceso normal de regulación del tejido endometrial y a la aparición y desarrollo de la patología tumoral.

2.1 Epidemiología y etiología

El CE es el tumor más frecuente del tracto genital femenino en los países desarrollados (5). A mediados de los años 70, y coincidiendo con el inicio de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres perimenopáusicas, se observó un aumento en su incidencia. Es un tumor con dependencia hormonal, de manera que, ante cualquier estímulo estrogénico mantenido sin aumento de la exposición a progesterona, se facilita el desarrollo de la enfermedad (6, 7).

En cuanto al número de casos, ocupa el cuarto lugar después del carcinoma de mama, colon y pulmón, y el séptimo como causa de muerte (5). Es considerado un tumor de buen pronóstico, que generalmente se diagnostica en etapas iniciales. Sin embargo, no es de esperar una disminución importante en su incidencia en los próximos años, ya que ni la detección precoz ni las distintas opciones terapéuticas tienen una influencia en la mortalidad (3).

El CE es, fundamentalmente, una enfermedad postmenopáusica siendo la edad media en el momento del diagnóstico de 60 años. Sin embargo, un 25% de los casos se desarrolla en mujeres premenopáusicas, y un 5% en menores de 40 años (8). Entre un 5-10% tienen una base hereditaria, cuya principal causa es el síndrome de Lynch o cáncer colorectal hereditario no polipósico (HNPCC). La gran mayoría de los casos (90%) son esporádicos con una etiología, aún desconocida (9).

Basándose en evidencias clínicas e histopatológicas, J. Bokhman (1983) propuso al menos dos mecanismos que podrían explicar el origen de los CE (10). Así existirían dos tipos diferentes:

Tipo I o carcinomas endometrioides (responsable de más del 80% de los casos) que corresponden a pacientes con una historia de exposición prolongada a estrógenos, endógenos o exógenos, no contrarrestada por progestágenos. Este tipo de tumor comienza como una hiperplasia endometrial que progresa a carcinoma.

Tipo II o carcinomas no endometrioides surge espontáneamente sobre la base de un endometrio atrófico o inerte, por lo general en mujeres postmenopáusicas, en ausencia de hiper-estrogenismo y sin relación clara de progresión de hiperplasia a carcinoma.

Además de un origen distinto, el comportamiento clínico de estos dos tipos tumorales es diferente. Los CE de Tipo I tienen mejor pronóstico que los de carcinogénesis desconocida o Tipo II (Tabla 1) (10, 11).

Tabla 1. Principales características clinico-patológicas de los CE

Características	Tipo I	Tipo II
Edad	Pre/Perimenopáusica	Postmenopáusica
Exposición a estrógenos	Presente	Ausente
Etiología	Hiperplasia	Endometrio atrófico
Tipo Histológico	endometriode	no endometriode
Grado histológico	Bajo	Alto
Invasión miometrial	Mínima	Profunda
Prognosis	Favorable	Desfavorable

2.2 Factores de riesgo

El endometrio es un tejido hormono-dependiente. Cambios en el equilibrio entre los niveles de estrógenos y progesterona, hacia una producción relativamente mayor de estrógenos aumenta el riesgo de CE.

En la menopausia, la estimulación hormonal por parte del ovario cesa. Sin embargo, una pequeña cantidad de estrógenos sigue produciéndose naturalmente en

las glándulas suprarrenales y en el tejido adiposo, como consecuencia de la actividad aromatasa que transforma los andrógenos en estradiol (12). Así, una dieta rica en grasas animales, la falta de ejercicio físico y el sobrepeso aumentan entre 2 y 10 veces el riesgo de padecer esta enfermedad. Otros factores, asociados con la obesidad, como la hipertensión y la diabetes, lo elevan 1,5 y 3 veces respectivamente.

La menarquia temprana en combinación con una menopausia tardía, y la nuliparidad favorecen, también, el desarrollo del tumor por la prolongada exposición a los estrógenos durante la edad reproductiva de la mujer. La mitad de los CE debutan en pacientes que no han estado embarazadas, y su riesgo relativo es mayor de 2 si se acompaña de infertilidad. La anovulación hace que el endometrio esté menos expuesto al efecto de la progesterona, permaneciendo en un estado proliferativo con niveles máximos de estrógenos (13, 14).

Otro factor de riesgo es la administración exógena de sustancias con actividad estrogénica. Como ejemplos, los tratamientos hormonales sustitutivos prescritos a las mujeres perimenopaúsicas (a base de estrógenos sin progestágenos), o el Tamoxifeno usado como tratamiento adyuvante en cáncer de mama que ejercen, ambos, una acción proliferativa en el endometrio (6, 7, 15).

Las hiperplasias endometriales, el síndrome de ovarios poliquísticos y factores hereditarios como el síndrome de Lynch, también pueden contribuir a elevar el riesgo de una mujer a desarrollar esta enfermedad (16, 17).

Para los CE de Tipo II, no asociados a una historia de hiperestrogenismo, no existen factores de riesgo definidos (3).

2.3 Factores pronósticos y tratamiento

En cáncer, las características clínico-patológicas y biológicas del tumor son usadas como factor pronóstico porque aportan información precisa acerca del comportamiento clínico de la paciente. Así es posible la identificación de grupos de alto riesgo y evita los tratamientos adyuvantes innecesarios en pacientes de buen pronóstico. Los factores a los que clásicamente se le ha dado un valor pronósticos en

CE son: el estadiaje, la edad, el tipo histológico, el grado de diferenciación tumoral y la invasión miometrial, vascular y linfática (3).

El estadiaje del CE es quirúrgico de acuerdo con las recomendaciones de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, 1988) (18, 19). Los carcinomas, según esta clasificación, se dividen en cuatro estadios: (I) tumor limitado al cuerpo uterino, (II) extensión del tumor a la cérvix, (III) extensión a los órganos pélvicos y (IV) extensión más allá de los órganos pélvicos. Además, cada uno de ellos se divide en subestadios (Tabla 2).

El estadio varía el pronóstico del tumor, con una supervivencia a los 5 años de aproximadamente: 83% para el estadio I, 73% para el estadio II, 52% para el estadio III y 27% para el estadio IV. Afortunadamente, el 80% de todos los CE están confinados al útero en el momento del diagnóstico (20).

Tabla 2. Clasificación FIGO (1988). Estadiaje quirúrgico-patológico de los CE

Estadio	Características
IA G123	tumor limitado al endometrio.
IB G123	invasión menor de 50% del miometrio
IC G123	invasión mayor de 50% del miometrio
IIA G123	complicación glandular endocervical solamente
IIB G123	invasión estromática cervical
IIIA G123	el tumor invade la serosa o anexos o citología peritoneal positiva
IIIB G123	metástasis vaginales
IIIC G123	metástasis a ganglios linfáticos pélvicos o paraaórticos
IVA G123	invasión tumoral de la mucosa vesical o intestinal o de ambas
IVB G123	metástasis a distancia incluso a ganglios linfáticos intraabdominales o inguinales o a ambos

Conjuntamente con el estadio, uno de los indicadores más sensibles de la diseminación tumoral es el grado de diferenciación histológico. La FIGO establece tres grados (G1: diferenciados, G2: moderadamente diferenciados, G3: Indiferenciados), basándose en la extensión del tumor y las características nucleares, como el tamaño y forma del núcleo, distribución de la cromatina, el tamaño de los nucléolos y el nivel mitótico (18, 19).

A medida que el tumor pierde su diferenciación y aumenta el grado, hay una tendencia mayor a una invasión miometrial profunda, riesgo de diseminación abdominal y afectación de los ganglios pélvicos-paraaórticos, reduciéndose considerablemente las probabilidades de supervivencia. A los 5 años, las pacientes con tumores G1 muestran un 94% de supervivencia libre de enfermedad, 84% para el G2 y un 72% para el G3. La mitad de las lesiones con G3 muestran una invasión miometrial mayor del 50%, y el 20-30% metastatizan los nódulos linfáticos. La mayoría de los carcinomas endometrioides son bien o moderadamente diferenciados, mientras los no endometrioides son indiferenciados (21-25).

En función del tipo celular presente en el área tumoral se define el tipo histológico. Los tipos histológicos de alto riesgo, son los no endometrioides, principalmente los tumores serosos, de células claras y escamosas, los indiferenciados y algunas variedades mixtas. La supervivencia global de este grupo de tumores, poco frecuentes, es menor del 35% independientemente del estadio (26).

Otros factores pronóstico son la profundidad de infiltración del miometrio y la invasión vascular, capaces de predecir una mayor probabilidad de metástasis ganglionar, fracaso en el tratamiento, recidiva y menor supervivencia. Los CE se dividen, en función de la profundidad de infiltración, en menor o mayor al 50% de infiltración miometrial. La afectación de los ganglios pélvicos-paraaórticos constituye también, un factor pronóstico importante, relacionado con el estadio, grado e infiltración miometrial de los tumores (20, 27-32).

Diversos trabajos publicados han descrito la importancia de la determinación de los niveles de receptores de estrógenos y progesterona como marcador pronóstico significativo. La disminución en la expresión de estos receptores se asocia con una peor evolución clínica de las pacientes con CE (33, 34).

El tratamiento de las pacientes con CE es inicialmente con cirugía (histerectomía total y salpingo-ooforectomía bilateral), mientras que el post-operatorio toma en cuenta el estadiaje quirúrgico. Las pacientes son clasificadas en tres categorías: aquellas con alta probabilidad de cura sin terapia post-operatoria (riesgo bajo), las que tienen una reducida tasa de cura quirúrgica pero que pueden, o no, beneficiarse de una terapia adicional (riesgo intermedio) y las de alto riesgo, con

muy pocas probabilidades de cura sin terapia post-operatoria (Tabla 3) (35). Ensayos clínicos en curso estudian la respuesta a tratamientos de radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia en pacientes con diferentes estadios de CE (36, 37).

Tabla 3. Tratamiento post-operatorio de las pacientes según los grupos de riesgo de recidiva

Riesgo	Estadio	Tratamiento post-operatorio
Bajo	IA G1 2 IA G3	Ninguno
Intermedio	IB G1 2 3	Radiación vaginal
	IC G1 2 3	(posible radiación pélvica y abdominal vs. Quimioterapia)
	IIA G1 2 3 IIB G1 2 3	
Alto	IIIA G1 2 3 IIIB G1 2 3	Radiación vaginal, pélvica, para-aórtica y abdominal
	IIIC G1 2 3	
	IVA G1 2 3	
	IVB G1 2 3	

3. Bases moleculares del carcinoma endometrial

El desarrollo y progresión tumoral es consecuencia de la adquisición de diversas alteraciones que incluyen activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores y un incremento de la inestabilidad genética. El estudio de estas alteraciones moleculares ha permitido ampliar los conocimientos acerca de la tumorigénesis y reforzar los subgrupos clínico-patológicos, originalmente definidos por rasgos morfológicos y clínicos.

3.1 Principales alteraciones moleculares

Diversos estudios moleculares apoyan el modelo dual, propuesto por J. Brokhman, para la carcinogénesis endometrial (38-42).

En los tumores endometrioides es frecuente observar inestabilidad de microsatélites (MSI), abundancia de receptores de estrógenos y progesterona, mutaciones activantes en los oncogenes KRAS y β -Catenina y mutaciones inactivantes en el gen supresor PTEN.

En cambio, los no endometrioides son, en su mayor parte, aneuploides lo que indica la presencia de inestabilidad cromosómica (CIN), que va acompañada de altos niveles del receptor Her2/neu, mutaciones inactivantes del gen supresor de tumores P53, reducción de la expresión del gen E-Cadherina y, con frecuencia, bajo contenido de receptores de estrógenos y/o progesterona (43-45) (Tabla 4).

Así pues, las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de ambos tipos tumorales difieren significativamente. Sin embargo, la existencia de tumores que muestran características morfológicas, inmunológicas y moleculares solapadas, junto con la detección de MSI en tumores no endometrioides y la falta de correlación inversa entre P53 y MSI, descritas en la literatura, contradicen este modelo (39, 40, 42, 46). Matias-Guiu y col. sugieren que los tumores de tipo no endometrioides pueden desarrollarse a partir de dos vías: 1) *de novo* a partir de un estado CIN, con pérdidas de heterocigocidad en numerosos loci, mutaciones inactivantes en el gen P53 y otras alteraciones aún por determinar; 2) a partir de la dediferenciación de un CE endometrioides preexistente. Esto explicaría la existencia

de CE con características mixtas y la presencia de alteraciones típicas de tumores de tipo endometriode en los CE no endometrioides (40).

Tabla 4. Principales alteraciones moleculares de los CE

Características	Tipo I	Tipo II
Niveles de RE y RP	Altos	Bajos
Sobre-expresión de HER2/neu	<2%	18-80%
Instabilidad microsatélite (MSI)	20-40%	<5%
Ploidía	≥75% Diploides	≥50% Aneuploides
Pérdida de Heterocigocidad (LOH)	Baja	Alta
Mutaciones inactivantes del PTEN	35-50%	10%
Mutaciones inactivantes del P53	<20%	90%
Mutaciones activantes del KRAS	10-30%	<5%
Mutaciones activantes de β-Catenina	25-40%	<5%
Reducida expresión de E-Cadherina	22-43%	>75%

3.2 Inestabilidad microsatélite (MSI)

Las secuencias microsatélites son repeticiones cortas, de no más de 150 bases, dispersas a lo largo de todo el genoma. Contienen unidades mínimas repetidas de una, dos, tres, y hasta seis bases. Durante la replicación del ADN, debido al apareamiento erróneo de las hebras (fenómeno conocido como *slippage*) se generan inserciones y/o deleciones en estas regiones. Sin embargo, la actividad correctora de la ADN polimerasa junto con el sistema MMR (reparador de apareamientos incorrectos o *mismatch repair*) permiten a la célula mantener estable su material genético.

Los genes del sistema MMR, hasta ahora identificados en mamíferos, son: MLH1/3, PMS1/2, MSH2/3/4/5 y 6. Éstos interactúan formando complejos y heterodímeros que median en las distintas funciones de reparación. Defectos en el sistema MMR generan en la célula el fenotipo mutador de microsatélites o MSI, caracterizado por la progresiva acumulación de miles de mutaciones en las secuencias repetidas (47-49).

Aunque el MSI fue inicialmente descubierto en pacientes con HNPCC o síndrome de Lynch, está presente en un porcentaje de tumores esporádicos (47, 50, 51). Las pacientes con HNPCC tienen mutaciones germinales en los genes del sistema MMR, frecuentemente MLH1 y MSH2. En estas pacientes, con un alelo defectuoso, la mutación del alelo sano inactivaría definitivamente el gen reparador. Lo que originaría un defecto en el sistema de reparación del ADN que aceleraría la adquisición de MSI. De esta manera el genoma se inundaría de mutaciones en los trectos repetidos, incluidos aquellos localizados en las secuencias codificantes de genes del cáncer (oncogenes y genes supresores). En estos casos, la alteración provoca un cambio en la pauta de lectura de la proteína (mutaciones *frameshift*) que da como resultado una proteína truncada o defectuosa. Debido a estas alteraciones, la célula se transformaría en neoplásica, siendo inevitable, a partir de este momento, su multiplicación clonal para dar lugar al tumor (52).

El CE es la enfermedad extracolónica más comúnmente observada en las familias con HNPCC. Entre un 30-60% de las pacientes con esta patología hereditaria desarrollan un CE (53, 54). La gran mayoría de estos tumores (75%), así como un cierto porcentaje de los CE esporádicos (17-20%), muestran MSI (55, 56). Esta alteración genética aparece también en lesiones precancerosas, como las hiperplasias, lo que indica que es un fenómeno temprano en la carcinogénesis (57, 58).

Sin embargo, en los tumores de endometrio esporádicos con MSI, la frecuencia de mutaciones en los genes del sistema MMR es muy baja (59-61). En estos casos, la hipermetilación de la región promotora del gen MLH1, que hace que se inhiba su expresión, es la responsable del MSI. Esta alteración epigenética está presente en la mayoría de ellos (70-95%) y en un grupo reducido de tumores con microsatélites estables (MSS) (6-10%) (62-64). Además, se ha observado en hiperplasias y en tejido normal adyacente al tumor, pero no en tejido endometrial sano (65-67).

Como se ha mencionado ya, el MSI es una característica propia de los CE endometrioides o de Tipo I (20-40%), mientras que en los tumores no endometrioides o de Tipo II es poco frecuente (<5%) (55, 56). Algunos de los genes

con trectos repetidos, dianas de MSI, que presentan altas frecuencias de mutación en los CE endometrioides son: BAX, TGFβRII, IGF1IR, MSH3, MSH6, Axina-2, Caspase-5 y PTEN. En general en los CE, la incidencia de MSI y de mutaciones de los genes diana es menor que en los tumores gastrointestinales (44, 68).

Nuestro grupo ha determinado el estado MSI en una serie de más de 200 muestras de CE, usando cinco marcadores quasimonomórficos (BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27), de acuerdo con las condiciones y el criterio publicado en la literatura (ver sección material y métodos en el capítulo 4) (69, 70). La incidencia de MSI en esta serie es de un 20% y está dentro del rango descrito por otros autores. El 95% de los tumores MSI muestran metilación del promotor del gen MLH1 y además, una batería de genes, dianas de MSI, también presentan mutaciones en sus trectos repetidos (Fig. 3) (68, 71).

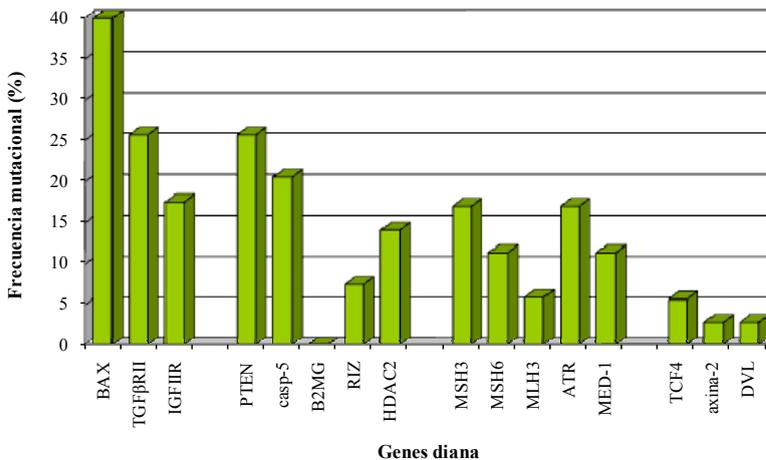


Figura 3. Frecuencia mutacional de algunos genes diana de MSI estudiados en nuestra serie.

No obstante, las frecuencias mutacionales obtenidas para estos genes dianas, en los diversos estudios publicados, muestran una gran variabilidad. Si bien, el fenotipo mutador es un proceso que parece extenderse de manera indiscriminada por todo el genoma, también hay evidencias que indican la existencia de una presión selectiva sobre determinados genes diana que participan en la tumorigenesis. Así, actualmente, existe un amplio debate para establecer los criterios más adecuados que

permitan discernir entre genes diana relevantes o irrelevantes en la carcinogénesis de un determinado tumor (70, 72, 73).

La presencia de MSI en tumores colorrectales predice un pronóstico favorable independientemente del estadio (74). Pero esto no ocurre en CE, la asociación de MSI con parámetros clínico-patológicos y la evolución clínica de las pacientes es controvertida (75-80), exceptuando su relación con los tumores endometrioides y diploides (40).

El estado MSI en nuestra serie, también se asocia con tumores endometrioides y diploides, y además, con estadios avanzados, invasión vascular y un peor pronóstico. Resultados preliminares muestran que esta inestabilidad se comporta como un marcador predictivo independiente, que indica una peor evolución de los CE endometrioides con estadios iniciales tratados con radioterapia (81).

Estas y otras evidencias, ponen de manifiesto la implicación de diferentes dianas de MSI en la carcinogénesis y en la progresión tumoral, además de su posible valor pronóstico y/o predictivo en el CE que sería interesante estudiar en profundidad (73).

3.3 Inestabilidad cromosómica (CIN)

La inestabilidad genómica tiene un importante papel en el desarrollo del cáncer, no solo a nivel del ADN (mutaciones puntuales o MSI), sino también a nivel cromosómico. La anomalía en el número y/o estructura (traslocaciones, deleciones y amplificaciones) de los cromosomas se conoce como inestabilidad cromosómica (CIN).

La determinación de la ploidía permite estimar los cambios cuantitativos en el contenido de ADN de las células tumorales frente a una población celular control. Aunque no sea posible obtener información específica del tipo de alteración cromosómica (numérica y/o estructural), el cambio en el contenido de ADN es un indicador de la existencia de la CIN. Los tumores diploides son aquellos con un contenido normal de ADN y los aneuploides por el contrario, muestran alteraciones en la ploidía.

La alteración de los genes implicados en la regulación de los puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*), que aseguran el orden de los procesos dentro del ciclo e integran la reparación del ADN con la progresión de las diferentes etapas, podrían ser responsables de la CIN (82).

La aneuploidía se observa en un 20-35% de los CE, la mayoría de ellos con una histología no endometriode (83). Parece que los genes BUB1, CCNB2 y STK-15 implicados en el *checkpoint* del huso mitótico están sobre-expresados en este tipo tumoral, especialmente el gen STK-15, esencial en la segregación de los cromosomas y en la función de los centrosomas (43). La alteración de este gen está presente en el 60% de los CE no endometriodes (84). La aneuploidía es considerada por varios autores como un marcador de peor pronóstico en CE (85, 86).

En nuestra serie de CE hemos determinado la ploidía mediante citometría de flujo. Los tumores con un índice de ADN $<0,85$ ó $>1,25$ se han considerado aneuploides (68, 87). La aneuploidía está presente en el 20% de los casos y se asocia con estadios avanzados, grado más indiferenciado, invasión vascular, tipo histológico no endometriode y una peor evolución clínica de la enfermedad (68).

La CIN se ve reflejada también por pérdidas/ganancias alélicas en numerosos loci (LOH o pérdida de heterocigocidad). Se ha comparado el perfil de LOH en los diferentes tipos de tumores de endometrio, mostrando que este fenómeno es más frecuente en los CE no endometrioides (45).

3.4 Alteraciones en los genes PTEN, PI3K, KRAS y P53

El gen supresor de tumores **PTEN** (*Phosphatase and tensin homolog*) está localizado en el cromosoma 10q23-24. Codifica una proteína *pten*, con 9 exones y 403 aminoácidos, con actividad fosfatidilinositol, tirosina, serina/treonina y fosfatasa. Está implicado en varios procesos celulares, principalmente bloquea el ciclo celular e induce apoptosis. Interviene también, en la migración celular, en la adhesión entre células y con la matrix extracelular, y en la angiogénesis (88).

Su relación con el cáncer parece estar centrada principalmente en su capacidad de modular negativamente la ruta PI3K/AKT (*Phosphatidylinocitol 3,4,5-*

triphosphate kinase/protein Kinase B) por desfosforilación del producto PIP₃ (*Phosphatidylinocitol 3,4,5-triphosphate*) (89).

Las mutaciones en línea germinal de este gen son las responsables del síndrome de Cowden, una enfermedad considerada rara, caracterizada por lesiones cutáneas, pólipos intestinales (hamartomas) y la tendencia a desarrollar neoplasias malignas, entre ellas cáncer de mama, tiroides y endometrio (90).

La alteración del PTEN juega un importante papel en la progresión de diferentes tipos tumorales, entre ellos el CE. Los principales mecanismos de inactivación del PTEN son las mutaciones y LOH (91). Es necesaria la pérdida de función de los dos alelos para inactivar el gen (Teoría de Knudson), por eso a menudo, en los tumores de endometrio las mutaciones y LOH coexisten (92). Sin embargo, en un cierto porcentaje de casos no se observa este doble impacto, la teoría de la haploinsuficiencia propone que la alteración de un alelo es suficiente para inactivar parcialmente el gen, siendo esta una posible explicación para aquellos tumores con esta característica (93, 94).

El 40% de los CE muestran LOH en torno a 10q23 (95, 96) y el PTEN mutado en el 25-83% (97-102), mayoritariamente en los tumores con histología endometriode y un contenido diploide de ADN (40). También aparece alterado en las hiperplasias endometriales, con y sin atipia (19% y 21% respectivamente), lo que indica que está implicado en la tumorigenesis, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos tumorales, donde aparece alterado frecuentemente en estadios avanzados (57, 98, 101, 103, 104).

No se ha podido justificar la ausencia de expresión de este gen basándose exclusivamente en estos dos mecanismos de inactivación, así que otros procesos deben estar implicados en su regulación (98). En principio no hay evidencias de silenciamiento epigenético. La presencia de un pseudogen del PTEN en el cromosoma 9p21, cuya homología se extiende -841 nucleótidos sobre el codón iniciador, dificulta el análisis para determinar el estado de metilación de su promotor (105). Parece que en los CE, es el pseudogen y no el gen PTEN el que se encuentra alterado epigenéticamente (106).

La frecuencia de mutaciones del PTEN observadas en nuestra serie (36%) está dentro del rango descrito en la literatura (33-55%). Estas mutaciones resultan en una pérdida total o parcial de la funcionalidad de la proteína. Prevalen las inserciones/delecciones que afectan a la pauta de lectura (*frameshift*) frente a las sustituciones de una base (68, 71). En los trabajos publicados no existe un acuerdo respecto a la relación entre el estado MSI y las mutaciones del PTEN. Nuestros resultados apoyan la existencia de una mayor frecuencia de mutaciones del PTEN en los tumores MSI. Las alteraciones *frameshift* en los trectos repetidos predominan en los CE con MSI, debido probablemente al propio estado de inestabilidad. En cambio, en los tumores estables (MSS) son más frecuentes las sustituciones de una base (C→T/G→A) en los dinucleótidos CpG (68, 71).

Aproximadamente dos tercios de los tumores con mutación del PTEN presentan inactivación completa del gen a causa de un segundo impacto, la inactivación del otro alelo, que en los tumores MSI es debido frecuentemente a una mutación y en los MSS a LOH. Este hallazgo sugiere que el mecanismo molecular responsable de la inactivación del PTEN está condicionado por el estado de inestabilidad en los CE. Queda por determinar el papel del PTEN en aquellos tumores con un solo alelo mutado (68, 71).

Varios estudios consideran al PTEN como un marcador pronóstico para el CE. Las mutaciones del PTEN en los tumores endometrioides se asocian con estadios iniciales y tumores de mejor pronóstico, independientemente de las características clínicas y patológicas del tumor (101, 107, 108). Los resultados obtenidos por nuestro grupo asocian las mutaciones del PTEN con tumores diploides, una característica de buen pronóstico en CE (68).

La enzima **PI3K** es un heterodímero formado por una unidad reguladora (p85) y otra catalítica (p110 α). La subunidad catalítica es codificada por el gen PIK3CA localizado en el cromosoma 3q26.32. PIK3CA está mutada en el 15% de los tumores humanos, principalmente en los exones 6, 7, 9 y 20, con importantes implicaciones clínicas en el diagnóstico, pronosis y respuesta al tratamiento (44).

