



Universitat de Lleida

Estudi dels efectes antineoplàsics del tractament amb Vorinostat, Vitamina D i radioteràpia en el càncer d'endometri

Laura Bergadà Bertran

Dipòsit Legal: L.1230-2014
<http://hdl.handle.net/10803/272933>

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

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

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



Universitat de Lleida

**Estudi dels efectes antineoplàsics del tractament
amb Vorinostat, Vitamina D i radioteràpia en el
càncer d'endometri.**

Laura Bergadà Bertran





Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

**Estudi dels efectes antineoplàsics del tractament
amb Vorinostat, Vitamina D i radioteràpia en el
càncer d'endometri.**

Laura Bergadà Bertran

Lleida, Desembre 2013



Universitat de Lleida



Programa de doctorat

Estudis Avançats en Ciències Biomèdiques

**Estudi dels efectes antineoplàsics del tractament
amb Vorinostat, Vitamina D i radioteràpia en el
càncer d'endometri.**

Directors de tesi:

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia

Dr. Xavier Dolcet Roca

Lleida, Desembre 2013

Als meus pares
Als meus padrins i avis
A la meva germana
Al Ramon

Si ho pots somiar, ho pots fer.

Walt Disney



Resum
Resumen
Abstract

RESUM

El carcinoma d'endometri (CE) és la neoplàsia més freqüent del tracte genital femení en els països desenvolupats. El CE és una malignització de les cèl·lules epitelials que revesteixen l'úter en el seu interior. Tot i que quan està confinat l'úter té bon pronòstic, quan surt de la cavitat uterina es torna una malaltia pràcticament incurable, per la qual cosa requereix la recerca de nous fàrmacs. La identificació de noves dianes terapèutiques a més dels mecanismes moleculars d'actuació d'aquests fàrmacs en aquesta neoplàsia, té una gran rellevància translacional. Si es compara amb els tractaments tradicionals, quimioteràpia o radioteràpia, la teràpia contra dianes moleculars presenta un gran avantatge per la seva especificitat, tant en la relació fàrmac-diana com diana-tumor. Això permet reduir la toxicitat indiscriminada dels tractaments anticancerosos, i addicionalment, actuar de forma dirigida contra determinats subgrups de tumors. Per altra banda, aquests fàrmacs poden actuar de forma sinèrgica entre ells o en combinació amb tractaments clàssics.

L'augment del coneixement sobre l'etiologia del càncer ha permès descobrir noves dianes alterades específicament en les cèl·lules tumorals, com és el cas de les HDACs. Aquest fet ha motivat, per exemple, el desenvolupament del Vorinostat, un inhibidor de les HDACs. Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren que el Vorinostat és efectiu i selectiu per a les cèl·lules tumorals de CE. A nivell molecular, el Vorinostat en el CE induïx l'acetilació de les histones i altres proteïnes cooperant en el procés d'apoptosi caspasa-dependent. A més a més, el Vorinostat és eficient a l'hora de reduir la viabilitat, proliferació i induir una parada en el cicle cel·lular. El tractament juntament amb antioxidants rescata la mort induïda pel Vorinostat, fet que conclou que l'efecte letal del Vorinostat està relacionat amb l'estrès oxidatiu a través de la producció de ROS.

Estudis previs demostren que la vitamina D (VD) és un factor d'inhibició tumoral en molts tipus de neoplàsies, però, la relació causa-efecte de presentar baixos nivells de VD en sèrum i desenvolupar càncer segueix estant incompleta. Els nostres estudis fets amb *tissues microarrays* (TMA) demostren que els casos de CE presentaven nivells baixos de CYP24A1 (enzim mitocondrial que degrada els metabòlits de la VD) juntament amb nivells baixos de VDR (receptor de la VD) nuclear i citoplasmàtic; els

casos més agressius de CE, el tipus III, podien presentar nivells baixos de CYP27A1 (enzim que converteix la VD en 25(OH)D) o nivells alts de CYP24A1 en comparació amb els endometris normals (EN) analitzats. El tractament amb VD₃, colecalciferol, de les línies cel·lulars de CE va ser suficient a l'hora de disminuir la capacitat clonogènica de les cèl·lules i la seva viabilitat a més d'induir efectes antiproliferatius.

Globalment, els treballs que constitueixen aquesta tesi doctoral suposen una contribució important en el coneixement del mecanisme molecular d'acció del Vorinostat, antioxidants i la VD, fàrmacs que podrien ser efectius pel tractament/prevenió/atenuació del CE.