El 26-36% de los CE presentan mutaciones de PIK3CA, la mayoría de ellas en el exón 20. El resultado final de estas alteraciones es una enzima PI3K con mayor

actividad. Esto no está asociado con variables clínico-patológicas, así que no parece ser un factor pronóstico en el CE (109, 110).

En el 14-26% de los tumores de endometrio coexisten las mutaciones del PIK3CA con las del PTEN. Algunos autores sugieren que en los casos con haploinsuficiencia del PTEN, mutaciones en otros genes como PIK3CA podrían tener un efecto cooperativo, promoviendo la tumorigenesis endometrial (109, 110).

La ruta MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) regula la proliferación, diferenciación y migración celular. Está anormalmente activa en el 30% de los tumores humanos, jugando un importante papel en la carcinogénesis. En el 15-30% de estos tumores, la causa es la alteración de uno de sus principales miembros, **KRAS** (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Este gen, localizado en el cromosoma 12p12.1, está mutado principalmente en el exón 1 lo que provoca un cambio de aminoácido en el codón 12 y/o 13 que hace a la proteína más activa (111).

El 19-46% de los CE presentan KRAS mutado, siendo más frecuente en los tumores endometrioides (10-30%) y prácticamente ausente en los no endometrioides (<5%) (112-116). Las hiperplasias endometriales muestran también esta alteración, principalmente aquellas con atipia (55, 112, 117-119). Los tumores con mutaciones en KRAS son mayoritariamente MSI (116, 120). En el 50% de los CE endometrioides coexisten las alteraciones en KRAS y PTEN junto con el estado MSI (44). No parece existir asociación entre la presencia de mutaciones de KRAS y otras variables clínico-patológicas o pronóstico de los tumores. Sin embargo, algunos autores han relacionado la presencia de esta alteración con un peor comportamiento clínico en CE endometrioides originados a partir de hiperplasia endometrial en pacientes postmenopáusicas (121-123). En nuestra serie el 14% de los CE presentan mutaciones en KRAS, y un 59% de ellas son transiciones G→A (124).

En cáncer de colon las transiciones G→A en KRAS y p53 se han asociado con el silenciamiento epigenético del gen MGMT, que codifica para una enzima reparadora, O⁶-MGMT, encargada de corregir la O⁶-alquil-Guanina (125, 126). Sin embargo, nosotros no hemos encontrado evidencias de metilación del promotor de este gen en nuestra serie de CE, coincidiendo con lo descrito en un estudio

publicado recientemente (ver anexo I) (124, 127). Alternativamente, es posible que en los tumores de endometrio con estas sustituciones, tanto del PTEN como del KRAS, sean debidas a la alteración de la enzima reparadora MED1, que corrige desaminaciones espontáneas en la 5' metil-Citosina de los dinucleótidos CpG (128).

El gen supresor de tumores **P53** está localizado en el cromosoma 17p13.1. Codifica para una proteína nuclear, con el mismo nombre, encargada de evitar la proliferación de la célula cuando ésta tiene daños en su ADN. La proteína p53 alterada no es funcional, pero resiste su degradación, se acumula en el núcleo e inhibe a la proteína p53 normal. Así, la célula es capaz de continuar dividiéndose a pesar de su inestabilidad genética (129).

La mitad de los tumores humanos tienen el gen P53 alterado (44). En los CE de tipo no endometriode es la principal alteración genética (90%), aparece en etapas iniciales de la carcinogénesis. En un 10-20% de los tumores de tipo endometriode, también está presente, frecuentemente en aquellos con alto grado. En este grupo, la alteración de P53 parece ser un evento molecular tardío en el proceso tumoral y podría influir en la progresión de los CE endometrioides a no endometrioides (120, 130-132). La sobreexpresión de P53 está asociada a tumores de alto grado, estadio avanzado, así como con una prognosis desfavorable. Según algunos autores, puede ser considerado un marcador predictivo de supervivencia y podría ser usado para detectar CE de alto riesgo (133-136).

4. La ruta de señalización celular Wnt

La compleja ruta de señalización celular Wnt (*Wingless/Int1*), altamente conservada en la evolución, juega un importante papel en el control de la expresión génica diferencial, durante la embriogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos adultos. Regula procesos importantes como la proliferación, apoptosis, diferenciación, polaridad y migración celular. Y su alteración se asocia en humanos, con el desarrollo de enfermedades degenerativas y cáncer (137).

4.1 Generalidades

Los ligandos Wnt forman una familia de moléculas de señalización, que después de una compleja modificación post-traducciona, son secretadas a la matrix extracelular. En humanos, se han descrito 19 genes que codifican diferentes isoformas de estas glicoproteínas hidrofóbicas (138, 139).

La cascada de señalización se inicia por la unión de los ligandos Wnt al complejo de membrana compuesto por los receptores Frizzled (Fz) y LPR5-6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 5-6*). Pudiendo activarse, al menos, tres vías diferentes de señalización: La vía canónica o dependiente de β -Catenina (*Wnt/\beta-Catenina*) y las no canónicas, independientes de β -Catenina, como la vía de polaridad celular planar (*Wnt/PCP*) o la dependiente de calcio (*Wnt/Ca⁺²*) (Fig. 4) (137).

La ruta canónica o *Wnt/\beta-Catenina* es la más conocida. Como resultado de la formación del complejo Wnt/Fz/LPR5-6 en la superficie celular, la proteína citoplasmática dishevelled (Dvl) se activa por fosforilación y desestabiliza el complejo constituido por APC (*adenomatous polyposis coli*), Axina y GSK3 β (*glycogen syntase kinase 3 β*) evitando la degradación de la β -Catenina. El aumento de la concentración citosólica de β -catenina facilita que ésta sea translocada al núcleo, donde actúa como un co-activador, uniéndose a los factores de transcripción LEF/TCF (*lymphoid enhancer-binding factor/ T-cell factor*) que activan la expresión de genes dependientes de Wnt.

La β -Catenina posee una función doble en la célula. Por un lado, participa en el complejo de adhesión célula-célula y mantiene la polaridad celular por su unión a la E-Caderina, y por otro, actúa como un factor de transcripción, regulado por la señalización Wnt. En ausencia de ligandos Wnt, los niveles citosólicos de β -Catenina son mínimos. Existe un equilibrio entre su unión con los complejos de adhesión celular y con el complejo de destrucción, APC/axina/GSK β 3. La β -Catenina tras ser fosforilada por GSK3 β es reconocida y degradada por la vía del proteosoma (137).

Las rutas no canónicas *Wnt/PCP* y *Wnt/Ca²⁺* son menos conocidas. La vía de polaridad celular planar reorganiza del citoesqueleto y regula la movilidad y adhesión celular, a través de la proteína Dvl que es capaz de activar las GTPasas Rho (*Ras homologue*), Rac (*Ras-related C*) y Cdc42 (*Cell division control protein 42*), y otras rutas de señalización como JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*)(140-142).

Algunos ligandos Wnt son capaces de unirse solo a los receptores Fz e incrementar los niveles de calcio intracelular, activando a su vez, diferentes proteínas como PKC (*protein kinase C*), CamKII (*Calcium/calmoduli-regulated kinase II*) y NFAT (*nuclear factor associated with T cells*). No se conoce el resto de la cascada de señalización dependiente de calcio, ni su función biológica en la célula (142-144). Se ha demostrado que algunos ligandos Wnt son capaces también de unirse directamente a receptores Ror2 (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2*) (145, 146). Parece que ambas cascadas, la dependiente de calcio y la dependiente de receptores Ror2, son capaces de antagonizar la señalización Wnt/ β -Catenina, pero no se sabe a qué nivel ocurre esta interacción (142-145).

La ruta Wnt está regulada negativamente por distintas proteínas solubles que actúan como antagonistas de la cascada de señalización. Estos inhibidores pueden ser divididos en dos grupos dependiendo de su función. Un primer grupo lo constituyen la familia SFRP (*Secreted Frizzled related protein*), WIF1 (*Wnt inhibitory factor-1*) y Cerberus que se unen a las moléculas Wnt o bien a los receptores Fz e impiden la formación de un complejo ligando-receptor funcional. De esta manera son capaces de bloquear la vía Wnt tanto en su forma canónica como no canónica. El segundo grupo, de inhibidores Wnt, está compuesto por miembros de la

familia DKK (*Dickkopf*). Estos se unen a los receptores LRP5/6, favorecen su endocitosis, alteran su capacidad de formar dímeros con los Fz y así, la ruta canónica se ve específicamente alterada (147).

Se han identificado numerosos genes diana de la ruta Wnt, algunos específicos del tipo celular y otros, miembros de la propia vía de señalización (ver *Wnt homepage*: www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html) (148).

4.2 Alteración de los miembros Wnt: β -Catenina, APC y E-Cadherina

La proteína β -Catenina es uno de los miembros principales de la ruta Wnt. Está codificada por el gen CTNNB1, localizado en el cromosoma 3p21. Las mutaciones de este gen evitan que la proteína pueda ser fosforilada por GSK3 β . Así se desestabiliza el equilibrio que existe entre su degradación, su unión a los complejos de adhesión celular y su papel como co-activador de la transcripción. Como resultado, aumenta su nivel en el citoplasma y pasa al núcleo donde mantiene constitutivamente activa la transcripción de los genes diana Wnt (149). Algunos de los genes que se ven sobre-expresados por esta anormal activación son CD1 (*cyclin D1*), *c-myc* y MMP7 (*matrix metalloproteinase-7*)(150-153).

Entre un 14-44% de los CE endometrioides tienen una β -Catenina alterada debido a mutaciones en el exón 3 del gen, las mutaciones fuera de este exón son infrecuentes (151, 154-157). Suelen ser tumores con estadio inicial y buen pronóstico. A menudo, en los tumores colorectales, esta alteración está asociada con el estado MSI, sin embargo en los CE endometrioides no existe esta relación (158). En este caso, las alteraciones en la β -Catenina, el MSI y el estado mutacional de PTEN y KRAS parecen formar parte de rutas independientes (151).

En nuestra serie de CE la frecuencia mutacional del exón 3 de la β -Catenina (17%) está dentro del rango descrito en la literatura (15-20%)(151, 154, 158-160). Todas las mutaciones encontradas afectan a residuos diana de fosforilación, lo que indica que la proteína alterada es resistente a la degradación. Además, no se observa asociación entre la alteración genética de la β -Catenina y el estado MSI o las mutaciones del gen PTEN. Esto sugiere que estas alteraciones pueden ser conjuntamente seleccionadas y contribuir en la carcinogénesis endometrial. Los

tumores con mutaciones en β -Catenina en general, son de buen pronóstico, con histología endometriode y diferenciados (grado 1) (68). Aproximadamente el 25% de los CE tienen una alta actividad del complejo β -Catenina/TCF/LEF en ausencia de mutaciones en β -Catenina, lo que hace suponer que otros miembros de la ruta Wnt deben estar implicados en el proceso tumoral (154).

A diferencia de lo que ocurre en tumores de colon, las mutaciones en otros miembros de esta cascada de señalización, como **APC** son infrecuentes en CE. Pero sí se han encontrado otras alteraciones como, LOH (5q21) en aproximadamente el 25% o hipermetilación del promotor del gen APC en el 22-47% de los casos, aunque su asociación con una acumulación de la β -Catenina en el núcleo no ha podido ser demostrada (160-163). La alteración epigenética de APC ocurre temprano en el proceso carcinogénico pues se ha observado en hiperplasias endometriales (163). Además, es frecuente en tumores endometrioides y con MSI, fenómeno que se observa también en nuestra serie de CE, donde la frecuencia de metilación del APC es de un 35% (ver anexo I) (160, 163).

La molécula de adhesión **E-Cadherina** está codificada por el gen supresor de tumores CDH1, localizado en el cromosoma 16q22.1. En CE y otras neoplasias, la pérdida parcial o completa de esta proteína se asocia con una menor diferenciación tumoral y mayor capacidad de invasión y metástasis (162, 164-166). La disminución de la expresión es más frecuente en tumores con una histología no endometriode y en aquellos endometrioides de mayor grado y estadio (165-167).

Se han descrito mutaciones de este gen en un pequeño número de CE (168). Un porcentaje mayor de tumores presentan LOH de la región 16q (34-40%), que se asocia con una diferenciación menor, un tipo histológico no endometriode y con un peor pronóstico. Esta alteración genética no se ha observado en hiperplasias endometriales lo que supone que podría no estar implicada en la tumorigenesis pero sí en la progresión de los CE (165, 169). Entre un 14-44% de los tumores de endometrio muestran hipermetilación del promotor de CDH1. Su aparición está relacionada con la adquisición de la capacidad invasiva del tumor. Aunque existen datos contradictorios, este mecanismo parece estar relacionado también, con la disminución de los niveles de E-Cadherina en los CE más agresivos (161, 162, 165,

166, 170). De acuerdo con lo descrito por otros autores, en nuestra serie de CE el 14% de los casos muestran esta alteración epigenética (Ver anexo I).

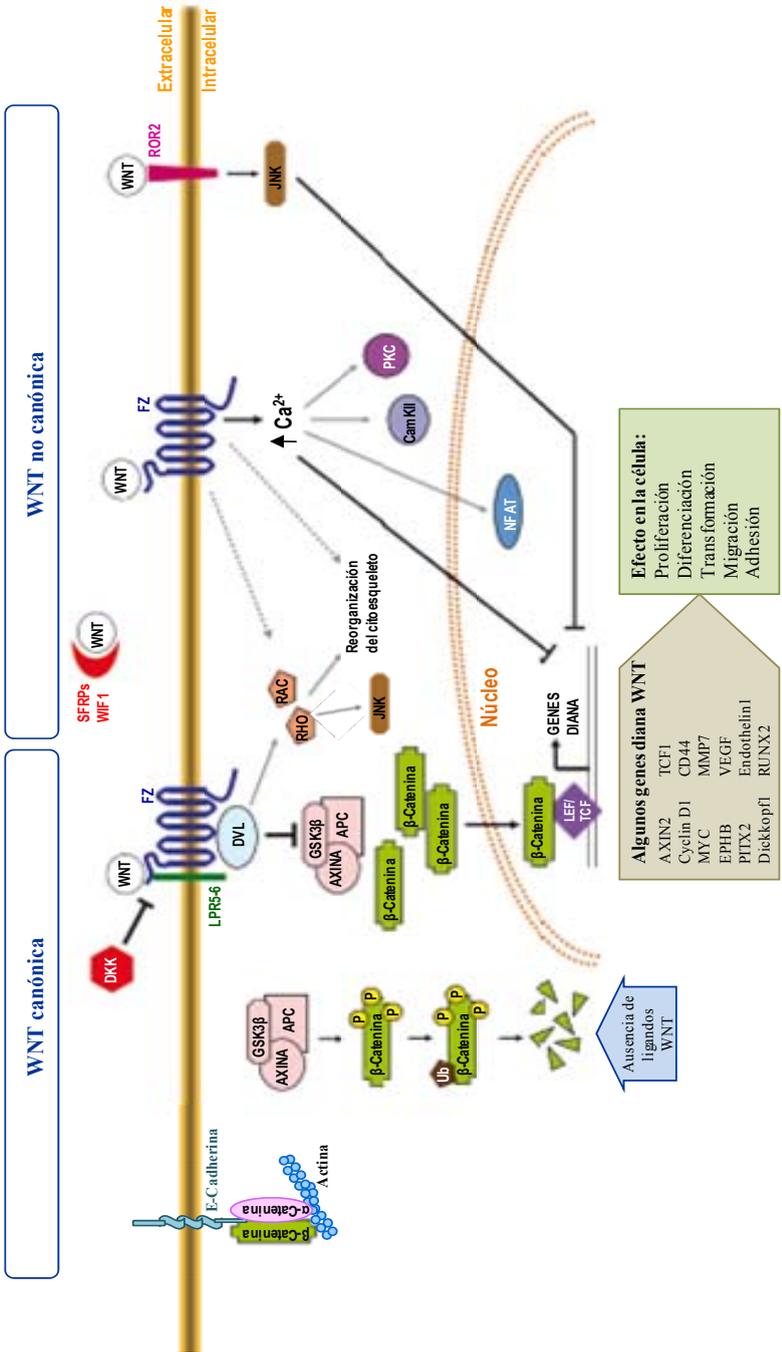


Figura 4. Esquema simplificado de la ruta de señalización WNT (canónica y no canónica)

5. Referencias

1. Kronenberg M.D. HM, Melmed S., Polonsky M.D., Larsen P.R. ed. 2009 Williams tratado de endocrinología. 11ª ed: Elsevier/Saunders.
2. Moore KL PT ed. 2008 Embriología Clínica. 8ª ed: Elsevier/Saunders.
3. Simón C. HJ, García-Velasco J., Pellicer A. ed. 2009 El Endometrio Humano: desde la investigación a la clínica. Madrid: Panamericana.
4. salud Snd 2003 Información terapéutica. In; 105-114.
5. Parazzini F, La Vecchia C, Bocciolone L, Franceschi S 1991 The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 41:1-16.
6. Antunes CM, Strolley PD, Rosenshein NB, Davies JL, Tonascia JA, Brown C, Burnett L, Rutledge A, Pokempner M, Garcia R 1979 Endometrial cancer and estrogen use. Report of a large case-control study. *N Engl J Med* 300:9-13.
7. Jelovsek FR, Hammond CB, Woodard BH, Draffin R, Lee KL, Creasman WT, Parker RT 1980 Risk of exogenous estrogen therapy and endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 137:85-91.
8. Gallup DG, Stock RJ 1984 Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger. *Obstet Gynecol* 64:417-420.
9. Engelsens IB, Akslen LA, Salvesen HB 2009 Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS* 117:693-707.
10. Bokhman JV 1983 Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10-17.
11. Deligdisch L, Cohen CJ 1985 Histologic correlates and virulence implications of endometrial carcinoma associated with adenomatous hyperplasia. *Cancer* 56:1452-1455.
12. Jasonni VM, Lodi S, Preti S, Bonavia M, Bulletti C, Bolelli G, Franceschetti F, Flamigni C 1981 Extraglandular estrogen production in postmenopausal women with and without endometrial cancer: comparison between "in vitro" and "in vivo" results. *Cancer Detect Prev* 4:469-473.
13. Brinton LA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Lannom L, Hoover RN 1992 Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 167:1317-1325.
14. MacMahon B 1974 Risk factors for endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2:122-129.
15. van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JW, Kiemeny LA, Gimbrete CH, Otter R, Schouten LJ, Damhuis RA, Bontenbal M, Diepenhorst FW, et al. 1994 Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet* 343:448-452.
16. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ 1985 The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 56:403-412.
17. Marra G, Boland CR 1995 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87:1114-1125.
18. F.I.G.O. 1989 International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO): Announcements. FIGO stages: 1988 revision. *Gynecol Oncol* 35:125-127.
19. Shepherd JH 1989 Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 96:889-892.
20. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, Graham JE 1991 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* 40:55-65.

21. Ayhan A, Taskiran C, Yuce K, Kucukali T 2003 The prognostic value of nuclear grading and the revised FIGO grading of endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 22:71-74.
22. Chambers SK, Kapp DS, Peschel RE, Lawrence R, Merino M, Kohorn EI, Schwartz PE 1987 Prognostic factors and sites of failure in FIGO Stage I, Grade 3 endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 27:180-188.
23. Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM 2000 A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advanced-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol* 24:1201-1208.
24. Nordstrom B, Strang P, Lindgren A, Bergstrom R, Tribukait B 1996 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* 15:191-201.
25. Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP 1995 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* 75:81-86.
26. Wilson TO, Podratz KC, Gaffey TA, Malkasian GD, Jr., O'Brien PC, Naessens JM 1990 Evaluation of unfavorable histologic subtypes in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 162:418-423; discussion 423-416.
27. Ambros RA, Kurman RJ 1992 Identification of patients with stage I uterine endometrioid adenocarcinoma at high risk of recurrence by DNA ploidy, myometrial invasion, and vascular invasion. *Gynecol Oncol* 45:235-239.
28. Carcangiu ML, Chambers JT 1992 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* 47:298-305.
29. Lee KR, Vacek PM, Belinson JL 1994 Traditional and nontraditional histopathologic predictors of recurrence in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 54:10-18.
30. Sivridis E, Buckley CH, Fox H 1987 The prognostic significance of lymphatic vascular space invasion in endometrial adenocarcinoma. *Br J Obstet Gynaecol* 94:991-994.
31. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, Advani H 1991 The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 68:2293-2302.
32. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Calori G, Podratz KC 2001 Hematogenous dissemination in corpus cancer. *Gynecol Oncol* 80:233-238.
33. Creasman WT 1993 Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer* 71:1467-1470.
34. Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD 1993 Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients. *Gynecol Oncol* 50:281-286.
35. Falcón O 1994 El cáncer de endometrio: factores pronósticos, quirúrgicopatológicos y caracterización biológica. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de GC.
36. Hoskins PJ, Swenerton KD, Pike JA, Wong F, Lim P, Acquino-Parsons C, Lee N 2001 Paclitaxel and carboplatin, alone or with irradiation, in advanced or recurrent endometrial cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 19:4048-4053.

37. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, Thigpen JT, Benda JA 2006 Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 24:36-44.
38. Lax SF 2002 [Dualistic model of molecular pathogenesis in endometrial carcinoma]. *Zentralbl Gynakol* 124:10-16.
39. Lax SF 2004 Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 444:213-223.
40. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Munoz J, Arguelles R, Machin P, Prat J 2001 Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 32:569-577.
41. Oehler MK, Brand A, Wain GV 2003 Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 9:27-31.
42. Salvesen HB, Akslen LA 2002 Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *APMIS* 110:673-689.
43. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Dolcet X, Matias-Guiu X 2009 Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol* 62:777-785.
44. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L 2007 Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology* 39:72-87.
45. Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, Sorolla A, Llecha N, Matias-Guiu X 2008 Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 27:305-317.
46. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J 1998 Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 29:1160-1164.
47. Chao EC, Lipkin SM 2006 Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res* 34:840-852.
48. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M 1993 Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
49. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M 1994 Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 6:273-281.
50. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. 1994 Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368:258-261.
51. Ichikawa Y, Lemon SJ, Wang S, Franklin B, Watson P, Knezetic JA, Bewtra C, Lynch HT 1999 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* 112:2-8.
52. Perucho M 1996 Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 377:675-684.
53. Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J 1991 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet Cytogenet* 53:143-160.
54. Watson P, Lynch HT 1993 Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 71:677-685.

55. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tourgeman D, Zheng J, Shibata D 1994 Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86:1216-1221.
56. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J 1993 Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 53:5100-5103.
57. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH 1998 PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 58:3254-3258.
58. Mutter GL, Boynton KA, Faquin WC, Ruiz RE, Jovanovic AS 1996 Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. *Cancer Res* 56:4483-4486.
59. Katabuchi H, van Rees B, Lambers AR, Ronnett BM, Blazes MS, Leach FS, Cho KR, Hedrick L 1995 Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas. *Cancer Res* 55:5556-5560.
60. Kobayashi K, Matsushima M, Koi S, Saito H, Sagae S, Kudo R, Nakamura Y 1996 Mutational analysis of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2, in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 87:141-145.
61. Lim PC, Tester D, Cliby W, Ziesmer SC, Roche PC, Hartmann L, Thibodeau SN, Podratz KC, Jenkins RB 1996 Absence of mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic endometrial tumors with microsatellite instability. *Clin Cancer Res* 2:1907-1911.
62. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG 1998 MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17:2413-2417.
63. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S 2000 Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 6:3607-3613.
64. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, Palazzo JP, Fishel R, Goodfellow PJ 1999 MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 8:661-666.
65. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG 1999 hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 155:1767-1772.
66. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J 1999 Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 59:462-466.
67. Kanaya T, Kyo S, Maida Y, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Inoue M 2003 Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene* 22:2352-2360.
68. Bilbao C 2003 Relación entre la inestabilidad de microsatélites, el PTEN y la β -Catenina en cáncer de endometrio. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de GC.
69. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R 2006 Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 24:241-251.
70. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Buhard O, Duval A, Chung TK, Hamelin R 2006 Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis* 27:951-955.

71. Bilbao C, Rodriguez G, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Rivero JF, Falcon O, Jr., Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC, Perucho M 2006 The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer* 119:563-570.
72. Duval A, Hamelin R 2002 Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62:2447-2454.
73. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz MK, Gebert JF 2003 Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* 22:2226-2235.
74. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S 2000 Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342:69-77.
75. Basil JB, Goodfellow PJ, Rader JS, Mutch DG, Herzog TJ 2000 Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer* 89:1758-1764.
76. Black D, Soslow RA, Levine DA, Tornos C, Chen SC, Hummer AJ, Bogomolny F, Olvera N, Barakat RR, Boyd J 2006 Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *J Clin Oncol* 24:1745-1753.
77. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS 1996 Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 148:1671-1678.
78. Hirasawa A, Aoki D, Inoue J, Imoto I, Susumu N, Sugano K, Nozawa S, Inazawa J 2003 Unfavorable prognostic factors associated with high frequency of microsatellite instability and comparative genomic hybridization analysis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 9:5675-5682.
79. MacDonald ND, Salvesen HB, Ryan A, Iversen OE, Akslen LA, Jacobs IJ 2000 Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res* 60:1750-1752.
80. Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC, Berchuck A 2001 Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol* 97:417-422.
81. Bilbao C, Lara PC, Ramirez R, Henriquez-Hernandez LA, Rodriguez G, Falcon O, Leon L, Perucho M, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation-treated endometrioid endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76:9-13.
82. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW 2003 Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34:369-376.
83. Jacobsen M, Jakobsen A, Nedergaard L, Andersen JE, Nielsen K 1997 Endometrial carcinomas--flow cytometric DNA content and S-phase values. *Pathol Res Pract* 193:283-290.
84. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, Rodriguez-Perales S, Diaz-Uriarte R, Dominguez O, Hardisson D, Andujar M, Prat J, Matias-Guiu X, Cigudosa JC, Palacios J 2003 Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 63:5697-5702.
85. Larson DM, Berg R, Shaw G, Krawisz BR 1999 Prognostic significance of DNA ploidy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 74:356-360.
86. Zaino RJ, Davis AT, Ohlsson-Wilhelm BM, Brunetto VL 1998 DNA content is an independent prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Int J Gynecol Pathol* 17:312-319.

87. Falcon O, Chirino R, Leon L, Lopez-Bonilla A, Torres S, Fernandez L, Garcia-Hernandez JA, Valeron PF, Diaz-Chico JC 1999 Low levels of cathepsin D are associated with a poor prognosis in endometrial cancer. *Br J Cancer* 79:570-576.
88. Di Cristofano A, Pandolfi PP 2000 The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100:387-390.
89. Vivanco I, Sawyers CL 2002 The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
90. Lloyd KM, 2nd, Dennis M 1963 Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. *Ann Intern Med* 58:136-142.
91. Eng C 2003 PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 22:183-198.
92. Knudson AG, Jr. 1971 Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823.
93. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podosyanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M 2001 Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11563-11568.
94. Santarosa M, Ashworth A 2004 Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654:105-122.
95. Nagase S, Sato S, Tezuka F, Wada Y, Yajima A, Horii A 1996 Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Br J Cancer* 74:1979-1983.
96. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ 1995 Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 55:1922-1926.
97. Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, Prat J 2000 PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum Pathol* 31:312-317.
98. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C 2000 Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 92:924-930.
99. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC 1997 PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57:4736-4738.
100. Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S 2004 Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol* 25:1615-1623.
101. Sun H, Enomoto T, Fujita M, Wada H, Yoshino K, Ozaki K, Nakamura T, Murata Y 2001 Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 115:32-38.
102. Wappenschmidt B, Wardelmann E, Gehrig A, Schondorf T, Maass N, Bonatz G, Gassel AM, Pietsch T, Mallmann P, Weber BH, Schmutzler RK 2004 PTEN mutations do not cause nuclear beta-catenin accumulation in endometrial carcinomas. *Hum Pathol* 35:1260-1265.
103. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal PA 1998 Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res* 58:2500-2503.
104. Yoshinaga K, Sasano H, Furukawa T, Yamakawa H, Yuki M, Sato S, Yajima A, Horii A 1998 The PTEN, BAX, and IGF1R genes are mutated in endometrial atypical hyperplasia. *Jpn J Cancer Res* 89:985-990.
105. Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, von Deimling A, Haluska FG, Haber DA, Eng C 1998 A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene* 16:2403-2406.

106. Zysman MA, Chapman WB, Bapat B 2002 Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 160:795-800.
107. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Matsumoto K, Kawana K, Taketani Y 2001 PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 7:2636-2642.
108. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A 1998 PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 4:3005-3010.
109. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F 2005 High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65:10669-10673.
110. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Llecha N, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X 2006 PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol* 37:1465-1472.
111. Bos JL 1989 ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-4689.
112. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, Rice JM 1991 K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 51:5308-5314.
113. Fujimoto I, Shimizu Y, Hirai Y, Chen JT, Teshima H, Hasumi K, Masubuchi K, Takahashi M 1993 Studies on ras oncogene activation in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 48:196-202.
114. Caduff RF, Johnston CM, Frank TS 1995 Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 146:182-188.
115. Semczuk A, Schneider-Stock R, Berbec H, Marzec B, Jakowicki JA, Roessner A 2001 K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett* 164:207-212.
116. Lagarda H, Catusas L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J 2001 K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 193:193-199.
117. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kohler MF, Berchuck A, et al. 1993 Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* 53:1906-1910.
118. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK 1994 Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 54:1604-1607.
119. Sun H, Enomoto T, Shroyer KR, Ozaki K, Fujita M, Ueda Y, Nakashima R, Kuragaki C, Ueda G, Murata Y 2002 Clonal analysis and mutations in the PTEN and the K-ras genes in endometrial hyperplasia. *Diagn Mol Pathol* 11:204-211.
120. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L 2000 The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 88:814-824.
121. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG, Garrett CT 1996 K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 63:238-246.
122. Tsuda H, Jiko K, Yajima M, Yamada T, Tanemura K, Tsunematsu R, Ohmi K, Sonoda T, Hirohashi S 1995 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* 14:255-259.

123. Mamas IN, Zafiroopoulos A, Spandidos DA 2005 Involvement of the ras genes in female genital tract cancer. *Int J Oncol* 26:1241-1255.
124. Ramírez R S-MRM, Bilbao C, Rodríguez G, Falcón O, León L, Díaz-Chico BN, Perucho M, Díaz-Chico JC 2006 Differences in the relationship between epigenetic silencing of MGMT and Kras mutation in colorectal and endometrial cancers. 3rd Meeting of The Young Cancer Research Investigators of the Canary Islands & 1st Meeting of the Young Biomedical Investigators of the Macaronesia La Laguna, Tenerife, Spain 2006.
125. Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG 2001 Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61:4689-4692.
126. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG 2000 Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2368-2371.
127. Rimel BJ, Huettner P, Powell MA, Mutch DG, Goodfellow PJ 2009 Absence of MGMT promoter methylation in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 112:224-228.
128. Bellacosa A 2001 Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* 187:137-144.
129. Yin XY, Grove L, Datta NS, Long MW, Prochownik EV 1999 C-myc overexpression and p53 loss cooperate to promote genomic instability. *Oncogene* 18:1177-1184.
130. Ambros RA, Sheehan CE, Kallakury BV, Ross JS, Malfetano J, Paunovich E, Figge J 1996 MDM2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 9:1165-1169.
131. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW 2000 Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 13:379-388.
132. Moll UM, Chalas E, Auguste M, Meaney D, Chumas J 1996 Uterine papillary serous carcinoma evolves via a p53-driven pathway. *Hum Pathol* 27:1295-1300.
133. Engelsen IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB 2006 Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 195:979-986.
134. Inaba F, Kawamata H, Teramoto T, Fukasawa I, Inaba N, Fujimori T 2005 PTEN and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma. *Oncol Rep* 13:17-24.
135. Ragni N, Ferrero S, Prefumo F, Muschiato B, Gorlero F, Gualco M, Fulcheri E 2005 The association between p53 expression, stage and histological features in endometrial cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123:111-116.
136. Saffari B, Bernstein L, Hong DC, Sullivan-Halley J, Runnebaum IB, Grill HJ, Jones LA, El-Naggar A, Press MF 2005 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* 15:952-963.
137. Klaus A, Birchmeier W 2008 Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8:387-398.
138. Logan CY, Nusse R 2004 The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.

139. Mikels AJ, Nusse R 2006 Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25:7461-7468.
140. Katoh M 2005 WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* 14:1583-1588.
141. Seifert JR, Mlodzik M 2007 Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8:126-138.
142. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT 2003 A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-377.
143. Kohn AD, Moon RT 2005 Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38:439-446.
144. Kuhl M 2004 The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9:967-974.
145. Mikels AJ, Nusse R 2006 Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4:e115.
146. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R 2008 Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 1:re9.
147. Kawano Y, Kypta R 2003 Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627-2634.
148. Clevers H 2006 Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.
149. Miller JR 2002 The Wnts. *Genome Biol* 3:Reviews 3001.
150. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T 1999 beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155:1033-1038.
151. Machin P, Catusus L, Pons C, Munoz J, Matias-Guiu X, Prat J 2002 CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum Pathol* 33:206-212.
152. Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez-Estevez C, Marcos R, Hardisson D, Cigudosa JC, Palacios J 2004 Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer. *Int J Cancer* 110:194-200.
153. Shih HC, Shiozawa T, Miyamoto T, Uchikawa J, Feng Y, Kashima H, Nikaido T, Konishi I 2003 Nuclear localization of beta-catenin is correlated with the expression of cyclin D1 in endometrial carcinomas. *Anticancer Res* 23:3749-3754.
154. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S 1998 Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 58:3526-3528.
155. Palacios J, Catusus L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Gamallo C 2001 Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch* 438:464-469.
156. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH 2000 Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 13:1066-1071.
157. Scholten AN, Creutzberg CL, van den Broek LJ, Noordijk EM, Smit VT 2003 Nuclear beta-catenin is a molecular feature of type I endometrial carcinoma. *J Pathol* 201:460-465.
158. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M 1999 Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 59:3346-3351.
159. Kobayashi K, Sagae S, Nishioka Y, Tokino T, Kudo R 1999 Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 90:55-59.

160. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matias-Guiu X, Esteller M, Palacios J 2002 Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21:7981-7990.
161. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D 2006 Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol Rep* 16:1189-1196.
162. Pijnenborg JM, Kisters N, van Engeland M, Dunselman GA, de Haan J, de Goeij AF, Groothuis PG 2004 APC, beta-catenin, and E-cadherin and the development of recurrent endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 14:947-956.
163. Zysman M, Saka A, Millar A, Knight J, Chapman W, Bapat B 2002 Methylation of adenomatous polyposis coli in endometrial cancer occurs more frequently in tumors with microsatellite instability phenotype. *Cancer Res* 62:3663-3666.
164. Mell LK, Meyer JJ, Tretiakova M, Khramtsov A, Gong C, Yamada SD, Montag AG, Mundt AJ 2004 Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 10:5546-5553.
165. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrio D, Sanchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matias-Guiu X, Palacios J 2003 Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 199:471-478.
166. Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R 2003 Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Cancer* 97:1002-1009.
167. Scholten AN, Aliredjo R, Creutzberg CL, Smit VT 2006 Combined E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin expression is a favorable prognostic factor in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 16:1379-1385.
168. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J 1994 Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 7:98-102.
169. Kihana T, Yano N, Murao S, Iketani H, Hamada K, Yano J, Matsuura S 1996 Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology. *Jpn J Cancer Res* 87:1184-1190.
170. Ignatov A, Bischoff J, Ignatov T, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R 2004 APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. *Cancer Sci* 101:321-327.

Capítulo 2

Planteamiento y objetivos

El cáncer de endometrio es el tumor ginecológico pélvico más frecuente en los países desarrollados. Generalmente se diagnostica en estadios iniciales, pero a pesar de su buen pronóstico, aproximadamente el 20% de las pacientes mueren a causa de la enfermedad.

El pronóstico y tratamiento actual del cáncer de endometrio se fundamenta en el uso de variables clínico-patológicas, tales como el grado histológico, infiltración miometrial, tipo histológico, etc. Junto a estas, se han descrito nuevas variables moleculares implicadas en la tumorigenesis y en la progresión de este tipo tumoral. Su uso en la práctica clínica podría ser de gran ayuda para mejorar la clasificación de los tumores, el pronóstico y el tratamiento de las pacientes.

Nuestro grupo, en colaboración con el Servicio de Patología y la Unidad de Ginecología Oncológica del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Complejo Hospitalario Universitario Materno-Insular, lleva veinte años desarrollando proyectos de investigación encaminados al conocimiento de las alteraciones moleculares que suceden en el desarrollo y evolución de esta enfermedad.

A esta iniciativa se unió en el año 2000 el Laboratorio de Genética y Epigenética del Cáncer, dirigido por el Dr. Manuel Perucho (*The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA*), descubridor de la inestabilidad microsatélite, de la ruta mutadora y de su implicación en diversas neoplasias. A partir de ese momento nuestras investigaciones se centraron en el estudio de esta anomalía genética, y de otras relacionadas con ella, en el cáncer de endometrio.

Esta Tesis Doctoral pretende dar continuidad a la línea de investigación desarrollada por nuestro grupo. Los objetivos planteados han sido estimar la incidencia, la relación con las características clínico-patológicas y moleculares, y con la supervivencia de las pacientes, de las siguientes alteraciones genéticas y epigenéticas:

- 1) mutaciones en los trectos repetidos del gen EPHB2 (Capítulo 3).
- 2) mutaciones en los trectos repetidos de los genes miembros del sistema de reparación de roturas de la doble cadena de ADN (Capítulo 4).
- 3) metilación del promotor de los genes EPHB2 y EPHB4 (Capítulo 5).
- 4) metilación del promotor de los genes SFRPs (Capítulo 6).
- 5) metilación del promotor del gen PITX2 (Capítulo 7).

De esta manera hemos querido profundizar en el conocimiento de algunas variables moleculares posiblemente asociadas al desarrollo y progresión del cáncer de endometrio.

**Alta incidencia de mutaciones del gen EPHB2 en tumores
gástricos pero no en los de endometrio
con inestabilidad de microsatélites**

Verónica Dávalos
Higinio Dopeso
Sérgia Velho
Ana Monteiro Ferreira
Luis Cirnes
Nicolás Díaz-Chico
Cristina Bilbao
Raquel Ramírez
Germán Rodríguez
Orlando Falcón
Laureano León
Renee Niessen
Gisela Keller
Gisela Dallenbach-Hellweg
Eloy Espín
Manel Armengol
Manuel Perucho
Kohzoh Imai
Hiroyuki Yamamoto
Johannes F. Gebert
Juan Carlos Díaz-Chico
Robert M. Hofstra
Stefan M. Woerner
Raquel Seruca
Simó Schwartz Jr
Diego Arango

Oncogen. 2007 Jan 11; 26 (2): 308-11

Resumen

En el epitelio intestinal, la familia de receptores EPH, con actividad tirosinquinasa, regula la adhesión y la migración celular. Recientemente se ha demostrado que la inactivación del gen EPHB2 acelera la formación de tumores colorrectales. Un 41% de ellos, con inestabilidad de microsatélites (MSI), presentan mutaciones en el tracto repetido A9 del exón 17, provocando un cambio en la pauta de lectura que da lugar a la inactivación del EPHB2. En este estudio hemos analizado la longitud del tracto A9, en tumores extracolónicos con MSI. El 39% (25/64) de los tumores gástricos y el 14% (8/56) de los carcinomas de endometrio (CE) presentan este tipo de alteración. La introducción de los resultados obtenidos en nuestro modelo matemático de regresión, identifica al EPHB2 como un gen diana, que sufre mutaciones en el tracto A9 sólo en los cánceres gástricos pero no en los de endometrio con MSI. Estos resultados sugieren que el receptor EPHB2 desempeña un papel funcional en la progresión de los tumores gástricos y además pone de manifiesto las diferencias que existen entre los tumores MSI, gástricos y de endometrio.

Alta incidencia de mutaciones del gen EPHB2 en tumores gástricos pero no en los de endometrio con inestabilidad de microsátélites

EPHB2 es un miembro de la familia de receptores con actividad tirosín-quinasa (RTK). Recientemente se ha descrito como un gen supresor de tumores, especialmente en cáncer colorrectal (4, 5). Junto con otros miembros EPH y sus ligandos las efrinas (EFN) regulan numerosos procesos en el desarrollo del sistema nervioso y del sistema cardiovascular (6, 7). En varios tipos celulares, como las neuronas, las células endoteliales y los enterocitos, la interacción entre los receptores EPH y sus ligandos, desempeñan diversos procesos a nivel celular, controlando la organización del citoesqueleto, la migración celular y la adherencia al sustrato (8-10).

En ratones transgénicos APC^{-/+} con cáncer colorrectal, la inactivación del gen EPHB2 parece acelerar el proceso tumoral iniciado por mutaciones en el gen APC. A su vez, éstos presentan menores niveles de expresión del EPHB2 en comparación con el epitelio normal y las lesiones premalignas (5, 11). Se ha descrito recientemente que el 41% de los tumores colorrectales con MSI adquieren mutaciones somáticas en el tracto A9 del exón 17 del EPHB2(4).

El MSI ocurre en el 10-20% de los tumores gastrointestinales y de endometrio. Este fenómeno de inestabilidad, se origina como resultado del mal funcionamiento de los sistemas de reparación del ADN, y da como resultado la acumulación de errores, tanto deleciones como inserciones, en los trectos microsátélites, secuencias repetidas de mononucleótidos, di-nucleótidos y trinucleótidos del genoma. La inactivación de genes importantes, por la acumulación de errores en estos trectos repetidos, contribuye sin duda al desarrollo de determinados tumores. En cáncer gastrointestinal y endometrial, las mutaciones de algunos genes con trectos microsátélites, como TAF1B y BAX, se producen con alta frecuencia. En cambio otros, como TGFBR2, muestran diferencias significativas en función del tipo tumoral (2, 12). Las diferentes frecuencias de mutación de los genes diana del MSI que se observan entre tumores, pone de manifiesto la existencia de

distintas vías oncogénicas dependiendo del órgano en el que se desarrolle el tumor (12).

En un panel de 64 tumores gástricos y 56 CE con MSI se determinó la longitud del tracto A9 del EPHB2 (NM_017449) mediante PCR y posterior análisis de fragmentos (SSCP y electroforesis capilar en un ABI 3100). Los resultados obtenidos, fueron confirmados mediante secuenciación. (Ver Anexo I, Tabla 1).

El 39,1% (25/64) de los tumores gástricos con MSI presentaron mutaciones en el tracto A9 del EPHB2 (Tabla 1 y Fig. 1). Éstas no se asociaron con otros factores clínico-patológicos como la edad, el sexo, el grado de diferenciación, la localización (proximal, media y distal) y el estadio (TNM).

Tabla 1. Frecuencia de mutación en el tracto A9 del gen EPHB2 en diferentes tipos de tumores con MSI

Tumor	nº casos	nº mutaciones	%	Referencia
Colon	246	101	41,1	Alazzouzi y col (2005) ⁴
Gástrico	64	81	39,1	
Endometrio	56	52	14,3	

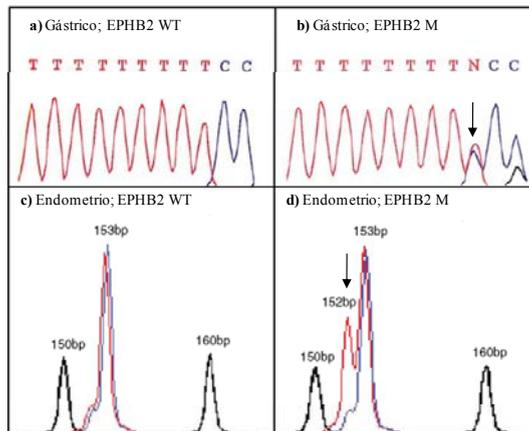


Figura 1. Mutaciones del EPHB2 en tumores gástricos y de endometrio con MSI. Los paneles (a) y (b) muestran un ejemplo representativo de secuenciación, mediante electroforesis capilar, donde se muestra claramente el cambio producido en el tumor. Los paneles (c) y (d) representan las diferencias de longitud del tracto A9 de los CE con el tipo salvaje (WT) y mutante (M) respectivamente, determinados mediante análisis de fragmentos (rojo: tumor; azul: control, negro: marcador interno). Las flechas indican deleciones (A9 a A8). El estado de MSI de estos tumores se caracterizó mediante el análisis de los marcadores descritos previamente (1-3).

La expresión del EPHB2 está regulada por el complejo β -Catenina/TCF/LEF, una ruta que controla la proliferación y diferenciación del epitelio gastrointestinal (8). La mucosa sana presenta altos niveles de expresión del EPHB2 (13). Su actividad inhibe la formación de tumores gastrointestinales, pero su inactivación confiere una ventaja proliferativa a las células tumorales (5, 11). Previamente se ha demostrado que el 41% de los tumores colorrectales con MSI tienen mutaciones en el tracto A9 (Tabla 1) (4). Aunque las células epiteliales normales del estómago expresan altos niveles de EPHB2, más del 85% de los tumores gástricos muestran una reducción o pierden la expresión del gen. Esto sugiere que su inactivación, en el estómago, debe contribuir a la formación y progresión de este tipo tumoral (13).

Para el análisis de los resultados, hemos incluido la frecuencia de mutaciones del tracto A9 del EPHB2, en un modelo de regresión que cuenta con la frecuencia mutacional de 1700 trectos repetitivos en regiones codificantes y no codificantes de más de 300 genes (2). Los resultados demuestran que la frecuencia de mutación observada para el EPHB2, en tumores gástricos con MSI, es muy superior a lo que se podría esperar por azar (Fig. 2a). Esto sugiere que las mutaciones son clonalmente seleccionadas y confieren a las células tumorales una ventaja proliferativa.

La frecuencia de mutaciones del tracto A9 en los CE con MSI fue un 14,3% (8/56) (Tabla 1 y Fig. 1c-d). No se encontró asociación entre las mutaciones de EPHB2 y otras variables clínico-patológicas como la edad, el grado, la invasión miometrial y el tipo histológico (endometrioide o no endometrioide). Dado que la frecuencia de mutaciones en estos tumores es considerablemente más baja (2, 14), se dificulta la comparación de las frecuencias entre tumores gastrointestinales y de endometrio, (Figura 2). El modelo de regresión utilizado reveló que la incidencia de mutaciones observadas en los CE no son significativamente superiores a la frecuencias de mutaciones esperadas por azar (Figura 2b). Esto sugiere que las mutaciones del EPHB2 no otorgan una ventaja de crecimiento a las células tumorales del endometrio, sino que más bien se acumulan como resultado de un proceso estocástico no selectivo. Sin embargo, son necesarios análisis funcionales

para confirmar el papel oncogénico del EPHB2, tanto en los tumores gástricos como en los de endometrio.

En conclusión, en este estudio mostramos que las mutaciones del tracto A9 del EPHB2 son más frecuentes en los tumores gástricos (39,1%), que en los CE con MSI (14,3%). Estos resultados sugieren que el EPHB2 es un gen supresor de tumores tanto en tumores gástricos como colorrectales, y pone de manifiesto la existencia de diferentes vías oncogénicas entre los tumores gastrointestinales y de endometrio.

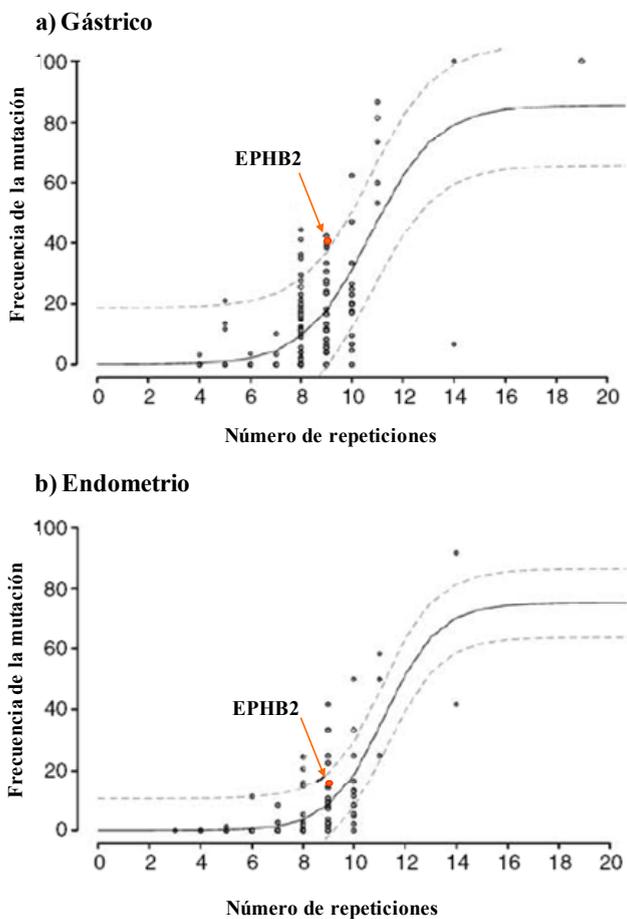


Figura 2. Frecuencia mutacional del tracto A9 del EPHB2 en tumores gástricos (a) y endometriales (b) con MSI. El modelo de regresión, incluye la frecuencia mutacional de más de 1.700 tractos repetidos presentes en regiones codificantes y no codificantes de más de 300 genes (10). El eje X representa la longitud del tracto repetido, y el Y muestra la frecuencia de mutación para cada uno de ellos. La línea continua, representa la media de las mutaciones. Las dos líneas de puntos delimitan el área de predicción del modelo. Los genes, cuya frecuencia de mutación se encuentren fuera de las dos líneas de predicción, nos indican que estas no son debidas al azar y son seleccionadas positiva o negativamente durante la tumorigénesis. Así pues, para el cáncer gástrico con MSI (a), la frecuencia de mutación del tracto A9 del EPHB2 está por encima de la línea superior que delimita el área de predicción. Por el contrario, esto no sucede en el CE con MSI (b). El modelo sugiere que las mutaciones del EPHB2 en los tumores gástricos confieren a las células del tumor una ventaja de crecimiento. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del *R software environment v2.1.1*.

Referencias

1. Bilbao C, Rodriguez G, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Rivero JF, Falcon O, Jr., Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC, Perucho M 2006 The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer* 119:563-570.
2. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz MK, Gebert JF 2003 Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* 22:2226-2235.
3. Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Adachi Y, Itoh H, Hinoda Y, Imai K 1999 Frequent Bax frameshift mutations in gastric cancer with high but not low microsatellite instability. *J Exp Clin Cancer Res* 18:103-106.
4. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espin E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz S, Jr., Arango D 2005 Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* 65:10170-10173.
5. Batlle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H 2005 EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435:1126-1130.
6. Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ 1999 Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4:403-414.
7. Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R 1996 Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86:35-46.
8. Batlle E, Henderson JT, Begthel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H 2002 Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263.
9. Elowe S, Holland SJ, Kulkarni S, Pawson T 2001 Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol* 21:7429-7441.
10. Holder N, Klein R 1999 Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126:2033-2044.
11. Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X 2006 Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 27:454-464.
12. Duval A, Hamelin R 2002 Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62:2447-2454.
13. Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousses S, Tornillo L 2005 EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of expression in gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 11:6450-6458.
14. Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M 1999 Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 59:2995-3002.

Capítulo 4

Los genes reparadores de roturas en la doble cadena del ADN son frecuentes dianas de la inestabilidad de microsatélites en cáncer de endometrio

Cristina Bilbao
Raquel Ramírez
Germán Rodríguez
Orlando Falcón
Laureano León
Nicolás Díaz-Chico
Manuel Perucho
Juan Carlos Díaz Chico

Eur J Cancer. 2010 Jul 16. [Epub ahead of print]

Resumen

La reparación de las roturas de doble cadena (DSB) del ADN es un mecanismo fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica. En cáncer de colon, muchos de sus componentes se encuentran mutados, especialmente en aquellos tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI). Hemos investigado si este fenómeno también está implicado en el cáncer de endometrio (CE) con MSI. En 41 muestras de CE con MSI, se ha analizado la longitud de los trectos repetidos de mononucleótidos de 14 genes, miembros del sistema de reparación de DSB, entre ellos MCPH1/ BRIT1 (*microcephalin-1*) nunca estudiada como diana de MSI en cáncer. Los genes con una mayor frecuencia mutacional fueron DNAPKcs (n=14, 34%), seguido por RAD50 (n=7, 17%), MRE11, ATR y BRCA1 (n=6, 15%), y por CtIP y MCPH1 (n=5, 12%). Las mutaciones bialélicas son infrecuentes, existe una alta proporción de tumores (n=30, 73%) con mutaciones en algún miembro del sistema de reparación de DSB y casi la mitad de ellos mostraron alteraciones en dos o más genes. La presencia de dos o más genes mutados se asoció significativamente con un alto grado ($p=0,03$) e invasión vascular ($p=0,02$) y marginalmente con un estadio avanzado ($p=0,07$) de los tumores. En CE, los genes implicados en el sistema de reparación de DSB son dianas mutacionales relativamente frecuentes de MSI, lo que podría contribuir a la progresión tumoral. Además nuestros datos indican que el gen MCHP1 es una nueva diana de MSI.

Introducción

La inestabilidad de microsatélite (MSI) es el fenotipo de los tumores que presentan deficiencias en los sistemas de reparación del apareamiento incorrecto de bases del ADN (MMR). Estas deficiencias hacen que se acumulen cientos de miles de mutaciones causadas por inserciones o deleciones que afectan a los trectos repetidos denominados microsatélites (1). Son importantes aquellas presentes en los microsatélites localizados en la región codificante de genes implicados en el proceso tumoral, que controlan la división celular, la supervivencia y especialmente, los encargados de reparar los daños causados en el ADN (1, 2). El MSI es una característica común de la mayoría de los tumores colorrectales hereditarios no polipósicos (HNPCC), y de un subgrupo de tumores esporádicos de colon, gástricos y de endometrio (2, 3). Esta alteración genética está presente en aproximadamente el 20% de los CE, y como en la mayoría de los tumores esporádicos, está causada por el silenciamiento epigenético del gen reparador MLH1 (4).