RESUMEN

El carcinoma de endometrio (CE) es la neoplasia más frecuente del aparato genital femenino en los países desarrollados. El CE incluye un conjunto de variantes malignas que provienen de las células epiteliales que revisten el útero en su interior. Aunque cuando se encuentra confinado en el útero, tiene buen pronóstico, cuando sale de la cavidad uterina se transforma en una enfermedad prácticamente incurable, por lo que requiere la búsqueda de nuevos fármacos. La identificación de nuevas dianas terapéuticas además de los mecanismos moleculares de actuación de estos fármacos en esta neoplasia, tiene una gran relevancia translacional. Si se compara con los tratamientos tradicionales, quimioterapia o radioterapia, la terapia contra dianas moleculares presenta una gran ventaja por su especificidad, tanto en la relación fármaco-diana como diana-tumor. Esto permite reducir la toxicidad indiscriminada de los tratamientos anticancerosos, y adicionalmente, actuar de forma dirigida contra determinados subgrupos de tumores. Por otra parte, estos fármacos pueden actuar de forma sinérgica entre ellos o en combinación con tratamientos clásicos.

El aumento del conocimiento sobre la etiología del cáncer ha permitido descubrir nuevas dianas alteradas específicamente en las células tumorales, como es el caso de las HDAC. Este hecho ha motivado, por ejemplo, el desarrollo del Vorinostat, un inhibidor de las HDACs. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que el Vorinostat es efectivo y selectivo para las células tumorales de CE. A nivel molecular, el Vorinostat en el CE induce la acetilación de las histonas y otras proteínas cooperando en el proceso de apoptosis caspasa-dependiente. Además el Vorinostat es eficiente a la hora de reducir la viabilidad, proliferación e inducir una parada en el ciclo celular. El tratamiento junto con antioxidantes revierte la muerte inducida por el Vorinostat, hecho que sugiere, que el efecto letal de Vorinostat está relacionado con el estrés oxidativo de las células mediante la producción de ROS.

Estudios previos demuestran que la vitamina D (VD) es un factor de inhibición tumoral en muchos tipos de neoplasias, sin embargo, la relación causa-efecto de presentar bajos niveles de VD en suero y desarrollar cáncer sigue siendo incompleta. Nuestros estudios hechos con *tissues micro arrays* (TMA) demuestran que los casos de CE presentaban niveles bajos de CYP24A1 (enzima mitocondrial que degrada los

metabolitos de la VD) junto con niveles bajos de VDR (receptor de la VD) nuclear y citoplasmático; los casos más agresivos de CE, el tipo III, podían presentar niveles bajos de CYP27A1 (enzima que convierte la VD 25(OH)D) o niveles altos de CYP24A1 en comparación con los endometrios normales (EN) analizados. El tratamiento de las líneas celulares de CE con VD₃, colecalciferol, es suficiente para disminuir la capacidad clonogénica de las células y su viabilidad además de inducir efectos antiproliferativos.

Globalmente, los trabajos que constituyen esta tesis doctoral suponen una contribución importante en el conocimiento del mecanismo molecular de acción del Vorinostat, antioxidantes y la VD, fármacos que podrían ser efectivos para el tratamiento/atenuación/prevención del CE.

ABSTRACT

Endometrial carcinoma (EC) is the most common malignancy of the female genital tract in developed countries. EC implicates the epithelium inside the uterine cavity, and has a good prognosis when confined to the uterus. However, once outside the uterine cavity, EC becomes an incurable disease by current available drugs. Therefore, the identification of new therapeutic targets for this neoplasm as well as the molecular mechanisms of action of these drugs in this neoplasm is an issue of high translational relevance. Indeed, therapy against specific molecular targets presents an important advantage over chemotherapy or radiotherapy for their specificity. Thereby reducing their indiscriminate cellular toxicity and, more significantly, acting against specific subsets of tumors, or acting synergistically when administered in combination with traditional treatments.

Increased understanding of the etiology of cancer has uncovered new targets specifically altered in tumor cells, such as the HDACs. This has led to the development of drugs as Vorinostat, an inhibitor of HDACs. This thesis work demonstrates that Vorinostat is an effective and selective anti EC agent. At the molecular level, Vorinostat induces acetylation of histones and other proteins helping in the process of caspase-dependent apoptosis. Besides Vorinostat treatment is efficient in reducing the viability, proliferation and induces cell cycle arrest. Co-treatment with antioxidants rescues Vorinostat-induced cell death suggesting that the lethal effect of Vorinostat results from oxidative stress caused by ROS production.