La respuesta al daño del ADN (DDR) consiste en complejos sistemas de señalización que detectan las lesiones del ADN y promueven la puesta en marcha de diferentes mecanismos de reparación, preservando así la estabilidad del genoma. Entre los mecanismos de reparación que forman el sistema de DDR se encuentran MMR, de roturas de doble cadena (DSB) y de escisión de bases (BER), entre otros (5). Defectos en la capacidad de detección y en la reparación de los daños aumentan el riesgo del desarrollo tumoral.

La célula usa dos mecanismos de reparación de DSB, dependiendo del tipo de rotura de doble cadena y de la fase del ciclo celular. Así, para las roturas de doble cadena que causan extremos no homólogos se activa el sistema de unión de extremos no homólogos (NHEJ), funcional durante todas las fases del ciclo celular. Para las roturas que causan extremos homólogos en la fase S ó G2 del ciclo se activan los mecanismos para la recombinación homóloga (HR) (5).

Los genes que componen el sistema de reparación de DSB son potenciales dianas de MSI. En cáncer de colon (CC) existe una alta proporción de tumores con uno o más genes, miembros de NEHJ y HR, alterados (6). A pesar de que se han

descrito mutaciones en algunos de estos genes, no se ha realizado un análisis de forma exhaustiva en CE con MSI (7-9).

En este trabajo, hemos investigado 14 genes miembros del sistema de reparación de DSB como posibles dianas del MSI en CE. Así como la asociación entre las mutaciones y las variables clínico-patológicas. Entre ellos, incluimos al gen MCPH1/BRIT1 (*Microcephalin-1*), como un nuevo gen supresor de tumores que nunca ha sido estudiado como diana de MSI en cáncer.

MCPH1 se identificó inicialmente como un gen implicado en la determinación del tamaño del cerebro. Sin embargo, estudios recientes sugieren que participa en procesos biológicos esenciales como la regulación de la entrada en mitosis, el mantenimiento de la estabilidad genómica y en los mecanismos de reparación de DSB (10-12). Además, se ha descrito una disminución de su expresión en tumores de ovario, próstata y mama (11).

Material y métodos

Muestras tumorales y clasificación MSI

Para la realización de este estudio, aprobado por el comité ético y tras el consentimiento informado de las pacientes, usamos 41 muestras de CE con MSI pertenecientes a nuestra serie tumoral descrita previamente (13).

Para la determinación y clasificación de MSI se usaron cinco marcadores de mononucleótidos quasimonomórficos (BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27) de acuerdo con las condiciones y los criterios previamente publicados, con ligeras modificaciones (14). Usando la secuencias de primers descritas (ver anexo I), se realizó la amplificación simultáneamente (pentaplex), mezclando 20ng de ADN, 240nM de cada primer, excepto para BAT26 que fue de 1μM, 200μM de dinucleótidos trifosfato, 2mM de MgCl₂, 1x de *buffer* Biotaq y 1U de Biotaq DNA polimerasa (Bioline) en un volumen final de reacción de 25μl. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial a 94°C durante 5min, seguido de 12 ciclos de 30seg a 94°C, 30seg a 72°C y 30seg a una temperatura de anillamiento que decrece 2°C cada tres ciclos (comenzando a 61°C en los tres primeros ciclos y disminuyendo

a 55°C en los tres últimos) y 25 ciclos de 30seg a 94°C, 30seg a 72°C y 30seg a 55°C, seguido de un paso de extensión final de 10min a 72°C.

Los productos de PCR se diluyeron 1:50 en agua destilada y 1µl de la dilución se mezcló con 9,75µl de formamida y 0,25µl de *GeneScan 500 LIZ Size Standard* (Applied Biosystems). La mezcla se desnaturalizó durante 5min a 98°C y enfrió en hielo. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis capilar en un *ABI PRISM 3100 16-capillary genetic analyser* (Applied Biosystems) y se analizó su longitud mediante el uso de *Peak Scanner software v1.0* (Applied Biosystems).

Detección de mutaciones que alteran la pauta de lectura de los genes del sistema de reparación de DSB

Mediante PCR (monoplex) y usando primers específicos, se analizaron las mutaciones de los trectos microsatélites de 14 genes implicados en los mecanismos de reparación de DSB.

En un volumen final de reacción de 25µl se mezclaron 20ng de ADN, 240nM de cada primer, 200µM de dinucleótidos trifosfato, 2mM de MgCl₂, 1x de *buffer* Biotaq y 1U de Biotaq DNA polimerasa (Bioline). El primer con sentido, de cada pareja, está marcado con el fluorocromo 6-FAM. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C durante 5min, seguido por 35 ciclos de 30seg a 94°C, 30seg a la correspondiente temperatura de hibridación y 30seg a 72°C, con un ciclo final de 10min a 72°C. La tabla 1 muestra la secuencia de los primers y las condiciones de amplificación para el gen MCPH1.

El análisis de fragmentos se determinó de la misma manera que para los marcadores de MSI descritos anteriormente. Para la identificación de las inserciones o deleciones, se comparó el patrón de picos de las muestras tumorales con el de muestras control, que no presentaban alteración en los trectos analizados. La figura 1 muestra el patrón de picos de diferentes trectos microsatélites del gen MCPH1 en el tumor comparado con el control.

Análisis estadístico

La relación entre la frecuencia mutacional y las variables clínico-patológicas se llevó a cabo usando los test no paramétricos χ^2 y Fisher. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los niveles de significación bilateral eran $p < 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico *GraphPad Prism v5*.

Tabla 1. Detalles de las condiciones de PCR para el análisis de los trectos repetidos del gen MCPH1

Primers*	Tracto repetido (exón)	Tamaño del producto de PCR (pb)
F: 5'-TATACAGATGCAGGACAGCTG-3' R: 5'-TGCCATTATCTACATTGAAATC-3'	A9 (4)	127
F: 5'-AAATGTATGCAGCCCAAAGA-3' R: 5'-GGACACAAATGCAAAGAAGCTG-3'	A6 (5)	153
F: 5'-TCTAAGAAGGAGAGAACAAGC-3' R: 5'-GACTGGAGATGGTTTTTGCTG-3'	A7 (8)	109

Abreviaturas: F: con sentido, R: sin sentido, pb: pares de bases

*Temperatura de anillamiento: 61°C

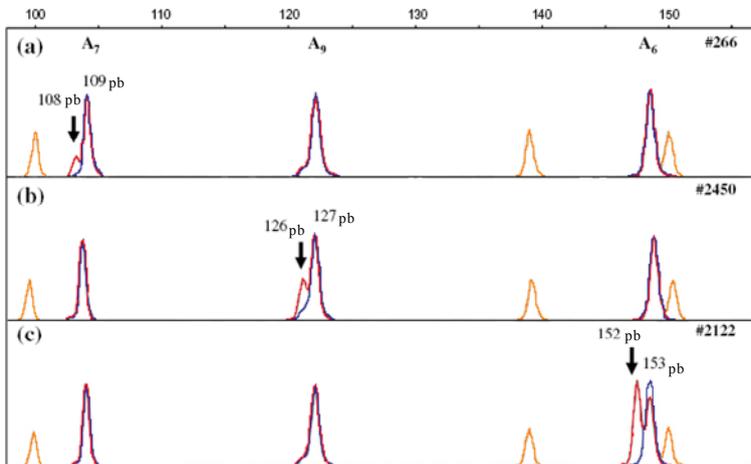


Figura 1. Ejemplo de tumores con mutaciones, que alteran la pauta de lectura, en los trectos repetidos de la región codificante del gen MCPH1. Las flechas indican las deleciones de un mononucleótido en los trectos a) A7, b) A9, c) A6 localizados en los exones 8, 4 y 5, respectivamente. En rojo: tumor, en azul: control, en naranja: marcador de peso molecular, pb: pares de bases. Se indica el código de referencia de la muestra tumoral.

Resultados

La incidencia de mutaciones en los trectos microsatélites de los genes implicados en la reparación de DSB se muestra en la figura 2. Los genes con una mayor frecuencia de mutaciones fueron el DNAPKcs (también conocido como PRKDC), con un 34% (14/41), 17% para RAD50, 15% para MRE11, ATR y BRCA1 y 12% para CtIP (RBBP8) y MCPH1. El resto de los genes (CHK1, XRCC2, WRN, TOPBP1, CDC25C, BLM y BRCA2) presentaron una frecuencia mutacional menor al 7%.

Respecto a las alteraciones del tracto T11 del gen MRE11, localizado en una región no codificante, sólo se tuvieron en cuenta aquellas que afectan de manera significativa a la expresión de la proteína (ver discusión). En cuanto a las mutaciones encontradas en el gen MCPH1, dos tumores presentaron deleciones simultáneas de un nucleótido, en el tracto A9 del exón 4 y en el tracto A6 del exón 5. Otros dos tumores presentaron deleciones en el tracto A7 del exón 8 (Fig. 1). Este gen también se analizó en 62 muestras de CE con estabilidad de microsatélites (MSS) y no se encontraron mutaciones en los microsatélites analizados (datos no mostrados).

El 71% de los tumores (29/41) presentaron alterado alguno de los trectos microsatélites de los genes de reparación de DSB analizados. Casi la mitad de ellos (48%, 14/29) presentaron alteraciones en dos o más componentes del sistema. De los 29 tumores con mutaciones, los miembros de los mecanismos de reparación de NHEJ y HR se encontraron mutados en 14 (48%) y 24 (83%) de los tumores, respectivamente.

De acuerdo con las características clínico-patológicas de las pacientes, la presencia de mutaciones en dos o más genes de reparación de DSB se asoció significativamente con un alto grado ($p=0,03$) e invasión vascular ($p=0,02$) y marginalmente con un estadio avanzado ($p=0,07$) de los tumores (Tabla 2).

n° de casos	Código del tumor	DNAPKs										n° de genes mutados				
		A10	A9	T11	A10	A8	A9	A6, A7, A9	CHK1	XRCC2	WRN		TOPBP1	CDC25C	BLM	BRCA2
1	266			-1-2	+1			-1	+1	-1						5
2	835	-1	-1	-1-2		-1										4
3	2356	+1	+1	-1-1		-1										4
4	1971	-1-1	-1-1					+1	-1							4
5	2450		-1					-1	-1							4
6	2293	+1	+1	+1						-1						4
7	1513	-1		-2					-1							3
8	2297	-1		-1-1	+2											3
9	294				+1											3
10	1000	+1		-2												2
11	1357			-1	-1	-1										2
12	1936	-1		-1		-1										2
13	1128					-1	-1									2
14	744	-1														2
15	1346	-1		-1						-1						1
16	518	-1														1
17	2113	-1		-1												1
18	1647	+1														1
19	1802	-1														1
20	1731		-1	-1												1
21	1861		-1	-1												1
22	2422					-1										1
23	1001					-1										1
24	1911						-1									1
25	2035				-1											1
26	2111							-1								1
27	1401				-1											1
28	2122				-1											1
29	1440															1
30	863															1
31	1740															0
32	2098				+1											0
33	2189															0
34	2041															0
35	738				-1											0
36	1389				-1											0
37	1398				-1											0
38	1640				-1											0
39	1658															0
40	2445															0
41	2480															0
n° mutaciones		14	7	6	6	6	5	5	3	2	2	1	1	1	0	
Frecuencia		34%	17%	15%	15%	15%	12%	12%	7%	5%	5%	2%	2%	2%	0%	

Figura 2. Mutaciones que alteran la pauta de lectura en los trectos de mononucleótidos de los genes que reparan las DSB en tumores de endometrio con MSI. En negro: mutación; en blanco: sin mutación; en gris: mutaciones con un pequeño o desconocido efecto en la expresión de la proteína. -1, delección de 1pb; -2, delección de 2pb; +1, inserción de 1pb; +2, inserción de 2pb. Los casos con delecciones en homocigosis (-1/-1) no se pueden distinguir de los casos con mutaciones en hemicigosis y LOH en el otro alelo.

Discusión

Un número importante de los tumores de nuestra serie presentaron mutaciones en DNAPKcs. La frecuencia mutacional (34%) fue significativamente mayor en comparación con otras series de CE con MSI (13%, 7/54, $p=0,02$) (7, 15). Del mismo modo, la tasa de alteraciones detectadas en RAD50 (17%) fue significativamente superior a la descrita para CE con MSI (2,4%, 1/42, $p < 0,01$) (7). Finalmente, el 15% de los tumores presentan BRCA1 mutado, esta frecuencia contrasta con la ausencia de mutaciones encontrada en otras series de CE con MSI referidas en la literatura (8, 16, 17). Estas discrepancias podrían deberse al bajo número de casos analizados y a los falsos negativos, debidos a la falta de sensibilidad de los métodos de detección. Los genes TOPBP1 y XRCC2 no han sido estudiados anteriormente en CE, pero sí en CC, donde la tasa de mutación observada es muy baja igual que en nuestra serie de CE (6).

Se sabe que no todas las mutaciones presentes en el tracto no codificante T11 del gen MRE11 tienen un impacto funcional. Las deleciones monoalélicas de dos o más nucleótidos, reducen drásticamente la cantidad de la proteína MRE11, mientras que las deleciones de un nucleótido provocan solo una ligera o nula reducción en los niveles de expresión de la proteína (18-20). Las deleciones bialélicas de una base también se han asociado a una pérdida de expresión de la proteína, tanto en tumores como en líneas celulares (19-22). Por lo tanto, sólo consideramos las mutaciones bialélicas y las deleciones de dos o más nucleótidos (Fig. 1).

Hasta la fecha, no se habían analizado ningún tracto microsatélite localizado en las regiones codificantes del gen MCPH1 en tumores MSI. En este estudio, el 12% de los tumores presentaron deleciones en los trectos repetidos analizados de este gen. Dos tumores presentaron deleciones de un nucleótido en el tracto A9 del exón 4 y otra en el tracto A6 del exón 5. En ambos casos, estas mutaciones generan una proteína truncada, presumiblemente no funcional, de 145 aminoácidos. La inserción de una A en el tracto A6 en el exón 5 se asocia al síndrome de microcefalia primaria o también conocido como PCC (*postnatal short stature and premature chromosome condensation*) descrito por primera vez en dos

hermanos con esta alteración en línea germinal. Esta mutación cambia la pauta de lectura generando una proteína truncada de 146 aminoácidos, solo con el dominio BCRT del extremo N-terminal (23). Dos tumores más de nuestra serie presentaron deleciones de un solo nucleótido en el tracto A7 del exón 8 que da lugar también, a una proteína truncada de 499 aminoácidos sin los dos dominios BCRT del extremo C-terminal, importantes para su correcto funcionamiento en DDR (24). En cáncer de mama, debido a la deleción de 38 bases en el exón 10, se ha encontrado esta proteína truncada, no funcional, sin estos dos dominios BCRT C-terminales (11). Teniendo en cuenta que las mutaciones en el gen MPCH1 solo las observamos en tumores con MSI y no en aquellos MSS, proponemos que este gen sea considerado un gen diana de MSI en CE.

De acuerdo con las características de los tumores MSI, la mayoría de las mutaciones que se observan son monoalélicas (25). Sabemos que las mutaciones heterocigóticas de algunos genes que reparan DSB afectan dramáticamente al funcionamiento de este sistema de reparación, en células (21, 26, 27). Un ejemplo es DNAPKcs, que juegan un papel central en los mecanismos de reparación de NHEJ a través del reclutamiento y activación de las enzimas de procesamiento final, como son las ADN polimerasas y ligasas (28). Un subclón de la línea celular HCT-8, portadora de una deleción heterocigota en el tracto A10 del exón 5, tiene una alta sensibilidad al tratamiento combinado con bleomicina (inhibidor enzimático), comparándola con la línea celular original. Esto sugiere que la inactivación de uno de los dos alelos del gen es suficiente para que se pierda la actividad del sistema de reparación de DSB en las células (21).

El sistema de reparación de HR también parece sensible a la haploinsuficiencia. Se ha demostrado que las alteraciones heterocigóticas de algunos de sus miembros, como los genes ATR, RPA1 o RFC2, provocan pérdida de la capacidad de responder al daño del ADN (26, 27). Las mutaciones monoalélicas del gen ATR, en el tracto A10 del exón 10, están asociadas con un peor pronóstico en los CE con histología endometriode y MSI (9). Por tanto, sugerimos que estos tumores con haploinsuficiencia en alguno de los componentes que forman parte de

los mecanismos de reparación de DSB pueden adquirir algún tipo de ventaja que les permita una mayor supervivencia.

Cabe preguntarse si las mutaciones de genes que muestran una baja frecuencia mutacional realmente contribuyen a la reducción de la eficiencia de los mecanismos de reparación de DSB. De acuerdo con el modelo de la haploinsuficiencia propuesto para los tumores MSI, las alteraciones monoalélicas de varios genes cuyos productos participan en la misma ruta de señalización, podrían dar lugar a una anormal actividad de la misma (25, 29). En nuestra serie, casi la mitad de los tumores mostraron alguna alteración en más de un miembro del sistema de reparación de DSB. Además, aquellos con dos o más genes alterados mostraron un comportamiento diferente, se asociaron con un alto grado de invasión vascular y mostraron una tendencia con estadios avanzados. Sin embargo, esta relación entre la alteración simultánea de dos o más genes y las variables clínico-patológicas, no se modificó cuando se descartaron del análisis los genes con una frecuencia mutacional menor al 8%, punto de corte recomendado por algunos autores para el CE con MSI (7).

Las deficiencias en los mecanismos de reparación de DSB juegan un papel importante en el tratamiento del cáncer. Su estado puede afectar a la respuesta al tratamiento de quimioterapia y radioterapia. Estudios *in vitro* demuestran que las mutaciones en los genes que componen el sistema de reparación de DSB sensibilizan a la célula frente a agentes usados en quimioterapia, incluidos los que generan DSB en el ADN (21, 22, 30). Por otro lado, hemos observado que la presencia de MSI predice una peor respuesta a la radioterapia en pacientes con estadios iniciales de CE endometriode, como ocurre también en pacientes con CC (31, 32). En los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, son frecuentes las deleciones en el cromosoma 11q, que implican la pérdida de tres genes importantes para la reparación de DSB (MRE11, ATM y H2AFX) esto se asocia con la sensibilidad a la radioterapia (33).

Independientemente de su función en el sistema MMR, el gen MLH1 también participa en los mecanismos de reparación del ADN que implican recombinación genética. Concretamente, MLH1 evita que se acumulen errores en

los procesos de HR. En este sentido, la ausencia de este gen, además de generar defectos en el sistema MMR aumentando así, la probabilidad de desarrollar MSI, influye en la eficiencia del sistema de reparación de DSB (34, 35).

En resumen, nuestros resultados sugieren que las alteraciones de los tractos microsatélites, presentes en los genes implicados en la reparación de DSB, son dianas directas de MSI en CE, y que la acumulación de alteraciones monoalélicas en varios genes de este sistema de reparación podría contribuir a una peor evolución clínica de la enfermedad.

Tabla 2. Relación entre las características clínico-patológicas y los tumores con ≥ 2 genes del sistema de reparación de DSB

Características	n	n° de genes mutados		P-valor [†]
		0-1	≥ 2 (%)	
Edad de diagnóstico*				
<67	20	13	7 (35)	1,000
≥ 67	21	14	7 (33)	
Estadio				
I	22	17	5 (23)	0,070
II	10	6	4 (40)	
III	9	4	5 (56)	
Grado				
1	14	12	2 (14)	0,030
2	12	8	4 (33)	
3	15	7	8 (53)	
Inf. Miometrial				
<50%	30	21	9 (30)	0,460
$\geq 50\%$	11	6	5 (45)	
Inv. Vascular				
No	25	20	5 (20)	0,020
Sí	16	7	9 (56)	

* Mediana= 67 años, [†] Test χ^2 o Fisher.

Referencias

1. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M 1993 Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
2. Perucho M 1996 Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 377:675-684.
3. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tourgeman D, Zheng J, Shibata D 1994 Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86:1216-1221.
4. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG 1998 MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17:2413-2417.
5. Jackson SP, Bartek J 2009 The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-1078.
6. Miquel C, Jacob S, Grandjouan S, Aime A, Viguier J, Sabourin JC, Sarasin A, Duval A, Praz F 2007 Frequent alteration of DNA damage signalling and repair pathways in human colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogene* 26:5919-5926.
7. Duval A, Reperant M, Compoin A, Seruca R, Ranzani GN, Iacopetta B, Hamelin R 2002 Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res* 62:1609-1612.
8. Vassileva V, Millar A, Briollais L, Chapman W, Bapat B 2002 Genes involved in DNA repair are mutational targets in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 62:4095-4099.
9. Zigelboim I, Schmidt AP, Gao F, Thaker PH, Powell MA, Rader JS, Gibb RK, Mutch DG, Goodfellow PJ 2009 ATR mutation in endometrioid endometrial cancer is associated with poor clinical outcomes. *J Clin Oncol* 27:3091-3096.
10. Bartek J 2006 Microcephalin guards against small brains, genetic instability, and cancer. *Cancer Cell* 10:91-93.
11. Rai R, Dai H, Multani AS, Li K, Chin K, Gray J, Lahad JP, Liang J, Mills GB, Meric-Bernstam F, Lin SY 2006 BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell* 10:145-157.
12. Wu X, Mondal G, Wang X, Wu J, Yang L, Pankratz VS, Rowley M, Couch FJ 2009 Microcephalin regulates BRCA2 and Rad51-associated DNA double-strand break repair. *Cancer Res* 69:5531-5536.
13. Bilbao C, Rodriguez G, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Rivero JF, Falcon O, Jr., Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC, Perucho M 2006 The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer* 119:563-570.
14. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Buhard O, Duval A, Chung TK, Hamelin R 2006 Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis* 27:951-955.
15. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz MK, Gebert JF 2003 Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* 22:2226-2235.
16. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J 1999 Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 59:462-466.

17. Koul A, Nilbert M, Borg A 1999 A somatic BRCA2 mutation in RER+ endometrial carcinomas that specifically deletes the amino-terminal transactivation domain. *Genes Chromosomes Cancer* 24:207-212.
18. Giannini G, Rinaldi C, Ristori E, Ambrosini MI, Cerignoli F, Viel A, Bidoli E, Berni S, D'Amati G, Scambia G, Frati L, Screpanti I, Gulino A 2004 Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 23:2640-2647.
19. Giannini G, Ristori E, Cerignoli F, Rinaldi C, Zani M, Viel A, Ottini L, Crescenzi M, Martinotti S, Bignami M, Frati L, Screpanti I, Gulino A 2002 Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep* 3:248-254.
20. Ottini L, Falchetti M, Saieva C, De Marco M, Masala G, Zanna I, Paglierani M, Giannini G, Gulino A, Nesi G, Mariani Costantini R, Palli D 2004 MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. *Carcinogenesis* 25:2337-2343.
21. Li HR, Shagisultanova EI, Yamashita K, Piao Z, Perucho M, Malkhosyan SR 2004 Hypersensitivity of tumor cell lines with microsatellite instability to DNA double strand break producing chemotherapeutic agent bleomycin. *Cancer Res* 64:4760-4767.
22. Rodriguez R, Hansen LT, Phear G, Scora J, Spang-Thomsen M, Cox A, Helleday T, Meuth M 2008 Thymidine selectively enhances growth suppressive effects of camptothecin/irinotecan in MSI+ cells and tumors containing a mutation of MRE11. *Clin Cancer Res* 14:5476-5483.
23. Trimborn M, Bell SM, Felix C, Rashid Y, Jafri H, Griffiths PD, Neumann LM, Krebs A, Reis A, Sperling K, Neitzel H, Jackson AP 2004 Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am J Hum Genet* 75:261-266.
24. Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J 2003 The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 302:639-642.
25. Perucho M 2003 Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 22:2223-2225.
26. Lewis KA, Mullany S, Thomas B, Chien J, Loewen R, Shridhar V, Cliby WA 2005 Heterozygous ATR mutations in mismatch repair-deficient cancer cells have functional significance. *Cancer Res* 65:7091-7095.
27. O'Driscoll M, Dobyns WB, van Hagen JM, Jeggo PA 2007 Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am J Hum Genet* 81:77-86.
28. Meek K, Dang V, Lees-Miller SP 2008 DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol* 99:33-58.
29. Suzuki K, Dai T, Suzuki I, Dai Y, Yamashita K, Perucho M 2002 Low mutation incidence in polymorphic noncoding short mononucleotide repeats in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Cancer Res* 62:1961-1965.
30. Lewis KA, Lilly KK, Reynolds EA, Sullivan WP, Kaufmann SH, Cliby WA 2009 Ataxia telangiectasia and rad3-related kinase contributes to cell cycle arrest and survival after cisplatin but not oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 8:855-863.
31. Bilbao C, Lara PC, Ramirez R, Henriquez-Hernandez LA, Rodriguez G, Falcon O, Leon L, Perucho M, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation-treated endometrioid endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76:9-13.
32. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, Slattery ML 2009 Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control* 20:1763-1768.

33. Parikh RA, White JS, Huang X, Schoppy DW, Baysal BE, Baskaran R, Bakkenist CJ, Saunders WS, Hsu LC, Romkes M, Gollin SM 2007 Loss of distal 11q is associated with DNA repair deficiency and reduced sensitivity to ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 46:761-775.
34. Siehler SY, Schrauder M, Gerischer U, Cantor S, Marra G, Wiesmuller L 2009 Human MutL-complexes monitor homologous recombination independently of mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* 8:242-252.
35. Wang Q, Ponomareva ON, Lasarev M, Turker MS 2006 High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in Mlh1 null mouse cells. *Mutat Res* 594:189-198.

Capítulo 5

El silenciamiento epigenético del gen EPHB4 es un posible marcador pronóstico en el cáncer de endometrio

Raquel Ramírez
Cristina Bilbao
Germán Rodríguez
Orlando Falcón
Laureano León
Nicolás Díaz-Chico
Juan Carlos Díaz Chico

Resumen

Los receptores EPHB2 y EPHB4 interactúan con sus ligandos las efrinas, generando una comunicación entre células que controla la adhesión, la morfología y la movilidad celular. Su expresión está regulada por la ruta Wnt/ β -Catenina, alterada en diferentes tipos tumorales incluido el carcinoma de endometrio (CE). En cáncer de colon, mama y próstata son considerados genes supresores de tumores y su pérdida de expresión, por alteraciones genéticas y epigenéticas, se asocia con la carcinogénesis y la progresión tumoral. En este estudio, determinamos si el estado de metilación de los promotores de EPHB2 y EPHB4 se relaciona con otras variables tumorales y con la progresión del CE. La metilación del promotor de EPHB2 se observó solo en uno de los 203 CE analizados. En cambio, el 8% de los tumores mostraron metilado el promotor del gen EPHB4. Ninguna de las 40 muestras incluidas en el grupo control presentó esta alteración para ambos genes. El estado metilado de EPHB4 se relacionó positivamente con la edad de las pacientes ($p=0,005$) y la metilación del gen de la E-Cadherina ($p=0,005$). El análisis univariante de supervivencia determinó que las pacientes con EPHB4 metilado morían antes a causa del cáncer ($p=0,003$). En conclusión, la metilación del promotor de EPHB2 no está relacionada con la carcinogénesis ni la progresión del CE. El silenciamiento epigenético del gen EPHB4 sí está presente en este tipo tumoral, aunque en una frecuencia menor que en tumores de colon. Los CE con EPHB4 metilado aparecen en pacientes de mayor edad con una peor evolución clínica de la enfermedad.

Introducción

Los genes EPHB2 y EPHB4 (*Erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma B2 and B4*) forman parte de una extensa familia de receptores transmembrana tirosín-quinasa. Éstos se agrupan en dos subclases: EPHA y EPHB dependiendo de la homología de sus secuencias y la especificidad en la unión a sus ligandos las efrinas (EFN), ancladas también en la membrana plasmática de la célula. Las EFN-A interactúan preferiblemente con los receptores EPHA, y las EFN-B con receptores del tipo EPHB (1, 2). Así se genera una comunicación entre células adyacentes, que en el caso de los receptores EPHB y sus ligandos es bidireccional (3, 4). Esta interacción regula la adhesión, la morfología y la movilidad celular, la angiogénesis y también la tumorigénesis (5).

En diferentes tipos tumorales, incluido el CE, la ruta de señalización celular Wnt/ β -Catenina está alterada, debido tanto a modificaciones genéticas como epigenéticas. Esto provoca, en muchos casos, un aumento de la expresión de sus genes diana (6-8).

La transcripción de EPHB2 y EPHB4 está regulada por la ruta Wnt/ β -Catenina (9, 10). Se ha observado un aumento de la expresión de estos genes en diferentes tipos tumorales como, gastrointestinales, de mama, ovario, vejiga y en CE (11-17). Sin embargo, EPHB2 y EPHB4 son considerados genes supresores de tumores en cáncer de colon, mama y próstata, pues se ha demostrado que la pérdida de su expresión está implicada en la progresión tumoral (9, 18-21). Niveles bajos de estos receptores se asocian, en colon, con estadios avanzados y con un peor comportamiento clínico del tumor, y en mama, con tumores de alto grado (9, 18-20).

Los mecanismos que inhiben o reducen la expresión de estos genes no están claros. En cáncer de colon, gástrico y de próstata, se han descrito mutaciones inactivantes y pérdidas de heterocigocidad (LOH) del gen EPHB2 (21-28). Diversos autores afirman que el silenciamiento, por metilación del promotor, de EPHB2 y EPHB4, es un proceso frecuente en tumores de colon (19, 22, 29).

El objetivo de este trabajo fue determinar el estado de metilación de los promotores de los genes EPHB2 y EPHB4 en CE, su relación con variables clínico-

patológicas y moleculares de los tumores y su papel en la evolución de la enfermedad.

Material y métodos

Las pacientes

Realizamos un estudio retrospectivo en una serie de 203 muestras de CE y 40 de endometrio sano, usado como tejido control (TC), previo consentimiento informado de las pacientes, que fueron diagnosticadas y tratadas entre octubre de 1990 y junio de 1999, en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Gran Canaria.

Todas las pacientes fueron sometidas a una laparotomía exploratoria con histerectomía total, y salpingo-ooforectomía bilateral. Ninguna de ellas recibió radiación o quimioterapia preoperatoria. Todas eran de raza blanca (caucásicas), y la edad media del diagnóstico fue de 64 años, con un rango de edades comprendido entre 29 y 90 años. Las muestras de TC contenían mayoritariamente tejido epitelial endometrial en fase proliferativa o secretora, y fueron obtenidas de pacientes sometidas a una histerectomía por enfermedades ginecológicas benignas.

Del total de la serie, el 68% de los tumores fueron diagnosticados en estadio I, la mayoría de tipo histológico endometrioide (89%), el 74% estaban bien o moderadamente diferenciados, y el 60% no presentaban ni infiltración miometrial ni invasión vascular. El periodo de seguimiento osciló entre los 12 y los 190 meses, con una media de 93,5 meses. De estas, el 22% fallecieron a causa del CE.

Determinación del estado de metilación de los genes EPHB2 y EPHB4

Tratamiento con bisulfito sódico

El ADN fue tratado con bisulfito sódico utilizando el Kit comercial Methylamp™ One-Step DNA Modification Kit (Epigentek Group Inc). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se inició el protocolo con una cantidad de 0,5µg de ADN, siendo el volumen final de elución de 10µl y la concentración final aproximada de 50ng/µl.

MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction)

El ADN modificado se usó para estudiar el estado de metilación de los promotores de los genes EPHB2 y EPHB4 por MSP, en un termociclador MyCycler (BioRad) (30).

Las condiciones de amplificación, ligeramente modificadas, y los primers fueron los descritos en la literatura (ver anexo I, Tabla 3) (19, 22). Cada reacción contenía 50ng de ADN genómico modificado, 1x de *GeneAmp PCR Gold Buffer* y una unidad de *AmpliAq Gold polimerase* (Applied Biosystems), 200 μ M de dinucleótidos trifosfato (dNTPs), 2mM de MgCl₂ y 400nM de cada primer, en un volumen final de reacción de 25 μ l.

En cada carrera se empleó el kit *EpiTect PCR Control DNA Set* (QIAGEN) que contenía: ADN humano metilado y no metilado, ambos tratados con bisulfito sódico, como control positivo (C+) y negativo (C-), respectivamente. También, ADN humano sin modificar (NT) usado como control del tratamiento con bisulfito sódico y una reacción sin ADN, como control de la contaminación (H₂O). Los productos de MSP se corrieron en un gel de agarosa al 2% durante 45min a 100 voltios. Posteriormente se observaron y fotografiaron en un transiluminador con luz ultravioleta (ChemiDoc XRS+, BioRad).

Análisis estadístico

La relación entre el estado de metilación y las variables clínico-patológicas y moleculares se llevó a cabo usando los test χ^2 y Fisher (dependiendo del tamaño de la muestra) para aquellas variables categóricas y el test de *t*-Student para la edad, variable continua con una distribución normal. El tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la fecha de la muerte, fue definido como la supervivencia específica del cáncer. Las curvas de supervivencia se construyeron usando el método de Kaplan Meier y comparadas con el test Log-rank. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los niveles de significación bilateral eran $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago).

Resultados

La metilación del gen EPHB2 sólo se observó en una muestra de CE. En cambio, el 8% (16/202) de los tumores mostraron metilado el promotor del gen EPHB4 (Fig. 1). Ninguna de las 40 muestras incluidas en el grupo control presentó esta alteración para ambos genes.

El estado metilado de EPHB4 se relacionó con pacientes de más edad ($p=0,005$), pero no con otras variables clínico-patológicas como el estadio, el grado, la infiltración miometrial, la invasión vascular o el tipo histológico. Los tumores con EPHB4 metilado mostraban frecuentemente metilación del gen de la E-Cadherina ($p=0,005$). Ninguna otra variable molecular, como la inestabilidad microsátelite (MSI), la ploidía o la alteración genética y epigenética de otros miembros de la ruta Wnt (β -Catenina y APC) se relacionaron con esta alteración (Tabla 1).

El análisis de supervivencia, visualizado mediante las curvas de Kaplan Meier, mostró que los tumores con el EPHB4 metilado tenían un peor comportamiento clínico, las pacientes morían antes a causa de la enfermedad ($p=0,003$) (Fig. 2). El bajo número de eventos ($n=16$) no nos permitió realizar un análisis multivariante robusto.

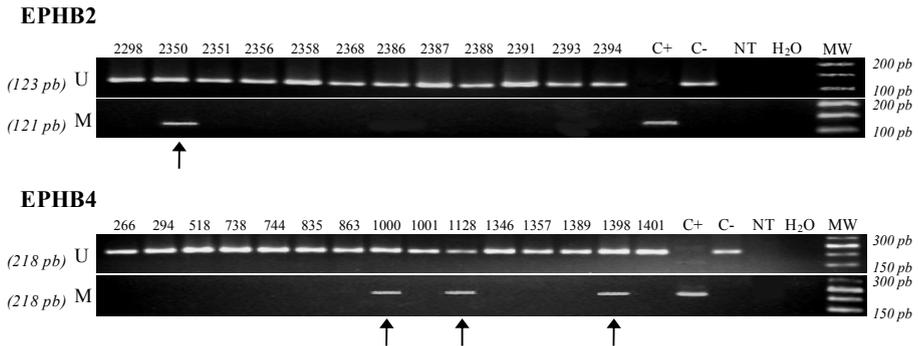


Figura 1. Resultados representativos del estado de metilación de los promotores de los genes EPHB2 y EPHB4 en tumores de endometrio. U: ADN amplificado no metilado; M: ADN amplificado metilado; C+: control positivo para metilación; C-: control negativo para metilación; NT: ADN control no tratado con bisulfito sódico; H₂O: control de la MSP; MW: marcador de peso molecular; pb: pares de bases. Las flechas indican los tumores metilados. Se muestra el código de referencia de las muestras tumorales.

Tabla 1. Relación entre las características clínico-patológicas y moleculares, y el estado de metilación del gen EPHB4

Características	N	EPHB4 metilado	
		n (%)	P-valor
Edad (años) media ± DS			
U		63 ± 10	0,005
M		70 ± 8	
Estadio			
I	138	9 (6,5)	0,388
II	33	4 (12)	
III	31	3 (10)	
Grado			
1	96	6 (6)	0,641
2	54	6 (11)	
3	52	4 (7,7)	
Inf. Miometrial			
<50%	147	11 (7,5)	0,707
≥50%	55	5 (9)	
Inv. Vascular			
No	149	12 (8)	1,000
Si	53	4 (7,5)	
Tipo histológico			
Endometrioide	179	15 (8)	1,000
No endometrioide	23	1 (4)	
Inestabilidad microsatélite			
MSS	161	10 (6)	0,075
MSI	41	6 (15)	
Ploidía			
Diploide	152	11 (7)	0,739
Aneuploide	37	3 (8)	
β-Catenina			
No mutado	168	14 (8)	1,000
Mutado	34	2 (6)	
APC			
No metilado	131	10 (8)	0,973
Metilado	69	6 (9)	
E-Cadherina			
No metilado	172	10 (6)	0,005
Metilado	28	6 (21)	

Abreviaturas: N= número de casos totales, n= número de casos con EPHB4 metilado, MSS= estables, MSI= inestables, DS= desviación *standard*, U= no metilado, M= metilado.

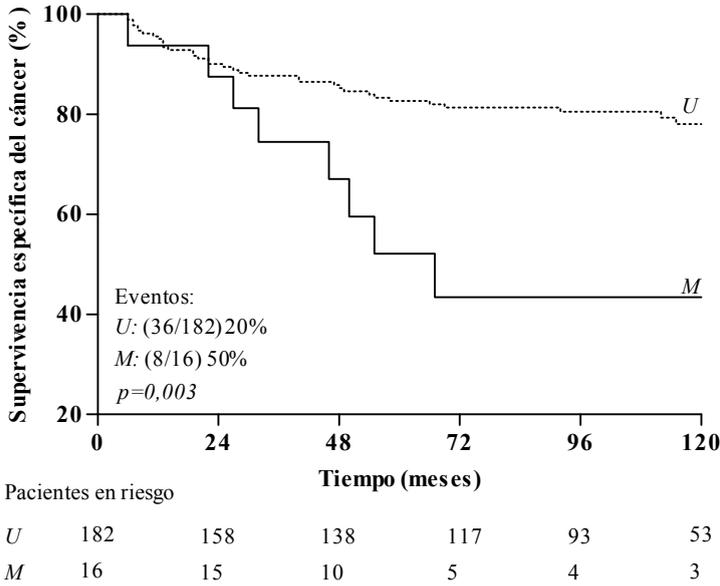


Figura 2. Análisis de Kaplan-Meier basado en el estado de metilación de EPHB4, para la supervivencia específica del cáncer. *U*: pacientes con EPHB4 no metilado; *M*: pacientes con EPHB4 metilado.

Discusión

La expresión de los genes EPHB2 y EPHB4 se encuentra alterada en cáncer, y parece estar relacionada con la tumorigenesis y la evolución de la enfermedad.

El gen EPHB2 está localizado en el cromosoma 1p35-36. Aproximadamente un 20-33% de los tumores gastrointestinales presentan (LOH) en esta región (25-27). Estudios recientes, han puesto de manifiesto que un 41% de los carcinomas de colon, un 39% de los tumores gástricos y un 14% de los CE con MSI poseen mutaciones en el tracto A9 del exón 17 de EPHB2 (22, 23). Pero en estos tumores el estado MSI no supera el 20%. Así que debido a la baja incidencia de estas alteraciones, es probable que otro mecanismo sea el responsable de la pérdida de expresión de este gen.

Trabajos recientes han estudiado el silenciamiento epigenético, por metilación del promotor, del gen EPHB2 en diferentes tipos tumorales (Tabla 2). A

pesar de las discrepancias encontradas, debidas probablemente a la metodología usada y al número de casos analizados, el estado de metilación del promotor EPHB2 no parece ser el responsable de la inhibición transcripcional de este gen en tumores de colon, gástrico y de ovario (20, 22, 26, 29, 31-33).

Tabla 2. Estado de metilación del promotor del gen EPHB2 en diferentes tipos tumorales

Tumor	Referencia	Método	nº casos	Posición	Metilación (%)
Colon	Alazzouzi y col. (22)	MSP	101	-501 a -381	53,4
	Laiho y col. (31)	MSP	8	-501 a -381	63,0
	Nosho y col. (32)	QM-PCR	307		7,5
	Guo y col. (20)	BGS	35	-423 a -116	0,0
	Fu y col. (30)	MSP	64	-501 a -378	0,0
		BGS	33	-423 a -116	0,0
Gástrico	Song y col. (26)	MSP	81	-501 a -381	1,2
Ovario	Wu y col. (33)	MSP	52	-501 a -381	0,0
Endometrio	Nuestro grupo	MSP	202	-501 a -378	0,5

Abreviaturas: MSP: Methylation Specific PCR, QM-PCR: Quantitative MethyLight real time-PCR, BGS: Bisulphite genomic sequencing

El gen EPHB2 se expresa en el tejido endometrial sano, sin embargo existen datos contradictorios acerca del nivel de expresión en CE (12, 34). En nuestra serie, solo una de las muestras analizadas mostró metilación del promotor de EPHB2. Estos resultados indican que el silenciamiento epigenético de este gen no es común en este tipo de cáncer, igual que ocurre en la mayoría de los tumores gastrointestinales y de ovario. La metilación del promotor de EPHB2 no está relacionada con la carcinogénesis ni la progresión del CE.

EPHB4 es considerado un gen supresor de tumores y un marcador pronóstico en cáncer de colon. Los pacientes con bajos niveles de este receptor recaen y mueren antes a causa de la enfermedad (19). Se ha demostrado que la inhibición de su expresión da lugar a un cambio en los patrones de expresión de genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular, que incrementa la capacidad de invasión y migración de las células tumorales (35). La metilación del promotor inhibe la transcripción del EPHB4. Aproximadamente la mitad de los tumores de colon muestran esta alteración, que además se asocia con pacientes de

edad avanzada (19). En cambio en cáncer de ovario esta anomalía epigenética es poco frecuente (Tabla 3) (33).

Tabla 3. Estado de metilación del promotor del gen EPHB4 en diferentes tipos tumorales

Tumor	Referencia	Método	nº casos	Posición	Metilación (%)
Colon	Dávalos y col. (19)	MSP	112	-793 a -34	42,8
Ovario	Wu y col. (33)	MSP/BGS	52	-793 a -34	1,9
Endometrio	Nuestro grupo	MSP	202	-793 a -34	8,0

Abreviaturas: MSP: *Methylation Specific PCR*, BGS: *Bisulphite genomic sequencing*

En el endometrio sano, el receptor EPHB4 parece estar confinado en la membrana plasmática de las células epiteliales glandulares. En el tejido tumoral, se localiza en las células malignas próximas al estroma, donde la formación de nuevos vasos sanguíneos es importante para la progresión del tumor (17). Tanto en hiperplasias como en CE se ha observado un incremento en los niveles de expresión con respecto al tejido sano, poniendo de manifiesto su relación con el proceso carcinogénico. Además, se asocia con el estado post-menopáusico de las pacientes y con tumores más agresivos, de alto grado y estadio (17, 34, 36, 37).

A pesar de esta posible actividad oncogénica, nuestro estudio muestra que el 8% de los CE presentan metilado el promotor de EPHB4 (Tabla 3). Igual que ocurre en tumores de colon, esta alteración se asocia con pacientes de más edad y peor pronóstico (19). Además, se observa una asociación con la metilación del gen de la E-Cadherina. El silenciamiento de ambos genes podría seleccionar a un grupo de tumores con mayor capacidad proliferativa e invasiva.

Conclusión

La metilación del promotor de EPHB2 es prácticamente inexistente en CE. En cambio, el silenciamiento epigenético del gen EPHB4 si está presente en estos tumores, aunque en una frecuencia menor que en los colorrectales. Aparece en pacientes de mayor edad y con un peor pronóstico, lo que indica que la metilación del EPHB4 debe estar implicada en la evolución del CE como ocurre en cáncer de colon.

Referencias

1. Zhou R 1998 The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol Ther* 77:151-181
2. 1997 Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90:403-404.
3. Bruckner K, Pasquale EB, Klein R 1997 Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275:1640-1643.
4. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T 1996 Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383:722-725.
5. Surawska H, Ma PC, Salgia R 2004 The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:419-433.
6. Klaus A, Birchmeier W 2008 Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8:387-398.
7. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matias-Guiu X, Esteller M, Palacios J 2002 Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21:7981-7990.
8. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D 2006 Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol Rep* 16:1189-1196.
9. Batlle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H 2005 EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435:1126-1130.
10. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H 2002 Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263.
11. Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM 2002 Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer* 94:934-939.
12. Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousset S, Tornillo L 2005 EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of expression in gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 11:6450-6458.
13. Stephenson SA, Slomka S, Douglas EL, Hewett PJ, Hardingham JE 2001 Receptor protein tyrosine kinase EphB4 is up-regulated in colon cancer. *BMC Mol Biol* 2:15.
14. Wu Q, Suo Z, Kristensen GB, Baekelandt M, Nesland JM 2006 The prognostic impact of EphB2/B4 expression on patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 102:15-21.
15. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM 2004 Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 10:26-33.
16. Xia G, Kumar SR, Stein JP, Singh J, Krasnoperov V, Zhu S, Hassanieh L, Smith DL, Buscarini M, Broek D, Quinn DI, Weaver FA, Gill PS 2006 EphB4 receptor tyrosine kinase is expressed in bladder cancer and provides signals for cell survival. *Oncogene* 25:769-780.
17. Berclaz G, Karamitopoulou E, Mazzucchelli L, Rohrbach V, Dreher E, Ziemiecki A, Andres AC 2003 Activation of the receptor protein tyrosine kinase EphB4 in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. *Ann Oncol* 14:220-226.

18. Berclaz G, Flutsch B, Altermatt HJ, Rohrbach V, Djonov V, Ziemiecki A, Dreher E, Andres AC 2002 Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncol Rep* 9:985-989.
19. Davalos V, Dopeso H, Castano J, Wilson AJ, Vilardell F, Romero-Gimenez J, Espin E, Armengol M, Capella G, Mariadason JM, Aaltonen LA, Schwartz S, Jr., Arango D 2006 EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 66:8943-8948.
20. Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X 2006 Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 27:454-464.
21. Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, Weaver D, Robbins C, Moses T, Allinen M, Hautaniemi S, Chen Y, Elkahloun A, Basik M, Bova GS, Bubendorf L, Lugli A, Sauter G, Schleutker J, Ozelik H, Elowe S, Pawson T, Trent JM, Carpten JD, Kallioniemi OP, Mousnes S 2004 Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet* 36:979-983.
22. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espin E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz S, Jr., Arango D 2005 Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* 65:10170-10173.
23. Davalos V, Dopeso H, Velho S, Ferreira AM, Cirnes L, Diaz-Chico N, Bilbao C, Ramirez R, Rodriguez G, Falcon O, Leon L, Niessen RC, Keller G, Dallenbach-Hellweg G, Espin E, Armengol M, Plaja A, Perucho M, Imai K, Yamamoto H, Gebert JF, Diaz-Chico JC, Hofstra RM, Woerner SM, Seruca R, Schwartz S, Jr., Arango D 2007 High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability. *Oncogene* 26:308-311.
24. Kittles RA, Baffoe-Bonnie AB, Moses TY, Robbins CM, Ahaghotu C, Huusko P, Pettaway C, Vijayakumar S, Bennett J, Hoke G, Mason T, Weinrich S, Trent JM, Collins FS, Mousnes S, Bailey-Wilson J, Furbert-Harris P, Dunston G, Powell IJ, Carpten JD 2006 A common nonsense mutation in EphB2 is associated with prostate cancer risk in African American men with a positive family history. *J Med Genet* 43:507-511.
25. Oba SM, Wang YJ, Song JP, Li ZY, Kobayashi K, Tsugane S, Hamada GS, Tanaka M, Sugimura H 2001 Genomic structure and loss of heterozygosity of EPHB2 in colorectal cancer. *Cancer Lett* 164:97-104.
26. Song JH, Kim CJ, Cho YG, Kwak HJ, Nam SW, Yoo NJ, Lee JY, Park WS 2007 Genetic and epigenetic analysis of the EPHB2 gene in gastric cancers. *APMIS* 115:164-168.
27. Thorstensen L, Qvist H, Heim S, Liefers GJ, Nesland JM, Giercksky KE, Lothe RA 2000 Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2:514-522.
28. Zogopoulos G, Jorgensen C, Bacani J, Montpetit A, Lepage P, Ferretti V, Chad L, Selvarajah S, Zanke B, Hudson TJ, Pawson T, Gallinger S 2008 Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer. *PLoS One* 3:e2885.
29. Laiho P, Kokko A, Vanharanta S, Salovaara R, Sarmalkorpi H, Jarvinen H, Mecklin JP, Karttunen TJ, Tuppurainen K, Davalos V, Schwartz S, Jr., Arango D, Makinen MJ, Aaltonen LA 2007 Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene* 26:312-320.
30. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB 1996 Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821-9826.

31. Fu T, Li P, Wang H, He Y, Luo D, Zhang A, Tong W, Zhang L, Liu B, Hu C 2009 c-Rel is a transcriptional repressor of EPHB2 in colorectal cancer. *J Pathol* 219:103-113.
32. Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Mikami M, Taniguchi H, Miyamoto N, Adachi Y, Arimura Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y 2007 Genetic and epigenetic profiling in early colorectal tumors and prediction of invasive potential in pT1 (early invasive) colorectal cancers. *Carcinogenesis* 28:1364-1370.
33. Wu Q, Lind GE, Aasheim HC, Micci F, Silins I, Trope CG, Nesland JM, Lothe RA, Suo Z 2007 The EPH receptor Bs (EPHBs) promoters are unmethylated in colon and ovarian cancers. *Epigenetics* 2:237-243.
34. Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T 2004 Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 50:490-499.
35. Dopeso H, Mateo-Lozano S, Mazzolini R, Rodrigues P, Lagares-Tena L, Ceron J, Romero J, Esteves M, Landolfi S, Hernandez-Losa J, Castano J, Wilson AJ, Ramon y Cajal S, Mariadason JM, Schwartz S, Jr., Arango D 2009 The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 69:7430-7438.
36. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I 2001 Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 165:185-193.
37. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I 2001 Expression of receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 is associated with malignant potential in endometrial cancer. *Oncol Rep* 8:567-573.

Capítulo 6

La metilación conjunta de los genes SFRP1, 2 y 5 está asociada con una peor evolución clínica de las pacientes con cáncer de endometrio

Raquel Ramírez

Cristina Bilbao

Germán Rodríguez

Orlando Falcón

Laureano León

Nicolás Díaz-Chico

Juan Carlos Díaz Chico

Resumen

La ruta Wnt juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y en la apoptosis celular, en los tejidos adultos. En varios tipos tumorales se observa una inapropiada activación de esta vía de señalización debido a alteraciones en algunos de sus miembros. Los genes SFRPs son reguladores negativos de esta ruta y se consideran supresores de tumores. A menudo sufren inactivación epigenética en tumores gastrointestinales y de mama entre otros, y están implicados en la carcinogénesis y en la progresión de la enfermedad. En este trabajo, evaluamos mediante MSP, el estado de metilación de los promotores de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5, en una serie de 203 carcinomas de endometrio (CE) y 40 muestras de endometrio sano, usadas como tejido control (TC). Estudiamos su relación con variables clínico-patológicas y moleculares y, con la evolución clínica de las pacientes. Los porcentajes de metilación de los inhibidores Wnt en el grupo de tumores fue de un 33,5%, 51,5%, 24,4% y 52%, y en el TC de un 5%, 10%, 15% y 17,5% para SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5, respectivamente. Los CE mostraron una frecuencia de metilación significativamente más elevada que el TC ($p < 0,0001$), excepto para el gen SFRP4, para el que no se observaron diferencias en ambos grupos. No se encontró relación entre la metilación de los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5, de forma individualizada, y las variables clínico-patológicas. No obstante, los tumores con inestabilidad microsatélite (MSI) mostraban a menudo los genes SFRP1 y SFRP5 metilados ($p = 0,042$ y $p < 0,0001$, respectivamente), y aquellos con el gen SFRP1 metilado tenían frecuentemente el gen β -Catenina mutado ($p = 0,048$) y el APC metilado ($p = 0,007$). No se observó ninguna otra relación con las características moleculares de los tumores, ni con la supervivencia de las pacientes. La metilación conjunta de los genes SFRP1/2/5 se asoció con estadios avanzados ($p = 0,022$), infiltración miometrial ($p = 0,002$), invasión vascular ($p = 0,019$) y con una menor supervivencia específica del cáncer ($p = 0,015$) en el análisis univariante. Estos datos ponen de manifiesto que la metilación conjunta de los genes SFRPs tiene un posible papel como biomarcador epigenético en CE.

Introducción

La ruta Wnt regula diferentes procesos celulares implicados en el desarrollo y en el mantenimiento de los tejidos adultos. La familia SFRP (*Secreted frizzled-related proteins*) está formada por cinco glicoproteínas (SFRP1-5), identificadas como antagonistas de esta vía de señalización celular. A través de su dominio amino terminal, rico en cisteínas (CRD), las proteínas SFRP interactúan con los ligandos Wnt impidiendo su unión al receptor Fz (*Frizzled*), o bien, se unen directamente al receptor Fz formando un complejo no funcional. Como consecuencia de ello, la β -Catenina intracelular es degradada, evitando su acumulación en el núcleo de la célula e impidiendo su unión al complejo de transcripción TCF/LEF (*T-Cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*). De esta manera, la expresión de genes dependientes del complejo TCF/LEF se ve inhibida (1).