An additional contribution of this thesis work is the anti-EC actions of vitamin D (VD). Numerous epidemiological studies have linked VD deficiency with a higher cancer risk, but the cause-effect link low serum levels of VD and an accelerated development of cancer is still incomplete. In vitro studies in EC cell lines demonstrated that VD₃ (cholecalciferol) treatment was sufficient to reduce their viability, proliferation rates and clonogenic capacity because these cells express CYP27A1 and CYP2R1, the enzymes that can convert VD₃ into 25-hydroxyVD₃/25(OH)D, a direct activator of VDR antiproliferative actions. Furthermore, tissue micro arrays (TMA) analysis revealed higher expression of both CYP27A1 and CYP2R1 but low VDR in EC compared to normal endometrium. These findings together with the low levels of CYP24A1 (the enzyme

that degrades VD metabolites) in early stages of EC support the potential for effective antiproliferative actions with appropriate VD supplementation. Both reductions in CYP27A1 and CYP2R1 and increases in CYP24A1 limit VD inhibition of EC growth in more advanced stages.

Overall, this thesis work provides an important contribution to our understanding on the molecular mechanisms of action of Vorinostat, antioxidants and VD, all of which might be effective for the treatment/attenuation/prevention of EC.



Índex

ÍNDIX

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURES | 1 |
| INTRODUCCIÓ | 7 |
| 1. L'ÚTER I L'ENDOMETRI..... | 7 |
| 1.1 Fisiologia de l'endometri | 8 |
| 1.2 La funció de l'endometri en el cicle menstrual | 8 |
| 2. EL CARCINOMA D'ENDOMETRI..... | 11 |
| 2.1 Epidemiologia | 11 |
| 2.2 Tipus de carcinomes endometrials..... | 11 |
| 2.3 Alteracions moleculars del carcinoma d'endometri..... | 12 |
| 2.4 Factors de risc associats a l'aparició del carcinoma d'endometri..... | 15 |
| 2.5 Estadificació i pronòstic del carcinoma d'endometri..... | 16 |
| 3. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA..... | 19 |
| 3.1 Una mica d'història | 19 |
| 3.2 Etapes en l'apoptosi | 21 |
| 3.3 Mort cel·lular dependent de caspases..... | 24 |
| 3.3.1 Estructura i funció de les caspases..... | 24 |
| 3.4 Tipus de caspases | 25 |
| 3.5 Vies apoptòtiques | 26 |
| 3.5.1 Via extrínseca o dels receptors de mort | 27 |
| 3.5.2 Via intrínseca o mitocondrial | 29 |
| 3.6 Convergència entre vies..... | 31 |
| 3.7 Proteïnes reguladores de l'apoptosi..... | 33 |
| 3.7.1 Família de Bcl-2 | 33 |
| 3.7.1.1 Classificació | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.1.2 Les proteïnes homòlogues a Bcl-2 | 34 |
| 3.7.2 Les proteïnes BH3-only | 35 |
| 4. TRACTAMENT EN LA CLÍNICA DEL CARCINOMA D'ENDOMETRI | 37 |
| 4.1 Cirurgia | 38 |
| 4.2 Quimioteràpia | 38 |
| 4.3 Radioteràpia | 39 |
| 4.4 Hormonoteràpia..... | 39 |
| 5. L'EPIGENÈTICA..... | 41 |
| 5.1 Regulació de l'expressió gènica; les modificacions post-traduccionals | 44 |
| 5.1.1 Metilació de l'ADN | 46 |
| 5.1.2 Modificació de la cua de les histones | 47 |
| 5.1.2.1 Tipus de modificacions en les cues de les histones | 48 |
| 5.1.3 Remodelació de l'estructura de la cromatina | 51 |
| 6. EPIGENÈTICA I CÀNCER | 51 |
| 6.1 Desregulació de l'epigenètica | 53 |
| 6.2 Funció de les HATs i les HDACs..... | 53 |
| 6.2.1 Classificació de les HDACs | 55 |
| 7. DIANES MOLECULARS EN EL TRACTAMENT DEL CARCINOMA D'ENDOMETRI | 56 |
| 8. INHIBIDORS DE LES HISTONES DEACETILASES (HDACis)..... | 57 |
| 8.1 Tipus i classificació | 57 |
| 8.2 Vorinostat | 58 |
| 8.2.1 Situació actual | 58 |
| 8.2.2 Mecanisme del Vorinostat | 59 |
| 9. VITAMINA D | 60 |
| 9.1 Tipus i estructura..... | 60 |