En varios tipos de cáncer los miembros de la ruta Wnt se encuentran genética y/o epigenéticamente alterados, causando una inapropiada activación de esta vía de señalización (2-4). El silenciamiento, por metilación del promotor de los genes SFRPs, excepto para el SFRP3 que no presenta islas CpG en su región promotora, es frecuente en tumores gastrointestinales y de mama, entre otros (5-9). En cáncer colorrectal, esta alteración epigenética ocurre en etapas iniciales, durante la transición de adenoma a carcinoma, lo que indica que debe estar implicado en la carcinogénesis (6, 8). Por esta razón, los SFRPs son considerados genes supresores de tumores y su pérdida favorece la progresión tumoral (10). En el CE, se han observado niveles bajos de expresión de SFRP1 y SFRP4, que en el caso del SFRP1 se ha asociado con la metilación de su promotor (11).

Este trabajo analiza el silenciamiento epigenético, por metilación del promotor de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5, y su relación con la alteración de otros miembros de la ruta Wnt, como β -Catenina, APC y E-Cadherina. Se estudia también, su asociación con otras variables clínico-patológicas y moleculares, así como su implicación en la progresión de la enfermedad.

Material y métodos

Análisis del estado de metilación de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5

El estado de metilación de los promotores de los genes SFRPs se determinó en nuestra serie de 203 CE y 40 TC. Después del tratamiento con bisulfito sódico, la MSP fue la metodología usada para este análisis (12). Se usaron las condiciones de amplificación, ligeramente modificadas, y los primers descritos en la literatura (Ver anexo I, Tabla 2) (8).

Los productos de MSP se corrieron en un gel de agarosa al 2% durante 45min a 100 voltios. Posteriormente se observaron y fotografiaron en un transiluminador con luz ultravioleta (*ChemiDoc XRS+*, BioRad).

Análisis estadístico

La relación entre el estado de metilación de los genes SFRPs y las variables clínico-patológicas y moleculares se llevó a cabo usando los test χ^2 y Fisher (dependiendo del tamaño de la muestra) para aquellas variables categóricas y el test de *t*-Student para la edad de diagnóstico de las pacientes. El tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la fecha de la muerte, a causa de la enfermedad, fue definido como la supervivencia específica al cáncer. Las curvas de supervivencia se construyeron usando el método de Kaplan Meier y comparadas con el test Log-rank. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los niveles de significación bilateral eran $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago).

Resultados

El estado de metilación de los genes SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5

Los porcentajes de metilación de los promotores de los genes SFRPs fueron de un 33,5%, 51,5%, 24,4% y 52% en los CE y de un 5%, 10%, 15% y 17,5% en el TC para SFRP1, SFRP2, SFRP4 y SFRP5, respectivamente (Tabla 1). La frecuencia de metilación fue más elevada en los tumores vs. el grupo control ($p < 0,0001$), excepto para el gen SFRP4, para el que no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 1). La Figura 1 muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos para cada uno de los genes, en el grupo de tumores analizados.

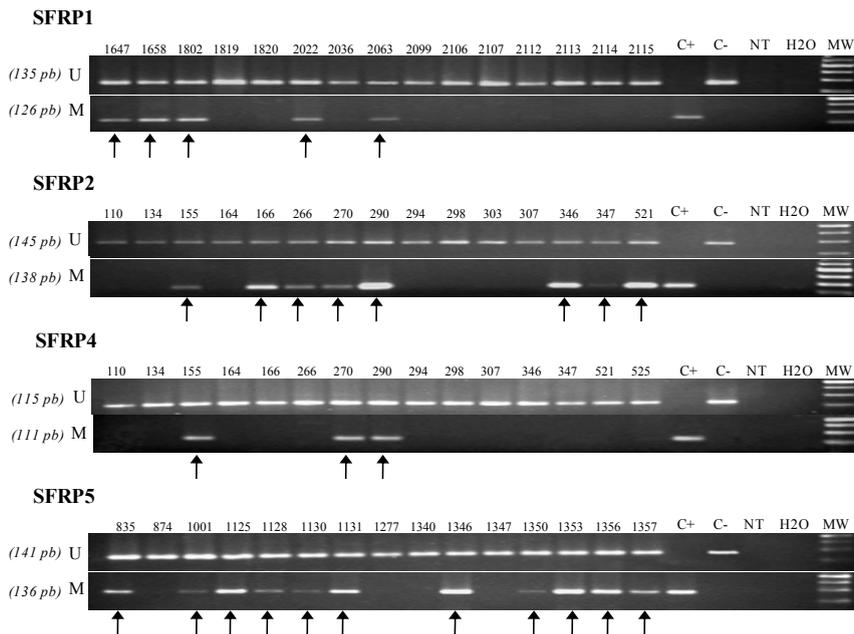


Figura 1. Resultados representativos del estado de metilación de los promotores de los genes SFRPs en tumores de endometrio. U: ADN amplificado no metilado; M: ADN amplificado metilado; C+: control positivo para metilación; C-: control negativo para metilación; NT: ADN control no tratado con bisulfito sódico; H₂O: control de la MSP; MW: marcador de peso molecular; *pb*: pares de bases. Las flechas indican los tumores metilados. Se muestra el código de referencia de las muestras tumorales.

Tabla 1. Frecuencias de metilación de los promotores de los genes SFRPs en endometrio (Tumor vs. Control)

Gen	Risinger y Col; 2005 (MSP) (Ref. 11)		Suehiro y Col; 2008 (MSP y COBRA) (Ref. 36)		Nuestra serie (MSP)		P-valor				
	Tumor		Control		Tumor			Control			
	N	n (%)	N	n (%)	N	n (%)		N	n (%)		
SFRP1	28	10 (35,7)	101	16 (15,8)	27	2 (7,4)	201	67 (33,5)	40	2 (5,0)	<0,0001
SFRP2			105	54 (51,4)	25	4 (16,0)	202	104 (51,5)	40	4 (10,0)	<0,0001
SFRP4			103	5 (4,9)	27	0 (0,0)	201	49 (24,4)	40	6 (15,0)	0,2782
SFRP5			105	50 (47,6)	22	4 (18,2)	202	105 (52,0)	40	7 (17,5)	<0,0001

Abreviaturas: MSP= *Methylation specific PCR*, COBRA= *Combined bisulfite restriction analysis*, N= número de casos totales, n= número de casos metilados, Ref.= referencia.

Relación entre el estado de metilación de los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5, y las variables clínico-patológicas, moleculares y la supervivencia

No se encontró relación entre la metilación de los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5, de forma individualizada, y las variables clínico-patológicas, como la edad de las pacientes, el estadio, el grado de diferenciación, la infiltración miometrial, la invasión vascular o el tipo histológico (endometriode o no endometriode) de los tumores (Tabla 2).

El estado metilado de los genes SFRP1 y SFRP5 se relacionó con el estado MSI de los CE ($p=0,042$ y $p=0,000$, respectivamente). La alteración epigenética del gen SFRP1 fue más frecuente en aquellos tumores con el gen β -Catenina mutado ($p=0,048$) y el gen APC metilado ($p=0,007$). No se observó ninguna otra relación con las características moleculares de los tumores (Tabla 2).

En el análisis univariante, la metilación de estos genes tampoco se relacionó con un cambio significativo en la supervivencia específica del cáncer ($p=0,601$, $p=0,241$, $p=0,585$, para SFRP1, SFRP2 y SFRP5, respectivamente).

Relación entre la metilación conjunta de los genes SFRP1/2/5, y las variables clínico-patológicas, moleculares y la supervivencia

Para conocer el efecto del silenciamiento conjunto de los genes SFRP1/2/5, se dividieron las muestras tumorales en dos grupos: uno denominado metilado (M) donde se incluyeron las que mostraban estos tres genes metilados, y otro grupo con el resto, denominado no metilado (U).

Los tumores M mostraron estadios avanzados ($p=0,022$), infiltración miometrial ($p=0,002$) e invasión vascular ($p=0,019$), además de una asociación positiva, marginalmente significativa, con la edad de las pacientes ($p=0,056$). Sin embargo, la metilación conjunta no se relacionó con ninguna de las variables moleculares estudiadas, como el estado MSI, la ploidía o las alteraciones genéticas y epigenéticas de miembros de la ruta Wnt (β -Catenina, APC y E-Cadherina) (Tabla 3).

El análisis univariante de supervivencia mostró que las pacientes con metilación conjunta de los genes SFRP1/2/5 tenían una peor evolución clínica de la

enfermedad ($p= 0,015$) (Fig. 2). El bajo número de eventos ($n=10$) no nos permitió un análisis multivariante robusto. Se hace necesario ampliar el número de casos de nuestra serie para confirmar su papel como marcador pronóstico independiente

Tabla 2. Relación entre las características clínico-patológicas y moleculares, y la metilación de los genes SFRPs

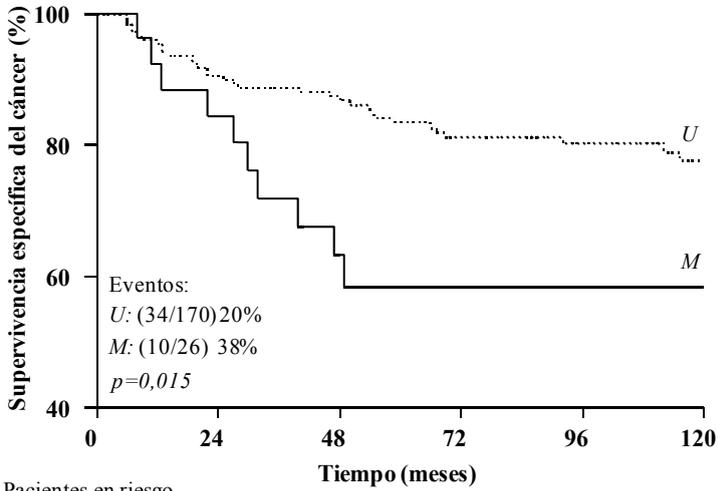
Características	N	<i>SFRP1</i> metilado		<i>SFRP2</i> metilado		<i>SFRP5</i> metilado	
		n (%)	<i>P</i> -valor	n (%)	<i>P</i> -valor	n (%)	<i>P</i> -valor
Edad (años) media \pm DS							
U		63 \pm 11		64 \pm 9		64 \pm 11	
M		66 \pm 9	0,086	64 \pm 10	0,577	64 \pm 10	0,822
Estadio							
I	138	47 (34)		69 (50)		70 (51)	
II	32	10 (31)	0,790	17 (53)	0,386	15 (46)	0,290
III	31	10 (32)		18 (58)		20 (65)	
Grado							
1	96	34 (36)		49 (51)		50 (52)	
2	54	16 (30)	0,631	28 (52)	0,912	25 (46)	0,626
3	52	17 (33)		27 (52)		30 (58)	
Inf. Miometrial							
<50%	146	48 (33)		71 (48)		71 (48)	
\geq 50%	55	19 (34)	0,842	33 (60)	0,140	34 (62)	0,088
Inv. Vascular							
No	149	50 (34)		74 (49)		74 (50)	
Sí	52	17 (33)	0,909	30 (58)	0,300	31 (59)	0,271
Tipo histológico							
Endometriode	179	63 (35)		95 (53)		93 (52)	
No endometriode	23	4 (17)	0,102	9 (39)	0,209	12 (52)	0,984
Inestabilidad microsátélite							
MSS	161	48 (30)		79 (49)		73 (45)	
MSI	41	19 (46)	0,048	25 (61)	0,174	32 (78)	0,000
Ploidía							
Diploide	151	52 (34)		81 (54)		81 (53)	
Aneuploide	37	8 (22)	0,159	16 (43)	0,258	17 (46)	0,424
β -Catenina							
No mutado	169	51 (30)		88 (52)		89 (53)	
Mutado	33	16 (50)	0,029	16 (49)	0,707	16 (48)	0,661
APC							
No metilado	131	35 (27)		70 (53)		64 (49)	
Metilado	69	32 (46)	0,005	34 (49)	0,577	41 (60)	0,126
E-Cadherina							
No metilado	172	57 (33)		87 (51)		87 (51)	
Metilado	28	10 (36)	0,789	17 (61)	0,321	18 (67)	0,121

Abreviaturas: N= número de casos totale, n= número de casos metilados, U= no metilado, M= metilado, DS= desviación standard, MSS= estables, MSI= inestables.

Tabla 3. Relación entre las características clínico-patológicas y moleculares y, la metilación conjunta de SFRP1/2/5

Características	N	SFRP1/2/5 metilados	
		n (%)	P-valor
Edad (años) media \pm DS			
U		64 \pm 10	0,056
M		67 \pm 7	
Estadio			
I	137	14 (10)	0,022
II	16	5 (16)	
III	26	8 (26)	
Grado			
1	94	11 (12)	0,677
2	17	9 (17)	
3	52	7 (13)	
Inf. Miometrial			
<50%	145	13 (9)	0,002
\geq 50%	55	14 (25)	
Inv. Vascular			
No	148	15 (10)	0,019
Si	52	12 (23)	
Tipo histológico			
Endometrioides	177	26 (15)	0,326
No endometrioides	23	1 (4)	
Inestabilidad microsatélite			
MSS	159	18 (11)	0,120
MSI	41	9 (22)	
Ploidía			
Diploide	151	21 (14)	0,259
Aneuploide	36	2 (5)	
β -Catenina			
No mutado	169	22 (13)	0,579
Mutado	31	5 (16)	
APC			
No metilado	131	15 (11)	0,276
Metilado	68	12 (31)	
E-Cadherina			
No metilado	172	22 (13)	0,420
Metilado	27	5 (18)	

Abreviaturas: N= número de casos totales, n= número de casos metilados, U= no metilado, M= metilado, DS= desviación standard, MSS= estables, MSI= inestables.



Pacientes en riesgo

<i>U</i>	170	149	131	109	86	50
<i>M</i>	26	22	14	10	8	5

Figura 2. Análisis de Kaplan-Meier para la supervivencia específica del cáncer basada en el estado de metilación conjunto de los SFRP1/2/5. *U*: no metilado, *M*: metilado.

Discusión

Los tumores de endometrio, mayoritariamente aquellos con una histología endometriode, muestran altos niveles de β -catenina en el núcleo celular, debido principalmente a mutaciones activantes del gen (13, 14). Estas están presentes en un 14-44% de los CE, sin embargo, no existe una completa relación causa-efecto entre las mutaciones y la acumulación nuclear (4, 15-20).

Aproximadamente el 25% de los CE tienen una alta actividad del complejo β -catenina/TCF/LEF en ausencia de mutaciones en β -catenina (15). En tumores de colon, esta discordancia puede ser explicada por la inactivación genética y/o epigenética del gen APC. La situación en CE es distinta, la frecuencia de mutaciones de algunos de los miembros de la ruta Wnt, como APC, Dishevelled, Axina 1 y 2, TCF4, GS3K β , E-Cadherina o γ -Catenina es muy baja o ausente (4, 20-27). Aunque se ha descrito pérdida de heterocigocidad del APC (<25%) (4, 22, 23) e inactivación por metilación del promotor del APC (22-47%) y E-Cadherina (0-22%), no se ha podido demostrar su relación con el aumento nuclear de β -Catenina en las células tumorales endometriales (2, 4, 28-32). Esto indica que otros mecanismos como la sobre-expresión de los ligandos y receptores, y/o la pérdida de los inhibidores Wnt podrían estar implicados en el aumento de los niveles nucleares de β -Catenina y en la carcinogénesis endometrial.

Tanto la metilación del ADN como la desacetilación de histonas inhiben la transcripción génica. En el caso de los genes SFRPs, la metilación del promotor parece jugar un papel dominante (6). Varios tipos de cáncer muestran una represión transcripcional de los genes SFRPs, considerándolos genes supresores de tumores (10). Nuestro estudio, muestra que la metilación de los SFRP1, SFRP2 y SFRP5 ocurre frecuentemente en CE. Esto coincide con los datos previamente publicados por Shuehiro y col; y con lo que ocurre en otros tipos tumorales como los de colon, hepáticos, de vejiga o pulmón (6, 8, 33-37).

No se observan diferencias significativas en los niveles de metilación del gen SFRP4, cuando se compara el tejido tumoral y el sano. Se ha descrito que los sarcomas estromales de endometrio muestran una reducción en los niveles de esta proteína que se asocia con un aumento de los niveles nucleares de β -Catenina y con

las formas tumorales más agresivas (41). Los CE endometrioides con MSI presentan también niveles reducidos, en comparación con tumores estables y con el epitelio del endometrio sano (11). Sin embargo, no se conoce el mecanismo que produce esta disminución en los niveles de expresión. Nuestros resultados indican que el silenciamiento epigenético, por metilación del promotor, no está implicado en la desregulación del SFRP4 en los CE.

El papel de los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5 es más importante que el de SFRP3 y 4 en la regulación de la ruta Wnt en cáncer de colon (6, 8). Esto debe ocurrir también en CE, pues la frecuencia de metilación de SFRP1, SFRP2 y SFRP5 es significativamente más elevada en nuestra serie tumoral que en el grupo control. Nosotros observamos una asociación directa entre el estado MSI y la metilación de los genes SFRP1 y SFRP5, hallazgo que coincide con lo descrito por Risinger y col (11). Estos datos apoyan la idea de que los CE con MSI deben tener una señalización Wnt más activa que los tumores estables.

Se ha demostrado que la alteración epigenética de los genes SFRPs es un evento temprano en la progresión del cáncer de colon, que ocurre principalmente en los tumores con algún miembro de la ruta Wnt alterado, como aquellos con mutaciones inactivantes del gen APC (8). En CE hemos observado que la metilación de SFRP1 es frecuente en tumores con β -Catenina mutado y/o APC metilado. Es posible que la inactivación de SFRP1 complemente las alteraciones de los genes β -Catenina y APC, favoreciendo la anormal activación Wnt y la evolución del CE como ocurre en cáncer de colon (8).

Si bien, en los tumores de mama y gástrico se ha observado una asociación positiva entre la disminución de la expresión de SFRP1 y SFRP5, y la metástasis y peor pronóstico de las pacientes, en otros tipos tumorales esto no ha podido ser demostrado (9, 43-48). En CE la metilación de SFRP1, SFRP2 y SFRP5 no se asocia con variables clínico-patológicas ni con la evolución clínica de los tumores cuando se analiza de forma individualizada. Sin embargo, la metilación conjunta (SFRP1/2/5) está presente, de forma significativa, en aquellos tumores que muestran estadios avanzados, infiltración miometrial e invasión vascular, y además se asocia con una menor supervivencia específica del cáncer en el análisis univariante.

Nuestros datos sugieren que la inactivación epigenética conjunta de estos miembros de la familia SFRP hace que los CE tengan un peor comportamiento clínico.

Conclusión

La inactivación epigenética de los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5 es frecuente en CE. No existen diferencias significativas en el estado de metilación del SFRP4 entre los grupos, tumoral y control.

La alteración epigenética de los SFRP1, SFRP2 y SFRP5, de forma individualizada, no se relaciona con las variables clínico-patológicas estudiadas, ni pronostica la evolución clínica de las pacientes con CE. Sin embargo, la metilación conjunta de los SFRP1/2/5 se asocia con el estadio más avanzado, la infiltración miometrial y la invasión vascular, y con una peor evolución clínica de la enfermedad, tal y como muestra el análisis univariante de supervivencia. Futuros estudios serían necesarios para validar estos datos y conocer la utilidad pronóstica de estos genes.

Referencias

1. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J 2008 Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121:737-746.
2. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D 2006 Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol Rep* 16:1189-1196.
3. Klaus A, Birchmeier W 2008 Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8:387-398.
4. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matias-Guiu X, Esteller M, Palacios J 2002 Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21:7981-7990.
5. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y 2007 Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26:4699-4713.
6. Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH 2006 Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 12:7113-7117.
7. Suzuki H, Toyota M, Carraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T 2008 Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 98:1147-1156.
8. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB 2004 Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36:417-422.
9. Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E 2008 Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* 29:991-998.
10. Rubin JS, Barshishat-Kupper M, Feroze-Merzoug F, Xi ZF 2006 Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Front Biosci* 11:2093-2105.
11. Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Aprelikova O, Litz T, Umar A, Berchuck A, Barrett JC 2005 Gene expression profiling of microsatellite unstable and microsatellite stable endometrial cancers indicates distinct pathways of aberrant signaling. *Cancer Res* 65:5031-5037.
12. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB 1996 Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821-9826.
13. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H 1997 Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275:1784-1787.
14. Saegusa M, Okayasu I 2001 Frequent nuclear beta-catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *J Pathol* 194:59-67.

15. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S 1998 Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 58:3526-3528.
16. Kobayashi K, Sagae S, Nishioka Y, Tokino T, Kudo R 1999 Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 90:55-59.
17. Machin P, Catusus L, Pons C, Munoz J, Matias-Guiu X, Prat J 2002 CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum Pathol* 33:206-212.
18. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M 1999 Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 59:3346-3351.
19. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I 2001 beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer* 84:209-217.
20. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH 2000 Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 13:1066-1071.
21. Duval A, Iacopetta B, Ranzani GN, Lothe RA, Thomas G, Hamelin R 1999 Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF-4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability. *Oncogene* 18:6806-6809.
22. Fujino T, Risinger JI, Collins NK, Liu FS, Nishii H, Takahashi H, Westphal EM, Barrett JC, Sasaki H, Kohler MF, et al. 1994 Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res* 54:4294-4298.
23. Jones MH, Koi S, Fujimoto I, Hasumi K, Kato K, Nakamura Y 1994 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* 9:119-123.
24. Lin YM, Kato T, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y 2000 Identification of novel polymorphisms in the AXIN1⁺⁺ and CDX-2 genes. *J Hum Genet* 45:254-256.
25. Nei H, Saito T, Yamasaki H, Mizumoto H, Ito E, Kudo R 1999 Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium. *Mol Carcinog* 25:207-218.
26. Palacios J, Catusus L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Gamallo C 2001 Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch* 438:464-469.
27. Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R 2000 Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 28:443-453.
28. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG 2001 A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229.
29. Ignatov A, Bischoff J, Ignatov T, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. *Cancer Sci* 101:321-327.
30. Pijnenborg JM, Kisters N, van Engeland M, Dunselman GA, de Haan J, de Goeij AF, Groothuis PG 2004 APC, beta-catenin, and E-cadherin and the development of recurrent endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 14:947-956.

31. Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R 2003 Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Cancer* 97:1002-1009.
32. Zysman M, Saka A, Millar A, Knight J, Chapman W, Bapat B 2002 Methylation of adenomatous polyposis coli in endometrial cancer occurs more frequently in tumors with microsatellite instability phenotype. *Cancer Res* 62:3663-3666.
33. Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG 2008 Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 29:895-904.
34. Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, Nelson HH, Kelsey KT 2005 Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res* 65:7081-7085.
35. Shih YL, Hsieh CB, Lai HC, Yan MD, Hsieh TY, Chao YC, Lin YW 2007 SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 121:1028-1035.
36. Suehiro Y, Okada T, Anno K, Okayama N, Ueno K, Hiura M, Nakamura M, Kondo T, Oga A, Kawachi S, Hirabayashi K, Numa F, Ito T, Saito T, Sasaki K, Hinoda Y 2008 Aneuploidy predicts outcome in patients with endometrial carcinoma and is related to lack of CDH13 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 14:3354-3361.
37. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y 2008 Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 43:378-389.
38. Jones SE, Jomary C 2002 Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24:811-820.
39. Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown LF, Tognazzi K, Sokol SY, Kocher O 1999 Differential expression of frpHE: a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. *Lab Invest* 79:439-447.
40. Carmon KS, Loose DS 2008 Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res* 6:1017-1028.
41. Hrzenjak A, Tippel M, Kremser ML, Strohmeier B, Guelly C, Neumeister D, Lax S, Moinfar F, Tabrizi AD, Isadi-Moud N, Zatloukal K, Denk H 2004 Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas. *J Pathol* 204:19-27.
42. Cheng YY, Yu J, Wong YP, Man EP, To KF, Jin VX, Li J, Tao Q, Sung JJ, Chan FK, Leung WK 2007 Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br J Cancer* 97:895-901.
43. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy RG, Byrd P, Chughtai S, Wallis Y, Matthews GM, Morton DG 2004 The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 64:883-888.
44. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, Han ZG 2007 Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 7:126.
45. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M, Igawa M, Dahiya R 2006 Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res* 12:6989-6997.

46. Veeck J, Niederacher D, An H, Klopfick E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Durst M, Kristiansen G, Huszka C, Knuchel R, Dahl E 2006 Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25:3479-3488.
47. Veeck J, Noetzel E, Bektas N, Jost E, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E 2008 Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Mol Cancer* 7:83.
48. Zhao CH, Bu XM, Zhang N 2007 Hypermethylation and aberrant expression of Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 13:2214-2217.

Capítulo 7

La metilación del gen PITX2 es un marcador de peor pronóstico en los tumores de endometrio con un contenido diploide de ADN

Raquel Ramírez

Ruymán Santana

Rudolf Napieralski

Germán Rodríguez

Anieta M. Sieuwerts

Leandro Fernández

Cristina Bilbao

Orlando Falcón

Laureano León

Manfred Schmitt

John W.M. Martens

John A. Foekens

Nicolás Díaz-Chico

Juan Carlos Díaz Chico

Resumen

PITX2 (*Paired-like homeodomain 2*) es un factor de transcripción, miembro de la familia RIEG/PITX homeobox, que regula la diferenciación de la hipófisis y el establecimiento de una adecuada asimetría en la organogénesis durante el desarrollo embrionario. El estado de metilación de su promotor P2 es un marcador pronóstico validado en pacientes con cáncer de mama y próstata. El objetivo de este estudio fue determinar la posible asociación entre el estado de metilación de PITX2 con las variables clínico-patológicas y moleculares, y el comportamiento clínico de las pacientes con carcinoma de endometrio (CE). Los niveles de metilación del promotor P2 de PITX2 se estimaron por QM-PCR (*Quantitative MethylLight real time Polymerase Chain Reaction*), en una serie de 203 muestras de CE y 40 de endometrio sano usadas como tejido control (TC). Tomando la metilación del PITX2 como una variable continua, se observó que el nivel de metilación en los CE fue significativamente más elevado que en el TC ($p=0,03$). Dado que el valor del cuartil más alto en la serie tumoral (6,57%) superó el valor de metilación más elevado en TC (5,96%), se categorizó esta variable en dos grupos denominados: de bajo (<6,6%) y de alto nivel de metilación ($\geq 6,6\%$). No se encontró ninguna asociación entre el estado de metilación del PITX2 y las variables clínico-patológicas y moleculares estudiadas, excepto una asociación positiva con la inestabilidad microsatélite (MSI) ($p=0,006$). No obstante, aquellas pacientes con CE, un alto nivel de metilación de PITX2 y un contenido diploide de ADN tenían una peor evolución clínica de la enfermedad tanto en el análisis univariante como multivariante de supervivencia ($p=0,007$; HR: 1,60; 95% CI: 1,02-2,53; $p=0,04$, respectivamente). Este es el primer trabajo que estudia la alteración epigenética de PITX2 en tumores de endometrio, muestra su relación con el estado MSI y su posible utilidad pronóstica en pacientes con CE con un contenido diploide de ADN.