| | |
|--|------------|
| 9.2 Biosíntesi de la vitamina D..... | 61 |
| 9.3 Metabòlits de la vitamina D..... | 64 |
| 9.2.1 VDR, el receptor de vitamina D..... | 64 |
| 9.2.2 CYP27A1, l'enzim de síntesi de la vitamina D, 25(OH)D | 65 |
| 9.2.3 CYP2R1, l'enzim de síntesi de la vitamina D, 25(OH)D | 66 |
| 9.2.4 CYP27B1 l'enzim de síntesi de la vitamina D activa, 1,25D | 66 |
| 9.2.5 CYP24A1, l'enzim de degradació de la vitamina D, 24,25(OH)D ₃ | 67 |
| 9.3 Carència | 67 |
| 10. CÀNCER I VITAMINA D..... | 70 |
| HIPÒTESI I OBJECTIUS | 75 |
| MATERIALS I MÈTODES..... | 79 |
| 1. TÈCNiques DE BIOLOGIA CEL·LULAR | 79 |
| 2. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR | 85 |
| 3. CITOMETRIA DE FLUX (FACS) | 94 |
| 4. DETECCIÓ DE 25(OH)D₃ | 95 |
| 5. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ | 96 |
| 6. HISTOLOGIA I TINCIONS D'IMMUNOLOGIA..... | 98 |
| RESULTATS | 103 |
| DISCUSSIÓ..... | 163 |
| 1. LA COMBINACIÓ DE VORINOSTAT AMB LA INHIBICIÓ DE LA CASPASA 8 INDUEIX UN FORT EFECTE ANTITUMORAL EN LES LÍNIES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI..... | 163 |
| 2. ELS ANTIOXIDANTS BLOQUEGEN ELS EFECTES ANTITUMORALS DEL VORINOSTAT, PERÒ NO ELS EFECTES ANTINEOPLÀSICS DEGUTS A LA COMBINACIÓ DE VORINOSTAT I LA INHIBICIÓ DE LA CASPASA-8, EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI..... | 168 |
| 3. EFECTES DE LA RADIOTERÀPIA EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI..... | 172 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 4. PAPER DE LA BIOACTIVACIÓ LOCAL DE LA VITAMINA D, PELS ENZIMS CYP27A1 I CYP2R1, EN EL CONTROL DEL CREIXEMENT CEL·LULAR, EN L'ENDOMETRI NORMAL I EL CARCINOMA D'ENDOMETRI. | 176 |
| CONCLUSIONS | 183 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 187 |
| ANNEX | ¡Error! Marcador no definido. |
| 1. PUBLICACIONS CIENTÍFIQUES | ¡Error! Marcador no definido. |
| 2. COMUNICACIONS A CONGRESSOS..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| 3. PROJECTES DE RECERCA EN ELS QUE HE PARTICIPAT¡Error! | Marcador no definido. |



Abreviatures

ABREVIATURES

1,25-hidroxitamina D₃ / 1,25(OH)₂D₃ / 1,25D / calcitriol: *1,25 dihydroxivitamin D₃*

25-hidroxitamina D₃ / 25(OH)D₃ / 25(OH)D / calcidiol: *25-hydroxivitamin D₃*

AIF: *apoptotic inducing factor*

AJCC: *American Joint Cancer Commission*

Apaf-1: *apoptotic-protease-activating factor-1*

ATP: *adenosin triphosphate*

Bad: *Bcl-2-associated death promoter*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2: *B-cell lymphoma/leukemia-2*

Bcl-XL: *B-cell lymphoma extra large*

BH: *Bcl-2 homology domain*

Bid: *BH3 interacting-domain death antagonist*

CARD: *caspase-activation recruitment domain*

Caspasa: *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*

cDNA: *complementary DNA*

Ced-3/9: *cell-death abnormality-3/9*

DBD: *DNA binding domain*

DBP: *vitamin D binding protein*

DD: *death domain*

DED: *death effector domain*

Diablo/Smac: *second mitochondria-derived activator of caspases*

DISC: *death-inducing signalling complex*

DNA: *desoxiribonucleix acid*

DR: *death receptor*

EC: *endometrial carcinoma*

EEC: *endometrioid endometrial carcinoma*

EndoG: *endonuclease G*

FADD: *Fas associated protein with death domain*

FDA: *food and drug administration*

FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

FLICE: *Fas associated death domain-like ICE*

FLIP: *Fas associated death domain like interleukin 1 β converting enzyme inhibitory protein*

FSH: *follicle stimulating hormone*

GNRH: *gonadotropin releasing hormone*

HDAC: *histone deacetylase*

HDACi: *histone deacetylase inhibitor*

IAP: *inhibitor of apoptosis protein*

ICE: *interleukin-1 β converting enzyme*

K: *lysine*

kDa: *kilodalton*

LBD: *ligand binding domain*

LH: *Luteinizing hormone*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MI: *microsatellite instability*

mRNA: *messenger ribonucleic acid*

NEEC: *non-endometrioid endometrial carcinoma*

NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*

PCD: *programmed cell death*

PCR: *polymerase chain reaction*

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*

PTEN: *phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10*

R: *purine*

RNA: *ribonucleic acid*

ROS: *reactive oxygen species*

RT: *retrotranscriptase*

RT-PCR: *retrotranscriptive polymerase chain reaction*

SAM: *S-adenosil-L-methionine*

SHA: *S-adenosil-L-homocysteine*

shRNAi: *short hairpin RNA interference*

siRNA: *small interfering RNA*

SUMO: *small ubiquitin modifier*

tBid: *truncated Bid*

TNF: *tumor necrosis factor*

TNFR: *tumor necrosis factor receptor*

TRADD: *TNF receptor associated death domain*

TRAF: *TNF receptor associated factor*

TRAIL: *tumor necrosis factor related apoptosi-inducing ligand*

UVB: *ultraviolet radiation type B*

VD: *vitamina D*

VDR: *vitamin D receptor*

VDREs: *vitamin D-responsive elements*

XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosi protein*

Y: *pyrimidine*

A circular petri dish containing a dense, uniform layer of small, light-colored bacterial colonies, likely a lawn culture. The dish is positioned in the lower right quadrant of the page.

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. L'ÚTER I L'ENDOMETRI

L'úter, també anomenat matriu, és l'òrgan més important i més gran de l'aparell reproductor femení de la majoria dels mamífers, inclòs l'humà. És un òrgan muscular, buit, en forma de pera, extra-peritoneal i que mesura uns 7 cm de longitud en estat de repòs. Situat entre la vagina i les trompes de Fal·lopi, està format per dos parts; el cos de l'úter i el cèrvix o coll d'úter (Figura 1). L'endometri és el tipus de teixit mucós que recobreix l'interior de l'úter, aquest teixit proporciona l'entorn adequat per al desenvolupament del fetus, és a dir, serà on s'allotja l'òvul fertilitzat que serà nodrit iniciant-se així la gestació, que en l'espècie humana dura uns 280 dies. La paret gran de múscul llis, és el miometri, que s'engrandeix enormement durant l'embaràs, proporciona protecció al fetus i participa en el moment del part en l'expulsió d'aquest

10 .

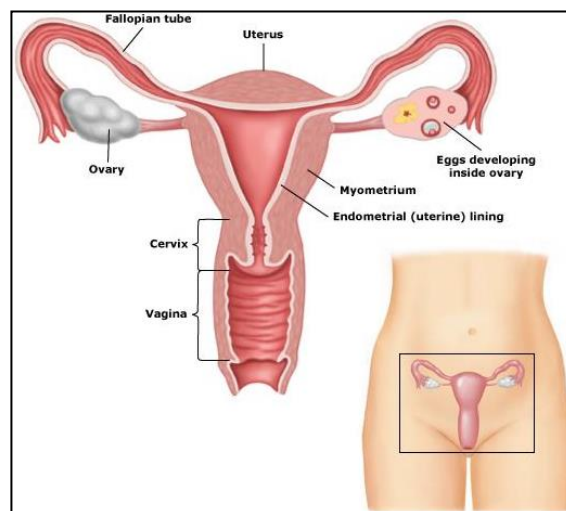


Figura 1. Esquema que mostra les diferents parts de l'aparell reproductor femení: úter, parts de l'endometri, coll d'úter, trompes de Fal·lopi, ovaris i vagina ¹¹.

L'úter està recobert parcialment per peritoneu en el fons uterí. La paret de l'úter està format per 3 capes: l'endometri (capa més interna), el miometri (membrana muscular, capa intermèdia) i el peritoneu parietal (membrana serosa, capa més externa) ¹⁰.

1.1 Fisiologia de l'endometri

L'endometri consisteix bàsicament amb un epiteli simple de tipus columnar (cèl·lules allargades i estretes amb nuclis ovoides) i pseudoestratificat (dos o més capes de cèl·lules) que pot presentar cilis (epiteli ciliat, el més abundant) o no. Està sostingut per un estroma cel·lular, que allotja les nombroses glàndules tubulars simples. L'estroma és un tipus de teixit connectiu lax, ric en vasos sanguinis ^{10, 12}.

A més a més, a la capa del miometri s'hi troben les glàndules tubulars, la funció de les quals és sintetitzar i secretar substàncies, com hormones, per a que la implantació, supervivència, desenvolupament i creixement de l'embrió/fetus sigui possible.

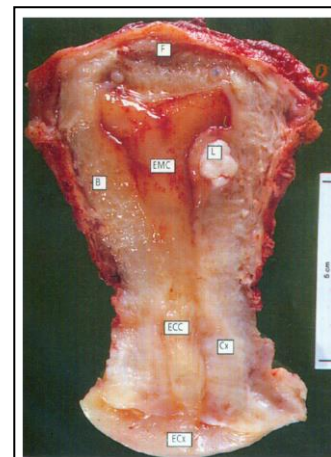


Figura 2: Tall sagital d'un úter femení. S'aprecia el fundus (F), el cos (B) i el cèrvix (CX). S'observa la cavitat endometrial (ECC), el canal endocervical (ECC) i l'ectocèrvix (ECX). El múscul llis del cos conté un petit tumor, un Leioma (L) ¹³.