Introducción

Los genes homeobox juegan un importante papel controlando el destino celular en el desarrollo embrionario, y la expresión específica de genes en adultos. Entre ellos se encuentra la familia RIEG/PITX, formada por tres genes PITX1, 2 y 3 (1). El gen PITX2 (*paired-like homeodomain 2*), también llamado RIEG1 o ARP1, está evolutivamente conservado, en humanos se localiza en el cromosoma 4q25 y codifica para cuatro isoformas (PITX2A, B, C y D). Su expresión está bajo el control de dos promotores (P1 y P2). A partir de P2 se generan PITX2A y B, y a partir de P1 PITX2C y D (2-5) (Fig 5-1). Estas proteínas actúan como factores de transcripción y están implicadas en numerosos procesos: proliferación y diferenciación celular, hematopoyesis y en la organogénesis (4, 6-11).

La ruta Wnt/ β -catenina regula la expresión de PITX2A y B, que parece estar relacionada con el desarrollo normal de la hipófisis (8). Pero PITX2 no es solo un gen diana de la ruta Wnt/ β -catenina, sino que además coopera en esta vía de señalización, formando un complejo con la β -catenina y LEF/TCF. Así, regula la proliferación celular y establece un proceso de retroalimentación positiva. Es capaz también, de inducir directamente la expresión de genes reguladores del ciclo celular como las ciclinas D1/D2 y de otros factores de transcripción como *c-Myc* (8, 12-14).

En humanos, las mutaciones de este gen causan el síndrome de Axenfeld-Rieger, una alteración autosómica dominante que produce principalmente malformaciones faciales, oculares y dentales (5, 15, 16). No se ha encontrado ninguna asociación de este síndrome con el desarrollo de tumores. Aunque sí parece existir una alteración en la expresión de PITX2 en diferentes adenomas hipofisarios (17).

En líneas celulares de cáncer de mama se ha observado que la metilación del promotor P2 de PITX2 inhibe la expresión de las isoformas PITX2A y B, sin embargo se desconoce si esto ocurre también en los tumores (18). A pesar de no conocerse el papel que juega el PITX2 en la carcinogénesis y en la progresión tumoral, estudios recientes han demostrado que la metilación del promotor P2 es un marcador de peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama y próstata (18-22).

El propósito de este estudio fue determinar la posible relación entre los niveles de metilación del promotor P2 del gen PITX2 con las variables clínico-patológicas y moleculares, y el comportamiento clínico de las pacientes con CE.

Material y métodos

Las pacientes

Este estudio retrospectivo se realizó en nuestra serie de 203 muestras de CE y 40 de endometrio sano, usadas como tejido control (TC), cuyas características se detallan en el capítulo 5 de este manuscrito.

Determinación del estado de metilación del promotor del gen PITX2

El ADN modificado con bisulfito sódico se usó para cuantificar el nivel de metilación del promotor P2 del gen PITX2 por QM-PCR (*Quantitative MethyLight real time-Polymerase Chain Reaction*), en un *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* con *Sequence detection software v1.2.3* (Applied Biosystems)(23). Cada reacción contenía 1x de *EpiTect MethyLight Master Mix* (QIAGEN), 1x de *EpiTect MethyLight Assay: Hs PITX2* (QIAGEN) y 100ng de ADN genómico modificado, en un volumen final de reacción de 20µl. Los ciclos de PCR se iniciaron con una desnaturalización de 95°C durante 5 minutos seguida de 45 ciclos de, 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. En un experimento inicial, la especificidad de la prueba se midió con el kit *EpiTect PCR Control DNA Set* (QIAGEN). Este kit contiene ADN humano metilado y no metilado, ambos tratados con bisulfito sódico, y ADN humano sin modificar. Además, en cada una de las carreras de PCR se incluyó una reacción con ADN no modificado y otra sin ADN, como control de la contaminación. Cada muestra se analizó por triplicado.

El porcentaje de metilación o la abundancia relativa de copias de ADN metilado se determinó usando los valores Ct (*cycles thrershold value*), basados en la señal de fluorescencia de cada sonda (Ct_m y Ct_u para la sonda M y U, respectivamente), y aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Metilación (\%)} = 100 \left[\frac{100}{1 + 2^{(Ct_m - Ct_u)}} \right]$$

La media de los triplicados determinó el valor final del porcentaje de metilación de la muestra (18).

Análisis estadístico

Se usó el test Mann-Whitney para comparar los grupos tumor/control, usando el porcentaje de metilación de las muestras como variable continua. Para dicotomizar esta variable se tomó el valor del percentil 75 como punto de corte. La relación entre el estado de metilación del PITX2, como variable dicotómica, y las variables clínico-patológicas y moleculares se llevó a cabo usando los test χ^2 y Fisher (dependiendo del tamaño de la muestra) para aquellas variables categóricas y el test de *t*-Student para las variables continuas con una distribución normal. La supervivencia específica del cáncer corresponde al tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la fecha de la muerte a causa de la enfermedad. Las curvas de supervivencia se construyeron usando el método de Kaplan Meier y comparadas con el test Log-rank. Para determinar el Hazard ratios (HR) y su intervalo de confianza (95% CI), en el análisis univariante y multivariante, se usó la regresión de Cox. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los niveles de significación bilateral eran $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago).

Resultados

El nivel de metilación del promotor del gen PITX2 en el grupo de tumores fue significativamente más elevado que en el grupo control [mediana (rango); CE: 1,93 (0-78) vs. TC: 1,49 (0-6)] ($p=0,03$) (Fig. 1).

Dado que el porcentaje de metilación que corresponde al percentil 75 en el grupo tumor (6,57%) superó el valor de metilación más alto del grupo control

(5,96%), las pacientes de los tres primeros cuartiles se agruparon en un grupo denominado de bajo nivel de metilación (Bajo $<6.6\%$) y se compararon con el grupo de pacientes del cuartil más alto (Alto $\geq 6.6\%$). No se encontró ninguna relación entre un alto nivel de metilación del promotor del PITX2 y las variables clínico-patológicas y moleculares, excepto una asociación positiva con el estado MSI ($p=0,006$) (Tabla 1).

El análisis univariante mostró que el estado de metilación de este gen no modificaba el tiempo de supervivencia específica del cáncer en el total de la serie ($p=0,142$). En cambio, los tumores con niveles altos de metilación del PITX2 y un contenido diploide de ADN tenían una peor evolución clínica ($p=0,007$) (Fig. 2).

Para determinar si el nivel de metilación de PITX2 poseía un valor pronóstico independiente en este grupo de pacientes, se realizó un análisis multivariante. Se diseñó un modelo básico, donde se incluyeron los factores pronósticos tradicionales para el CE con una significancia $\leq 0,1$ en el análisis univariante, al que se le añadió el estado de metilación del PITX2. En este análisis se observó que el estado de metilación del PITX2 persistía como variable independiente en el modelo de supervivencia (HR: 1,60; 95%CI: 1,02-2,53; $p=0,042$) (Tabla 2).

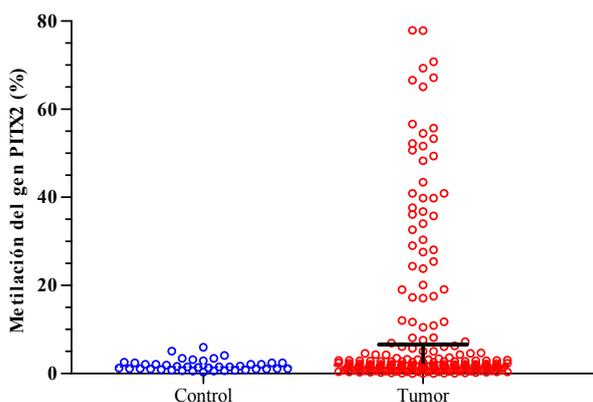
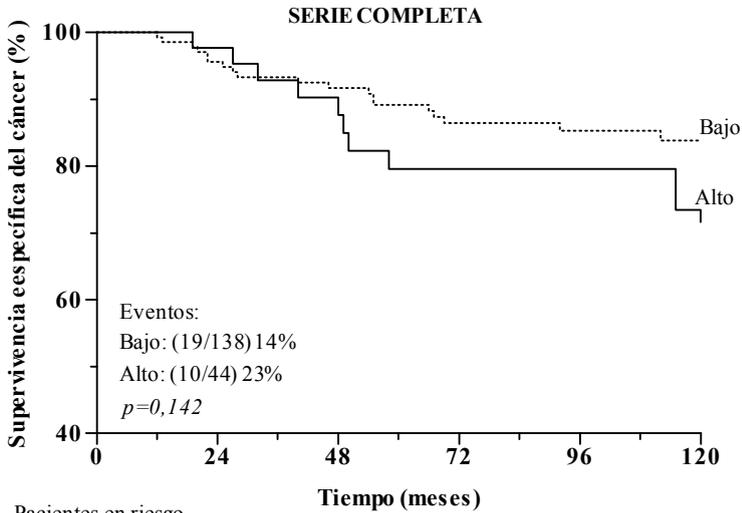


Figura 1. Distribución del estado de metilación del promotor del gen PITX2 en el grupo Control vs. Tumor. Cada círculo representa una muestra. La línea horizontal es el valor del percentil 75 (6,6%).

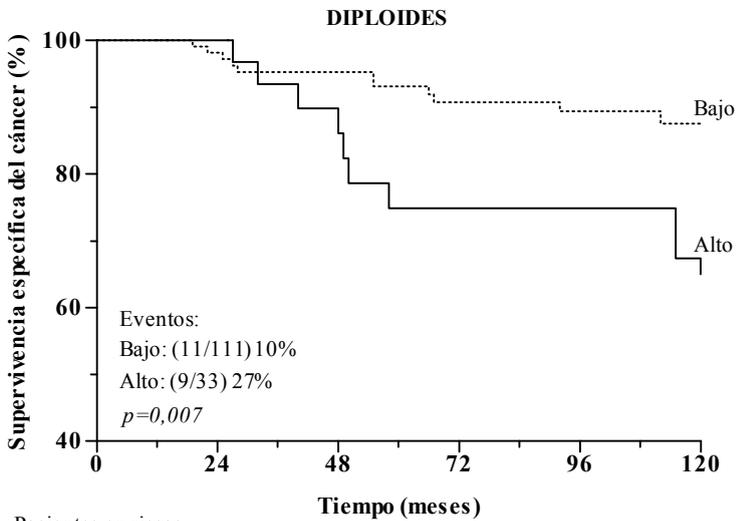
Tabla 1. Relación entre las características clínico-patológicas y moleculares y, el nivel de metilación de PITX2

Características	N	Metilación PITX2 (Alto $\geq 6,6\%$)	
		n (%)	P-valor
Edad (años), media \pm DS			
<i>Bajo</i>		64 \pm 10	0,183
<i>Alto</i>		66 \pm 9,5	
Estadio			
I	137	32 (23,4)	0,242
II	33	7 (21,2)	
III	31	11 (35,5)	
Grado			
1	95	20 (21,1)	0,188
2	54	14 (25,9)	
3	52	16 (30,8)	
Inf. Miometrial			
<50%	146	35 (24)	0,630
$\geq 50\%$	55	15 (27,3)	
Inv. Vascular			
No	148	34 (23)	0,298
Sí	53	16 (30,2)	
Tipo histológico			
Endometrioide	178	43 (24,2)	0,513
No endometrioide	23	7 (30,4)	
Inestabilidad microsátélite			
MSS	160	33 (20,6)	0,006
MSI	41	17 (41,5)	
Ploidía			
Diploide	152	34 (22,4)	0,492
Aneuploide	36	10 (27,8)	
β -Catenina			
No mutado	169	40 (24)	0,364
Mutado	32	10 (31)	
APC			
No metilado	134	32 (24)	0,929
Metilado	68	17 (25)	
E-Cadherina			
No metilado	172	45 (26)	0,204
Metilado	27	4 (15)	

Abreviaturas: N= número de casos totales, n= número de casos metilados, DS= desviación *standard*, Bajo= tumores con niveles de metilación <6,6%, Alto= tumores con niveles de metilación $\geq 6,6\%$, MSS= estables, MSI= inestables.



Pacientes en riesgo		Tiempo (meses)					
	0	24	48	72	96	120	
Bajo	138	127	112	94	73	45	
Alto	44	43	34	26	22	11	



Pacientes en riesgo		Tiempo (meses)					
	0	24	48	72	96	120	
Bajo	111	104	91	78	64	41	
Alto	33	33	24	18	16	8	

Figura 2. Análisis de Kaplan-Meier para la supervivencia específica del cáncer basada en el estado de metilación de PITX2. Bajo: pacientes con niveles de metilación <6,6%; Alto: pacientes con niveles de metilación \geq 6,6%.

Table 2. Análisis univariate y multivariante para la supervivencia específica del cáncer y el estado de metilación del gen PITX2 en el grupo de tumores con un contenido diploide de ADN

Características	Pacientes	Análisis univariante		Análisis multivariante	
		HR (95% CI)	P-valor	HR (95% CI)	P-valor
Edad (años)	144	1,10 (1,04-1,16)	0,001	1,09 (1,02-1,16)	0,006
Estadio			0,000		0,001
1	105	1		1	
2	26	1,60 (0,87-2,92)		1,31 (0,66-2,60)	
3	13	2,24 (1,14-4,42)		2,96 (1,27-6,86)	
Grado			0,073		0,290
I	81	1		1	
II	38	1,49 (0,81-2,71)		1,38 (0,67-2,84)	
III	25	1,37 (0,70-2,69)		1,21 (0,59-2,94)	
Inf. Miometrial			0,567		
<50%	109	1			
≥50%	35	1,15 (0,71-1,85)			
Inv. Vascular			0,014		0,959
No	112	1		1	
Sí	32	1,76 (1,12-2,78)		0,99 (0,59-1,66)	
				<i>Añadido al modelo básico</i>	
Metilación PITX2*			0,011		0,042
Bajo	111	1		1	
Alto	33	1,77 (1,14-2,76)		1,60 (1,02-2,53)	

*Tumores con Bajo= niveles de metilación <6,6%, Alto= niveles de metilación ≥6,6%.

Discusión

El valor pronóstico del estado de metilación de PITX2 se observó por primera vez, en un estudio multicéntrico, en pacientes con cáncer de mama, receptores hormonales positivos y tratadas con Tamoxifeno (18). Los resultados de este primer trabajo fueron técnicamente y clínicamente validados, primero en un estudio donde participaron diez centros clínicos diferentes, en el que se incluyeron 399 muestras de tumores de mama embebidos en parafina, de pacientes con nódulos negativos, receptores hormonales positivos y tratadas con tamoxifeno (19). Segundo, en un grupo de 412 pacientes, con estadios iniciales de la enfermedad, también con nódulos negativos y receptores hormonales positivos, pero que no recibieron

tratamiento adyuvante (21). Y tercero, en un grupo de 241 tumores con receptores hormonales positivos, Her2 negativo, pero con nódulos positivos y que recibieron quimioterapia basada en antraciclinas (20). Así pues la metilación del PITX2 se considera un marcador pronóstico independiente en cáncer de mama, capaz de predecir la evolución clínica de la paciente independientemente de la afectación nodular y del tratamiento adyuvante endocrino y/o quimioterapia, incluso en aquellas pacientes en estadios iniciales de la enfermedad que no reciben tratamiento adyuvante (24).

El valor pronóstico de la metilación del gen PITX2 ha sido también validado en cáncer de próstata. Weiss y col. observaron que los pacientes con esta patología, tratados con prostatectomía radical, poseen un riesgo mayor de recaída si presentan tumores con altos niveles de metilación del PITX2, especialmente aquellos con tumores con una agresividad media/alta (Gleason ≥ 7) (22).

Este trabajo es el primero que estudia la alteración epigenética del gen PITX2 en CE. Nuestros resultados muestran unos niveles más elevados de metilación de PITX2 en el grupo de tumores comparado con el grupo control, lo que sugiere que la alteración epigenética del PITX2 está implicada en el proceso tumoral.

Observamos también una asociación, estadísticamente significativa, entre los niveles elevados de metilación del gen PITX2 y el estado MSI. El 20-30% de los CE presentan MSI (25). Los tumores con MSI se caracterizan por una alta inestabilidad de las regiones repetidas o microsatélites, causada por defectos en el sistema de reparación de apareamientos incorrectos o MMR (*Mismatch Repair System*) (26). El silenciamiento del gen MLH1 debido a la metilación de su promotor es la causa principal del estado MSI en los CE esporádicos (27). Este fenómeno epigenético se considera temprano en el proceso tumorigénico, ya que está presente en hiperplasias endometriales y en tejido normal adyacente al tumor (28, 29). Además de la alteración epigenética del gen MLH1, la metilación de otros genes como APC o RASSF1A se asocia positivamente con el estado MSI en los tumores de endometrio (30, 31). La metilación del gen PITX2 forma parte también del epigenotipo de este tipo de tumores.

En pacientes con CE con un contenido diploide de ADN, el estado de metilación del PITX2 pronostica un mayor riesgo de muerte por la enfermedad, independientemente de las variables clínico-patológicas como la edad, el estadio, grado histológico y la invasión vascular. Igual que en tumores de mama y próstata se hace necesaria su validación en otra serie de CE independiente.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que el nivel de metilación del promotor P2 del gen PITX2 es más elevado en los tumores de endometrio que en el tejido endometrial sano, que se asocia con el estado MSI y que pronostica una menor supervivencia específica de la enfermedad en los pacientes con CE con un contenido diploide de ADN.

Referencias

1. Gehring WJ, Affolter M, Burglin T 1994 Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63:487-526.
2. Arakawa H, Nakamura T, Zhadanov AB, Fidanza V, Yano T, Bullrich F, Shimizu M, Blechman J, Mazo A, Canaani E, Croce CM 1998 Identification and characterization of the ARPI gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4573-4578.
3. Cox CJ, Espinoza HM, McWilliams B, Chappell K, Morton L, Hjalt TA, Semina EV, Amendt BA 2002 Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *J Biol Chem* 277:25001-25010.
4. Gage PJ, Camper SA 1997 Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet* 6:457-464.
5. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC 1996 Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 14:392-399.
6. Ai D, Wang J, Amen M, Lu MF, Amendt BA, Martin JF 2007 Nuclear factor 1 and T-cell factor/LEF recognition elements regulate Pitx2 transcription in pituitary development. *Mol Cell Biol* 27:5765-5775.
7. Hayashi M, Maeda S, Aburatani H, Kitamura K, Miyoshi H, Miyazono K, Imamura T 2008 Pitx2 prevents osteoblastic transdifferentiation of myoblasts by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 283:565-571.
8. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG 2002 Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111:673-685.
9. Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG 1999 Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401:279-282
10. Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H, Blum M 2000 Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev* 90:41-51.
11. Shiratori H, Sakuma R, Watanabe M, Hashiguchi H, Mochida K, Sakai Y, Nishino J, Saijoh Y, Whitman M, Hamada H 2001 Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell* 7:137-149.
12. Abu-Elmagd M, Robson L, Sweetman D, Hadley J, Francis-West P, Munsterberg A 2000 Wnt/Lef1 signaling acts via Pitx2 to regulate somite myogenesis. *Dev Biol* 337:211-219.
13. Amen M, Liu X, Vadlamudi U, Elizondo G, Diamond E, Engelhardt JF, Amendt BA 2007 PITX2 and beta-catenin interactions regulate Lef-1 isoform expression. *Mol Cell Biol* 27:7560-7573.
14. Vadlamudi U, Espinoza HM, Ganga M, Martin DM, Liu X, Engelhardt JF, Amendt BA 2005 PITX2, beta-catenin and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter. *J Cell Sci* 118:1129-1137.

15. Alward WL, Semina EV, Kalenak JW, Heon E, Sheth BP, Stone EM, Murray JC 1998 Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the Rieger syndrome (RIEG/PITX2) gene. *Am J Ophthalmol* 125:98-100.
16. Espinoza HM, Cox CJ, Semina EV, Amendt BA 2002 A molecular basis for differential developmental anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome. *Hum Mol Genet* 11:743-753.
17. Pellegrini-Bouiller I, Manrique C, Gunz G, Grino M, Zamora AJ, Figarella-Branger D, Grisoli F, Jaquet P, Enjalbert A 1999 Expression of the members of the Ptx family of transcription factors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2212-2220.
18. Maier S, Nimmrich I, Koenig T, Eppenberger-Castori S, Bohlmann I, Paradiso A, Spyros F, Thomssen C, Mueller J, Nahrig J, Schittulli F, Kates R, Lesche R, Schwobe I, Kluth A, Marx A, Martens JW, Foekens JA, Schmitt M, Harbeck N 2007 DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients--Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur J Cancer* 43:1679-1686.
19. Harbeck N, Nimmrich I, Hartmann A, Ross JS, Cufer T, Grutzmann R, Kristiansen G, Paradiso A, Hartmann O, Margossian A, Martens J, Schwobe I, Lukas A, Muller V, Milde-Langosch K, Nahrig J, Foekens J, Maier S, Schmitt M, Lesche R 2008 Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 26:5036-5042.
20. Hartmann O, Spyros F, Harbeck N, Dietrich D, Fassbender A, Schmitt M, Eppenberger-Castori S, Vuaroqueaux V, Lerebours F, Welzel K, Maier S, Plum A, Niemann S, Foekens JA, Lesche R, Martens JW 2009 DNA methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 15:315-323.
21. Nimmrich I, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, Schwobe I, Bolt-de Vries J, Harbeck N, Koenig T, Hartmann O, Kluth A, Dietrich D, Magdolen V, Portengen H, Look MP, Klijn JG, Lesche R, Schmitt M, Maier S, Foekens JA, Martens JW 2008 DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 111:429-437.
22. Weiss G, Cottrell S, Distler J, Schatz P, Kristiansen G, Ittmann M, Haefliger C, Lesche R, Hartmann A, Corman J, Wheeler T 2009 DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 181:1678-1685.
23. Martens JW, Nimmrich I, Koenig T, Look MP, Harbeck N, Model F, Kluth A, Bolt-de Vries J, Sieuwerts AM, Portengen H, Meijer-Van Gelder ME, Piepenbrock C, Olek A, Hofler H, Kiechle M, Klijn JG, Schmitt M, Maier S, Foekens JA 2005 Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res* 65:4101-4117.
24. Martens JW, Margossian AL, Schmitt M, Foekens J, Harbeck N 2009 DNA methylation as a biomarker in breast cancer. *Future Oncol* 5:1245-1256.
25. Goodfellow PJ 2009 Clinicopathologic significance of DNA mismatch repair defects in endometrial cancer: the devil is in the details. *Gynecol Oncol* 113:151-152.

26. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M 1993 Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
27. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG 1998 MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17:2413-2417.
28. Esteller M, Catusas L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG 1999 hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 155:1767-1772.
29. Kanaya T, Kyo S, Maida Y, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Inoue M 2003 Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene* 22:2352-2360.
30. Kang S, Lee JM, Jeon ES, Lee S, Kim H, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM 2006 RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 119:1316-1321.
31. Zysman M, Saka A, Millar A, Knight J, Chapman W, Bapat B 2002 Methylation of adenomatous polyposis coli in endometrial cancer occurs more frequently in tumors with microsatellite instability phenotype. *Cancer Res* 62:3663-3666.

Capítulo 8
Abstract in English

Endometrial cancer (EC) is the most common pelvic gynecologic tumor in developed countries. It is usually diagnosed in early stages, but despite its good prognosis, approximately 20% of patients die from the disease.

The prognosis and current treatment of endometrial cancer is based on the use of clinical-pathological variables such as grade, myometrial infiltration, histological type, etc. Along with these, have been described new molecular variables involved in the tumorigenesis and progression of this tumor type. Its use in clinical practice could be helpful to improve the classification of tumors, prognosis and treatment of patients.

Our group, in collaboration with the Pathology Department and Gynecologic Oncology Unit of Gynecology and Obstetrics Department of the Hospital Universitario Materno-Insular, has been twenty years developing research projects aimed toward understanding the molecular alterations that occur in the development and evolution of this disease.

In 2000, The Cancer Genetics and Epigenetics Laboratory led by Dr. Manuel Perucho (The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA), discoverer of microsatellite instability, mutator route and their involvement in various malignancies joined the initiative. From that moment our research is focused on the study of this genetic anomaly, and others related to it, in EC.

This doctoral thesis aims to continue the research line developed by our group. The proposed objectives were to estimate the incidence, the relationship with clinicopathological and molecular variables and survival of patients, of the following genetic and epigenetic changes:

- 1) Mutations in the repeated tracts of EPHB2 gene (Chapter 3).
- 2) Mutations in double strand break repair components (Chapter 4).
- 3) Methylation of EPHB2 and EPHB4 gene promoter (Chapter 5).
- 4) Methylation of SFRPs gene promoter (Chapter 6).
- 5) Methylation of PITX2 gene promoter (Chapter 7).

In this way, we have wanted to deepen the understanding of molecular variables, which possibly, are associated with the development and progression of EC.

Chapter 3

High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability

The EPH/EFN family of receptor tyrosine kinases regulates cell adhesion and migration and has an important role in controlling cell positioning in the normal intestinal epithelium. Inactivation of EPHB2 has recently been shown to accelerate tumorigenesis in the colon and rectum, and we have previously demonstrated frequent frameshift mutations (41%) in an A9 coding microsatellite repeat in exon 17 of EPHB2 in colorectal tumors with microsatellite instability (MSI). In this study we extended these analyses to extracolonic MSI cancers, and found frameshift EPHB2 mutations in 39% (25/64) of gastric tumors and 14% (8/56) of endometrial tumors. Regression analysis of these EPHB2 mutation data on the basis of our previously proposed statistical model identified EPHB2 as a Selective Target of frameshift mutations in MSI gastric cancers but not in MSI endometrial carcinomas. These results suggest a functional role for EPHB2 in gastric tumor progression, and emphasize the differences between the tumorigenic processes in MSI gastrointestinal and endometrial cancer.

Chapter 4

Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer

DNA double strand break (DSB) repair is a central cellular mechanism of the DNA damage response to maintain genomic stability. DSB components are frequently mutated in colorectal cancer with microsatellite instability (MSI). We investigated whether DSB repair is involved in endometrial cancer (EC) with MSI.

Mononucleotide microsatellite tracts of 14 genes of the DSB repair system were analysed in a series of 41 EC with MSI. Among these genes, the microcephalin 1 (MCPH1/BRIT1) has never been tested as target of MSI in tumour series. The most frequently mutated gene was DNAPKcs (n=14.34%) followed by RAD50 (n=7.17%), MRE11, ATR and BRCA1 (n=6.15%), and by CtIP and MCPH1 (n=5.12%). While DSB biallelic mutations were infrequent, a high proportion of tumours (n=30.73%) presented mutations at some component of the DSB repair pathway, and almost half of them showed alterations at two or more components. Tumours with mutations in two or more genes were significantly associated with advanced grade ($p=0.03$) and vascular invasion ($p=0.02$) and marginally associated with advanced stage ($p=0.07$). Our results suggest that in EC, the DSB repair is a relatively common mutational target of MSI and might contribute to tumour progression, and also that MCPH1 may be a novel target gene of MSI.