1.2 La funció de l'endometri en el cicle menstrual

La menstruació és un fenomen fisiològic de les dones que es presenta en les dones sanes des de la pubertat fins a la menopausa. Consisteix en l'expulsió d'òvuls no fertilitzats, en forma de flux hemàtic, a la fi de cada cicle menstrual. Comunament el cicle menstrual es coneix com a el procés durant el qual l'endometri sofreix modificacions estructurals que el faran un receptor apte per a la implantació de l'òvul fecundat i posterior desenvolupament de l'embrió. Si finalment l'embaràs no té lloc, es produiran les variacions típiques del cicle menstrual que resultaran en última instància en la menstruació ^{10, 12}.

La menstruació pot o no seguir un cicle regular. Normalment el cicle de la menstruació dura aproximadament 28 dies, tot i que depèn de cada dona. El període que es considera normal va de 21 a 45 dies. El cicle menstrual va parell al cicle ovàric, essent aquest últim un element fonamental en la regulació de les diferents fases del cicle menstrual. Podem parlar així, de tres fases del cicle menstrual (Figura 3) i de dos estrats de l'endometri: Fase Proliferativa (dies 6-14), Fase Secretora (dies 15-28) i Fase Menstrual (dies 1-5), mentre que els estrats endometrioides es divideixen en l'estrat basal (porció que roman després de la menstruació i que regenerarà l'estrat funcional) i l'estrat funcional (que es d'escama en cada cicle menstrual) ^{10, 12}.

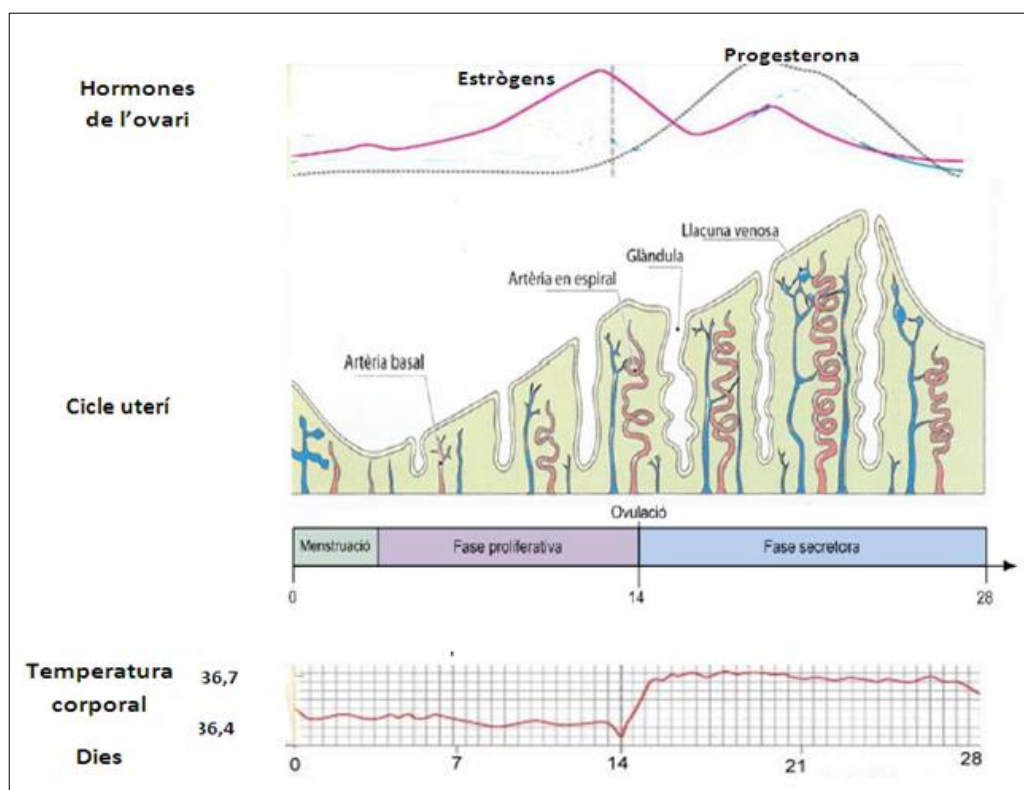


Figura 3. Esquema del funcionament del cicle menstrual. El control del cicle menstrual s'articula a partir de la regulació coordinada del cicle ovàric i el cicle endometrial. Els nivells d'estrògens augmenten en la fase proliferativa (dia 12-14) i els de progesterona o fan en la fase secretora, induint així la maduració de les glàndules epitelials, si no es produeix un embaràs, el dia 28 els nivells d'aquestes hormones i de les LH i FSH disminueixen. La maduració dels fol·licles ovàrics permet l'alliberament a la sang de les hormones que controlen l'evolució del cicle menstrual ¹⁴.

La **Fase Proliferativa** (dies 6-14) és la primera part del cicle menstrual, es caracteritza per un increment en els nivells d'estrògens, com a conseqüència la proliferació de l'endometri augmenta fet que resulta en el desenvolupament de les glàndules uterines. Aquest fenomen es deu a que, paral·lelament a aquesta fase, es desenvolupen en l'ovari els fol·licles ovàrics que secretaran i incrementaran la concentració d'estrògens en el torrent sanguini provocant que el recobriment de l'úter creixi i s'ampliï. En el dia 14 es produeix l'ovulació, el fol·licle madur expulsa l'òvul de l'ovari i surt a través de la trompa de Fal·lopi en aquest moment els nivells de concentració de l'hormona luteïnitzant (LH) i l'hormona fol·licle estimulant (FSH) són màxims. Posteriorment en l'ovari, les restes del fol·licle madur (o fol·licle de Graaft, en honor a l'anatomista holandès Regnier de Graaft) formaran el que es coneix com a *cos luti* constituït principalment per les cèl·lules luteíniques de la granulosa (externa i interna), de la Teca (externa i intern) i de l'estroma vascular.

Durant la **Fase Secretora** (dies 15-28) l'oòcit comença a desplaçar-se a través de la trompa de Fal·lopi cap a l'úter. Els nivells de progesterona secretada pel cos luti augmenten provocant que les glàndules uterines es tornin tortuoses i que les cèl·lules secretores expulsin productes rics en hidrats de carboni. Paral·lelament els vasos sanguinis també es tornaran més nombrosos per poder irrigar i nodrir així un endometri més complex, fet que ajuda a preparar el recobriment de l'úter pel possible l'embaràs. Si un oòcit és fecundat per un espermatozoide i si a més s'adhereix a la paret de l'úter, comença un embaràs. Si no es produeix l'embaràs, el dia 28, l'oòcit es dissol o és absorbit pel cos, que es prepararà per a crear un nou oòcit. En aquest moment els nivells d'estrogen, progesterona, LH i FSH disminueixen es produeix la regressió del cos luti, (**Fase Menstrual**) i el recobriment dilatat de l'úter, és a dir l'endometri que durant la fase proliferativa ha anat creixent, és es trenca i d'escama, els vasos sanguinis també es trenquen i tot és lliurat durant el període menstrual.

Durant la fase menstrual es perd l'epiteli superficial (estrat funcional) i és el primer que es regenerarà a partir de les cèl·lules epitelials de les glàndules uterines localitzades en l'estrat basal. La regeneració és produirà en l'inici del següent cicle menstrual (fase proliferativa).

L'endometri humà té una gran capacitat de regeneració; en cada cicle menstrual l'endometri passa d'un gruix d'uns 0.5-1 mil·límetres després de la menstruació, fins a un gruix d'uns 5-7 mil·límetres al final de la fase secretora ^{10,12}.

2. EL CARCINOMA D'ENDOMETRI

El carcinoma d'endometri (EC, **Endometrial Carcinoma**) és una malignització de les cèl·lules de l'endometri.

2.1 Epidemiologia

El EC és el tumor maligne del tracte genital femení més freqüent. Tot i que té bon pronòstic i la majoria d'ells són curables, és el causant de la tercera part de morts relacionades amb càncers ginecològics en els països desenvolupats ¹⁵, ja que entre un 15-20% dels EC diagnosticats mostren un fenotip agressiu ¹⁶. Segons dades de la UE, serà el sisè tipus de causa de mort per càncer en dones durant el 2013 ¹⁷. Aquest fet es deu, també, a que un cop disseminat o recidivat presenta molt mal pronòstic.

El EC es desenvolupa tant en dones pre- o peri-menopàusiques (15-25%), com en dones post-menopàusiques (75-85%) ¹⁸. L'edat afectada més comuna és entre els 50 i els 59 anys, i és estrany veure casos en dones de menys de 40 anys. La majoria dels tumors es detecten en fases inicials, per tant el pronòstic i la mortalitat estan disminuint.