Chapter 5

Epigenetics silencing of EPHB4 gene as a potential prognostic marker in endometrial cancer

EPHB4, EPHB2 receptors and their ligands Ephrins, are involved in cell morphology, adhesion, and motility. Its expression is regulated by Wnt/ β -catenin pathway. In colon, breast and prostate cancer are considered as tumor suppressor genes. Loss of expression by genetic or epigenetic alterations, are associated with carcinogenesis and tumor progression. In this study, we determine if the methylation status of EPHB2 and EPHB4 genes is related to endometrial cancer (EC) progression. The EPHB2 promoter methylation was found only in one of the 203 EC analyzed. In contrast, 8% of the tumors had methylated EPHB4 promoter. For both genes, none of the 40 samples used as a control group showed this alteration. Furthermore, EPHB4 methylated status was positively associated with patients age ($p=0.005$) and E-Cadherin promoter methylation ($p=0.005$). In univariate survival analysis, patients with methylated EPHB4 died earlier than those with unmethylated EPHB4 ($p=0.003$). In conclusion, EPHB2 promoter methylation is not related either

to EC carcinogenesis or progression. EPHB4 silencing is also present in EC, but its methylation frequency is lower than in colon cancer. This alteration appears in elderly patients with a worse clinical outcome.

Chapter 6

Simultaneous methylation of SFRP1, 2 and 5 genes is associated with poor outcome in endometrial cancer patients

In adult tissues, Wnt pathway plays an important role in cell proliferation, differentiation and apoptosis. In some tumor types alterations of its members cause an inappropriate activation of this signaling. The SFRPs members act as negative regulators of Wnt pathway, and are considered tumor suppressors genes. The epigenetic inactivation of these genes is frequent in breast and gastrointestinal cancer. This alteration is involved in carcinogenesis and cancer progression. In this work, we evaluated by MSP, the methylation status of SFRP1, SFRP2, SFRP4 and SFRP5 gene promoters in a series of 203 endometrial carcinomas (EC) and 40 healthy endometrium samples as tissue control (TC). We studied the relation the epigenetic alteration with molecular and clinicopathologic variables and clinical outcome of patients. The methylation percentages of Wnt inhibitors was in the tumor group 33.5%, 51.5%, 24.4% and 52%, and in TC group 5%, 10%, 15% and 17.5%, for SFRP1, SFRP2, SFRP4 and SFRP5 respectively. The EC had a significantly higher methylation frequency than the TC ($p < 0.0001$), except for SFRP4 gene. No relationship was found between methylation of SFRP1, SFRP2 and SFRP5 genes, individually, and clinicopathologic variables. However, the methylation status of SFRP1 and SFRP5 genes was frequent in tumors with microsatellite instability (MSI), ($p = 0.042$ and $p \leq 0.001$, respectively). Furthermore, tumors with SFRP1 methylated also were carriers of β -Catenin mutations ($p = 0.048$) and methylation of APC gene promoter ($p = 0.007$). Other molecular characteristics of tumors or survival of patients were unrelated with the methylation status of these genes. In univariate analysis, simultaneous inactivation of SFRP1, 2 and 5 was associated with advanced stages ($p = 0.022$), myometrial infiltration ($p = 0.002$), vascular invasion ($p =$

0.019) and lower cancer-specific survival ($p = 0.015$). Our data suggest the SFRP1, 2 and 5 simultaneous methylation is a possible epigenetic biomarker in EC.

Chapter 7

PITX2 methylation status as a novel prognostic marker in endometrial tumors with diploid DNA content

Paired-like homeodomain 2 (PITX2) is a member of RIEG/PITX homeobox family and acts as a transcription factor. It plays substantial roles in pituitary differentiation and normal embryonic asymmetry. The P2 promoter methylation status of PITX2 gene is a validated prognostic marker in patients with breast and prostate cancer. The aim of this study was to determine the possible association between PITX2 methylation status with clinicopathologic and molecular variables, and clinical behavior of endometrial carcinoma (EC) patients. The PITX2 promoter methylation levels were obtained by QM-PCR (real time MethyLight Quantitative Polymerase Chain Reaction), in a series of 203 EC samples and 40 healthy endometrium samples used as tissue control (TC). As a continuous variable, PITX2 methylation levels were significantly higher in tumor than control group ($p=0.03$). In tumor samples, the upper quartile methylation values (6.57%) exceeded the highest value of TC (5.96%) so this variable was categorized into two groups known as: low (<6.6 %) and high ($\geq 6.6\%$) methylation level. There was no association between PITX2 methylation status and clinicopathologic and molecular variables studied, except a positive association with microsatellite instability (MSI) ($p=0.006$). However, those patients with EC, with a high PITX2 methylation level and diploid DNA content had a worse clinical outcome in survival univariate and multivariate analysis ($p= 0.007$, HR 1.60, 95 % CI: 1.02-2.53, $p = 0.04$, respectively). This is the first report that studies the PITX2 epigenetic alteration in EC. It shows the relationship with MSI status and the potential prognostic utility in patients with tumors with diploid DNA content.

Capítulo 9

Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. El tracto de mononucleótidos repetidos A9 del exón 17 del gen EPHB2 estaba alterado en los tumores de endometrio con inestabilidad de microsatélites (MSI), si bien, su baja frecuencia mutacional sugirió que no era una diana de MSI, a diferencia de lo que ocurrió en los tumores gastrointestinales.
2. Los genes del sistema de reparación de roturas en la doble cadena del ADN con trectos de mononucleótidos repetidos en regiones codificantes fueron una diana mutacional de MSI frecuente en nuestra serie.
3. La alteración simultánea dos o más genes reparadores se asoció con una peor condición de las variables clínico-patológicas de interés clínico, tales como, el grado histológico más indiferenciado, la invasión vascular y el estadio más avanzado.
4. No se observó metilación del promotor del gen EPHB2 en nuestra serie.
5. La frecuencia de metilación del gen EPHB4 fué menor que la descrita en los tumores colorrectales y se relacionó con la edad más avanzada de las pacientes y con la metilación del gen de la E-Cadherina.
6. La metilación del EPHB4 pronosticó una peor supervivencia específica del cáncer en el análisis univariante.
7. La metilación del promotor de los genes SFRPs fué frecuente en nuestra serie. Los porcentajes de metilación eran más elevados en los tumores que en el tejido endometrial sano para los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5, pero no para el SFRP4.

8. La metilación de los genes SFRP1, SFRP2 o SFRP5 no se relacionó con las variables clínico-patológicas estudiadas ni con la evolución clínica de las pacientes.

9. La metilación de los genes SFRP1 y SFRP5 se asoció positivamente con el MSI. Los tumores con el SFRP1 metilado tenían el gen de la β -Catenina mutado y el del APC metilado con más frecuencia.

10. La metilación conjunta de los genes SFRP1, 2 y 5 se relacionó con el estadio más avanzado, la infiltración miometrial, la invasión vascular y con un tiempo menor de supervivencia específica del cáncer en el análisis univariante.

11. El nivel de metilación del promotor del gen PITX2 fué más elevado en los tumores que en el tejido endometrial sano, y se asoció de forma directa con el MSI.

12. La metilación del gen PITX2 fue un marcador de peor pronóstico en el grupo de tumores de endometrio con un contenido diploide de ADN, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, en el que se incluyeron las variables clínico-patológicas tradicionales.

Conclusions

1. The repeated mononucleotides A9 tract in exon 17 of EPHB2 gene was altered in endometrial tumors with microsatellite instability (MSI). In gastrointestinal tumors was considered as MSI target gene, but not in endometrial cancer due to their low mutational frequency.
2. In our series, double-strand breaks repair system genes with repeated mononucleotides tracts at coding regions were a frequent MSI mutational target.
3. Simultaneously alteration in two or more double-strand breaks repair genes was associated with a worse condition of clinicopathologic variables with clinical interest like undifferentiated histological grade, vascular invasion and more advanced stage.
4. The EPHB2 gene promoter was not methylated in endometrial cancer.
5. In endometrial cancer, the EPHB4 methylation frequency was lower than those reported for colorectal tumors. However, it was associated with older patients and E-Cadherin gene methylation.
6. In univariate analysis, EPHB4 methylation predicted a worse cancer-specific survival
7. In our series, SFRPs genes promoter methylation was common. The methylation percentages were higher in tumors than in healthy endometrial tissue for the genes SFRP1, SFRP2 and SFRP5, but not for SFRP4.

8. The methylation of SFRP1, SFRP2 and SFRP5 genes was not related with clinicopathologic variables studied or clinical outcome of patients.

9. SFRP1 and SFRP5 genes methylation was positively associated with MSI. Furthermore, tumors with methylated SFRP1 had frequently mutated β -Catenin and methylated APC genes.

10. In univariate analysis, the co-methylation of SFRP1, 2 and 5 genes was related with advanced stage, myometrial infiltration, vascular invasion and short cancer-specific survival.

11. PITX2 gene promoter methylation level was higher in tumors than in healthy endometrial tissue and it was directly associated with MSI.

12. The PITX2 gene methylation was a poor prognosis marker in the endometrial tumors group with diploid DNA content in both, univariate and multivariate analysis, which included the traditional clinicopathologic variables.

Anexos

Anexo I. Información suplementaria

Tabla 1. Secuencia de primers para el análisis del estado MSI

	Secuencia de primers (5'-3')
BAT-25	F: TAC CAG GTG GCA AAG GGC A R: HEX-TGC ATT TTA ACT ATG GCT C
BAT-26	F: CTG CGG TAA TCA AGT TTT TAG R: 6-FAM-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C
NR-21	F: AGT CGC TGG CAC AGT TCT A R: 6-FAM-CTG GTC ACT CGC GTT TAC AA
NR-24	F: CTG AAT TTT ACC TCC TGA C R: NED-ATT GTG CCA TTG CAT TCC AA
NR-27	F: AAC CAT GCT TGC AAA CCA CT R: HEX-CGA TAA TAC TAG CAA TGA CC

Abreviaturas: F= con sentido, R= sin sentido.

Buhard y col. (2006) J Clin Oncol 24:241-251.

Tabla 2. Secuencia de primers y condiciones de PCR para el estudio mutacional del tracto A9 del gen EPHB2

	Secuencia de primers (5'-3')	Condiciones PCR*
Genotipado	F: 6-FAM-CAC GAG ACG TCA CCA AGA AA R: CGC AAG AAC AGT CAT TGC TTT	35c/59°C
Secuenciación	F: CCT CCT GGT GCT CTA TCC AC R: TGG ACA CAT CGC ATG AAT CT	30c/55°C

* (c=número de ciclos/ temperatura de anillamiento). Abreviaturas: F= con sentido, R= sin sentido. Alazzouzi y col. (2005) Cancer Res 65:10170-10173

Tabla 3. Secuencia de primers y condiciones de MSP para el estudio del estado de metilación

Gen	Secuencia de primers F (5'-3')	Condiciones PCR*	Referencia
MLH1	UF: GAA GAG TGG ATA GTG ATT TTT AAT GT	30c/55°C	Deng y col. (1999) Cancer Res 59:2029-2033
	UR: ATC TCT TCA TCC CTC TTC CAA AAA CAA AAC A		
	MF: AGC GGA TAG CGA TTT TTA ACG C	35c/60°C	
	MR: TCT TCG TCC CTC CCT AAA ACG		
MGMT	UF: TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT	35c/65°C	Esteller y col. (2000) Cancer Res 60:2368-2371
	UR: AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A		
	MF: TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC	35c/58°C	
	MR: GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G		
APC	UF: GTG TTT TAT TGT GGA GTG TGG GTT	35c/60°C	Esteller y col. (2000) Cancer Res 60:4366-4371
	UR: CCA ATC AAC AAA CTC CCA ACA A		
	MF: TAT TGC GGA GTG CGG GTC	35c/57°C	
	MR: TCG ACG AAC TCC CGA CGA		
E-Cadherina	UF: GGT AGG TGA ATT TTT AGT TAA TTA GTG GTA	40c/58°C	Lind y col. (2004) Mol Cancer 3:28
	UR: ACC CAT AAC TAA CCA AAA ACA CCA		
	MF: GGT GAA TTT TTA GTT AAT TAG CGG TAC	35c/65°C	
	MR: CAT AAC TAA CCG AAA ACG CCG		
EPHB2	UF: TGT TTT TGT TAG TTG TGT TAG ATG T	35c/58°C	Alazzouzi y col. (2005) Cancer Res 65:10170-10173
	UR: CAA TAA TCT CTC CCA ACA CT		
	MF: TTG TTT TTG TTA GTC GCG TTA GAC	40c/64°C	
	MR: CAA TAA TCT CTC CCG ACG CT		
EPHB4	UF: TTT ATT AGA GGG TGG TGG GTG T	40c/61°C	Davalos y col. (2006) Cancer Res 66:8943-8948
	UR: CTA TCC AAA ACC AAA CAT ATC AAA		
	MF: GTT TAT TAG AGG GTG GTG GGC	35c/64°C	
	MR: TAT CCA AAA CCG AAC ATA TCG A		
SFRP1	UF: GTT TTG TAG TTT TTG GAG TTA GTG TTG TGT	35c/66°C	Suzuki y col. (2004) Nat Genet 36:417-422
	UR: CTC AAC CTA CAA TCA AAA ACA ACA CAA ACA		
	MF: TGT AGT TTT CGG AGT TAG TGT CGC GC	35c/69°C	
	MR: CCT ACG ATC GAA AAC GAC GCG AAC G		
SFRP2	UF: TTT TGG GTT GGA GTT TTT TGG AGT TGT GT	40c/65°C	Suzuki y col. (2004) Nat Genet 36:417-422
	UR: AAC CCA CTC TCT TCA CTA AAT ACA ACT CA		
	MF: GGG TCG GAG TTT TTC GGA GTT GCG C	35c/65°C	
	MR: CCG CTC TCT TCG CTA AAT ACG ACT CG		
SFRP4	UF: GGG GGT GAT GTT ATT GTT TTT GTA TTG AT	40c/65°C	Suzuki y col. (2004) Nat Genet 36:417-422
	UR: CAC CTC CCC TAA CAT AAA CTC AAA ACA		
	MF: GGG TGA TGT TAT CGT TTT TGT ATC GAC	35c/65°C	
	MR: CCT CCC CTA ACG TAA ACT CGA AAC G		
SFRP5	UF: GTA AGA TTT GGT GTT GGG TGG GAT GTT T	35c/66°C	Suzuki y col. (2004) Nat Genet 36:417-422
	UR: AAA ACT CCA ACC CAA ACC TCA CCA TAC A		
	MF: AAG ATT TGG CGT TGG GCG GGA CGT TC	35c/66°C	
	MR: ACT CCA ACC CGA ACC TCG CCG TAC G		

* (c=número de ciclos/ temperatura de anillamiento). Abreviaturas: U: primers específicos para el ADN no metilado, M: primers específicos para el ADN metilado, F: con sentido, R: sin sentido.

Anexo II. Curriculum Vitae

Lcda. En Ciencias Biológicas (Universidad de La Laguna, 2002)
Máster en Oncología Molecular (Universidad de Las Palmas de GC, 2005)
Diploma de Estudios Avanzados (Universidad de Las Palmas de GC, 2006)

Estancias/Stays

Medical Oncology Department. Josephine Nefkens Institute. Erasmus Medical Centre. Rotterdam, Netherland (01/05/2009-06/03/2010).

Klinikums Rechts der Isar (Technischen Universität München). Munich, Germany (03/12/2008-16/12/2008).

Instituto de productos naturales y agrobiología (Consejo superior de Investigaciones Científicas). Tenerife, España (01/09/2000-31/05/2001).

Publicaciones/Publications

Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer

Bilbao C, Ramírez R, Rodríguez G, Falcón O, León L, Díaz-Chico BN, Perucho M, Díaz-Chico JC.

Eur J Cancer. 2010 Jul 16. [Epub ahead of print].

Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation-treated endometrioid endometrial cancer

Bilbao C, Lara PC, Ramírez R, Henríquez-Hernández LA, Rodríguez G, Falcón O, León L, Perucho M, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010 Jan 1;76 (1):9-13.

The GGN and CAG repeat polymorphisms in the exon-1 of the androgen receptor gene are, respectively, associated with insulin resistance in men and with dyslipidemia in women

Rodríguez-González G, Ramírez-Moreno R, Pérez P, Bilbao C, López-Ríos L, Díaz-Chico JC, Lara PC, Serra-Majem L, Chirino R, Díaz-Chico BN.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Feb; 113 (3-5):202-8. Epub 2008 Dec 30.

Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer

Rodríguez-González G, Cabrera S, Ramírez-Moreno R, Bilbao C, Díaz-Chico JC, Serra L, Chesa N, Cabrera JJ, Díaz-Chico BN.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Jan; 113 (1-2):85-91. Epub 2008 Nov 27.

Androgens and androgen receptors in breast cancer

Díaz-Chico BN, Germán Rodríguez F, González A, Ramírez R, Bilbao C, Cabrera de León A, Aguirre Jaime A, Chirino R, Navarro D, Díaz-Chico JC.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2007 Jun-Jul; 105 (1-5):1-15. Epub 2007 May 17. Review.

High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability

Davalos V, Dopeso H, Velho S, Ferreira AM, Cirnes L, Díaz-Chico N, Bilbao C, Ramírez R, Rodríguez G, Falcón O, León L, Niessen RC, Keller G, Dallenbach-Hellweg G, Espín E, Armengol M, Plaja A, Perucho M, Imai K, Yamamoto H, Gebert JF, Díaz-Chico JC, Hofstra RM, Woerner SM, Seruca R, Schwartz S Jr. Arango D.
Oncogene. 2007 Jan 11; 26 (2):308-11.

La inestabilidad microsatélite y la hipermetilación del promotor MLH1 se asocian con la aparición tardía del cáncer de endometrio

R Ramírez-Moreno, FG Rodríguez, C Bilbao, O Falcón, L León, BN Díaz-Chico, JC Díaz-Chico.
Vector plus (FULP). 2006 Ene-Jun 27; 55:61.

The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer

Bilbao C, Rodríguez G, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Rivero JF, Falcón O Jr. Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC, Perucho M.
Int J Cancer. 2006 Aug 1; 119 (3):563-70.

Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer

Rodríguez G, Bilbao C, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Falcón O Jr. Díaz BP, Rivero JF, Perucho M, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC.
Int J Cancer. 2006 Mar 15; 118 (6):1420-5.

Últimas presentaciones a congresos/The last presentations

KRAS and BRAF mutation status analysis: Primary tumor versus metastasis and circulating tumor cells in 42 patients with colorectal cancer

J. Jiang, B. Mostert, Z. Lalmahomed, R. Ramírez-Moreno, A. Steuwerts, J. Kraan, J. IJzermans, C. Verhoef, Y. Wang, S. Sleijfer; Veridex LLC, Raritan, NJ.
ASCO-NCI-EORTC Annual Meeting on Molecular Markers in Cancer.

Póster

Hollywood, Florida EEUU, Octubre 2010

D. ENRIQUE CASTRO LÓPEZ-TARRUELLA SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión con fecha 16 de Septiembre de 2010 tomó el acuerdo de dar consentimiento para su tramitación y obtención de la mención de Doctorado Europeo a la tesis doctoral titulada:

“ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO”

presentada por la doctoranda D^a Raquel Ramírez Moreno y dirigida por los Doctores: D. Juan Carlos Díaz Chico, D. B. Nicolás Díaz Chico y D. Fco. Germán Rodríguez González.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 16 de Septiembre de 2010



Enrique Castro López-Torruella
Fdo. D. Enrique Castro López-Torruella

Clinical relevance of measuring mRNA's and microRNA's in circulating tumor cells

Anieta M. Siewewerts, Bianca Mostert, Joan Bolt-de Vries, Jaco Kraan, Anne van Galen, Vanja de Weerd, Petra van der Spoel, Raquel Ramírez-Moreno, Jack Yu, Yixin Wang, Jan-Willem Gratama, John A. Foekens, Stefan Sleijfer and John W.M. Martens.

Developments in Real-Time PCR, Research and Molecular Diagnostics Tipo de Presentación oral

Göteborg, Sweden, Mayo 2010

PITX2 methylation as a novel prognostic factor in endometrial cancer

Ramírez-Moreno R, Rodríguez-González FG, Santana Farré R, Bilbao C, Torres S, Martens JW, Napieralski R, León L, Falcón O, Schmitt M, Foekens JA, Fernández Pérez L, Díaz Chico BN, Díaz Chico JC

6th Meeting of Young Cancer Investigators of the Canaries (6th YCIC)

Póster

Las Palmas de GC, Diciembre 2009

Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation treated endometrioid endometrial cancer

Bilbao C, Lara PC, Ramírez-Moreno R, Henríquez Hernández LA, Rodríguez-González FG, Fontes F, Pinar B, León L, Falcón O, Perucho M, Díaz Chico BN, Díaz Chico JC

6th Meeting of Young Cancer Investigators of the Canaries (6th YCIC)

Presentación oral

Las Palmas de GC, Diciembre 2009

Predictive role of microsatellite instability in radiation response in sporadic endometrial carcinoma

C. Bilbao, PC. Lara, O. Falcón, L. León, F. Fontes, R. Ramirez, G. Rodriguez, LA, Henríquez, B. Pinar, BN. Díaz Chico, JC. Díaz Chico.

XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR).

Póster

Castellón, Octubre 2009

Genetics and epigenetics profile of unstable endometrioid endometrial cancer

Ramírez-Moreno R, Rodríguez González FG, Bilbao C, Falcón O, León L, Díaz Chico BN, Díaz Chico, JC

5th Meeting of Young Cancer Investigators of the Canaries (5th YCIC). 3rd Meeting of Young Biomedical Investigators of the Macaronesia (3rd YBIM)

Presentación oral

La Laguna, Tenerife, Noviembre 2008

Anexo III. Financiación

El presente proyecto de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación concedida por:

1. Fundación Universitaria de Las Palmas (FULP). Beca de postgraduado.
2. Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC). Beca de postgraduado y PI04/2007, PI Red Epicancer.
3. Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno de Canarias (DGUI). Beca de postgrado y PI 2002/055.
4. Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias (ACIISI). Beca para la realización de estancias breves en centros de investigación extranjeros.
5. Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS). PI 68/05, PI53/07.

Anexo IV. Agradecimientos/Acknowledgements

Gracias:

A Juan Carlos Díaz por su dedicación, paciencia y sus críticas siempre constructivas. A Nicolás Díaz por permitirme empezar, por ser un buen ejemplo a seguir, por su optimismo e inquietudes.

A Orlando Falcón y a Laureano León, ginecólogo y patólogo respectivamente, del complejo Hospitalario Materno-Insular, por su gran labor a la hora de recolectar las muestras y las variables clínico-patológicas, por contribuir y apoyar así a la investigación del cáncer.

A mis compañeros por compartir tantos buenos ratos: Cristina Bilbao, Ruymán Santana, Carlos Díaz, Dionisio Lorenzo, Laura López, Yeray Brito, Julia Wiebe, Luis Henríquez, Rubén Pérez, Jorge Marrero, María Claudia Sandoval, Mercedes Mirecky, Patricia Martín, Elisa Bordón, Maira Almeida, Ahinara Asín, de genética, de bioquímica y del ICIC. Y a los profesores y personal de la Universidad por su ayuda y apoyo: Soraya Pérez, Pilar Bracero, Alejandro González, Pilar Díaz, Isabel Marrero, Leandro Fernández, Pilar Fernández, Ricardo Chirino, Domingo Navarro, Antonio López, Santiago Torres, Manolo Zumbado, Luis Domínguez y Octavio Pérez.

Thanks for your hospitality and teaching to all Dutch friends, John Foekens, Mar, Renee, Jordi, John Martens, Jenny, Anieta, Albert, Vanja, Anne, Wendy, Chyntia, NingQing, Mohammed, Joan, Sharmilee and the other colleagues from Foekens's Lab and JNI Institute, also to my German friends Rudolf, Manfred and Elisabeth.

A mis amigos, también a los de la querida etapa lagunera, por conservar nuestra amistad y porque sé que siempre están.

A Germán por su apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo, y por todo lo demás...

A mi pequeña y gran familia, a los que están y a los que han marchado al "País de Jauja", por ser mi referente y una fuente inagotable de buena energía.

Gracias también, a todas las pacientes porque ellas son la razón por la que me ilusiona este trabajo.

"No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta".

J.L. Martín Descalzo

Raquel, Las Palmas de Gran Canaria, 2010

Título: “Alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer de endometrio”

Autor: D^a. Raquel Ramírez Moreno

Resumen de la tesis.

El cáncer de endometrio es el tumor ginecológico pélvico más frecuente en los países desarrollados. Generalmente se diagnostica en estadios iniciales, pero a pesar de su buen pronóstico, aproximadamente el 20% de las pacientes mueren a causa de la enfermedad. Los objetivos planteados han sido estimar la incidencia, la relación con las características clínico-patológicas y moleculares, y con la supervivencia de las pacientes, de las siguientes alteraciones genéticas y epigenéticas: **1)** mutaciones en los trectos repetidos del gen EPHB2 y de los genes miembros del sistema de reparación de roturas de la doble cadena de ADN, **2)** metilación del promotor de los genes EPHB2, EPHB4, SFRPs y PITX2.

Conclusiones:

El tracto de mononucleótidos repetidos A9 del exón 17 del gen EPHB2 estaba alterado en los tumores de endometrio con inestabilidad de microsatélites (MSI), si bien, su baja frecuencia mutacional sugirió que no era una diana de MSI, a diferencia de lo que ocurrió en los tumores gastrointestinales. Los genes del sistema de reparación de roturas en la doble cadena del ADN con trectos de mononucleótidos repetidos en regiones codificantes fueron una diana mutacional de MSI frecuente en nuestra serie. La alteración simultánea dos o más genes reparadores se asoció con una peor condición de las variables clínico-patológicas de interés clínico, tales como, el grado histológico más indiferenciado, la invasión vascular y el estadio más avanzado. No se observó metilación del promotor del gen EPHB2 en nuestra serie. La frecuencia de metilación del gen EPHB4 fue menor que la descrita en los tumores colorrectales y se relacionó con la edad más avanzada de las pacientes y con la metilación del gen de la E-Cadherina, y además con una peor supervivencia específica del cáncer en el análisis univariante. La metilación del promotor de los genes SFRPs fue frecuente en nuestra serie. Los porcentajes de metilación eran más elevados en los tumores que en el tejido endometrial sano para los genes SFRP1, SFRP2 y SFRP5, pero no para el SFRP4. La metilación de los genes SFRP1, SFRP2 o SFRP5 no se relacionó con las variables clínico-patológicas estudiadas ni con la evolución clínica de las pacientes. La metilación de los genes SFRP1 y SFRP5 se asoció positivamente con el MSI. Los tumores con el SFRP1 metilado tenían el gen de la β -Catenina mutado y el del APC metilado con más frecuencia. La metilación conjunta de los genes SFRP1, 2 y 5 se relacionó con el estadio más avanzado, la infiltración miometrial, la invasión vascular y con un tiempo menor de supervivencia específica del cáncer en el análisis univariante. El nivel de metilación del promotor del gen PITX2 fue más elevado en los tumores que en el tejido endometrial sano, y se asoció de forma directa con el MSI. La metilación del gen PITX2 fue un marcador de peor pronóstico en el grupo de tumores de endometrio con un contenido diploide de ADN, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, en el que se incluyeron las variables clínico-patológicas tradicionales.