2.2 Tipus de carcinomes endometrials

L'any 1983, Jan V. Bokhman va classificar els EC en dos tipus: tipus I i tipus II, atenent a les seves característiques clinicopatològiques (Figura 4) ¹⁹. Els EC de tipus I, també anomenats carcinomes d'endometri endometrioides (EEC, **Endometrioid Endometrial Carcinoma**), són tumors de baix grau, dependents d'estrògens, que ocorren en dones perimenopàusiques i postmenopàusiques recents, i coexisteixen o venen precedits per hiperplàsia endometrial complexa o atípica. Són aproximadament el 80% dels casos, de moderats a ben diferenciats, confinats al cós uterí en el moment

del diagnòstic i normalment amb un pronòstic favorable acompanyat d'una teràpia adient. Els de tipus II, també anomenats carcinomes d'endometri no endometrioides (NEEC, **N**on-**E**ndometrioid **E**ndometrial **C**arcinoma), representen el 10-20% dels casos, són tumors poc diferenciats i d'alt grau que normalment es desenvolupen en dones postmenopàusiques, seguint una via estrogen independent i originat-se a partir d'un endometri atròfic ^{20, 21}.

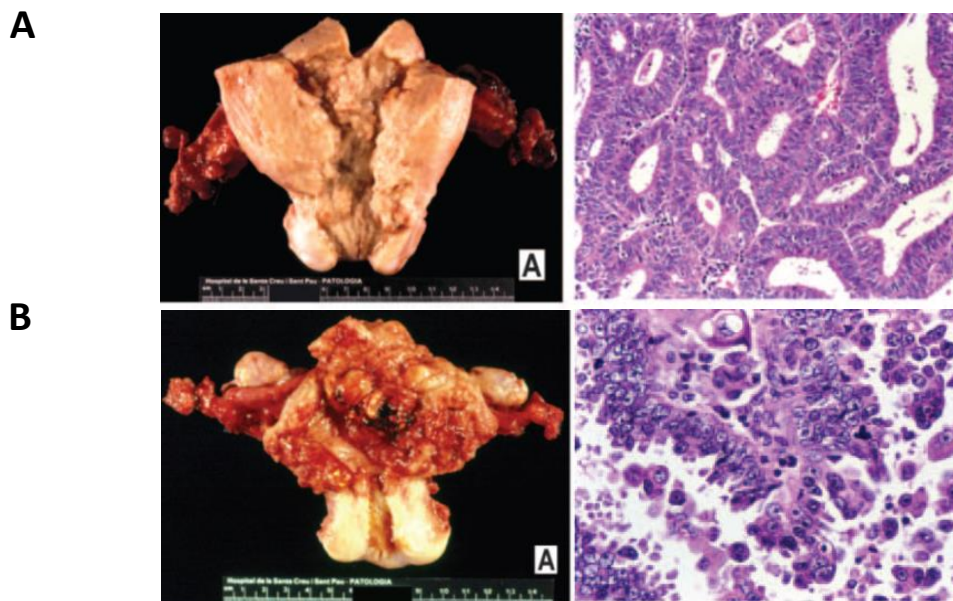


Figura 4. Tipus de EC. (A) Fotografia d'un EEC de grau I. El tall histològic mostra una citoarquitectura glandular normal, indicador de que el tumor està ben diferenciats. (B) Fotografia d'un NEEC de grau III, que ha envaït part del miometri. El tall histològic mostra una citoarquitectura atròfica, corresponent a un tumor d'alt grau i poc diferenciats.

Imatges extretes de l'arxiu del servei d'anatomia patològica de l'HUAV.

2.3 Alteracions moleculars del carcinoma d'endometri

Com molts càncers epitelials, el EC resulta de l'acumulació de diferents alteracions genètiques i epigenètiques en oncògens, gens supressors de tumors o gens involucrats en la reparació del DNA. Aquesta acumulació és la responsable de la transició d'un endometri normal a la hiperplàsia i al carcinoma. Un cop el tumor s'ha desenvolupat, noves alteracions moleculars tindran lloc en els diferents subclons del tumor. Aquestes

noves alteracions són les responsables de la heterogeneïtat, la invasió i la metàstasi tumoral.

Els estudis moleculars han proporcionat proves a favor d'aquest esquema de classificació mostrant els processos genètics que podrien estar involucrats en el desenvolupament i progressió d'ambdós tipus de carcinomes.

Els EC de tipus I o de tipus II presenten unes alteracions moleculars diferents. Els EEC es caracteritzen perquè presenten inestabilitat de microsatèl·lits (MI, **M**icrosatellite **I**nstability), mutacions en PTEN, PI3KCA, KRAS, β -catenina i en els gens de reparació dels aparellaments erronis del DNA, mentre que els de tipus II presenten inestabilitat cromosòmica, mutacions de p53 i l'amplificació de HER2/neu²²⁻²⁴. Aquestes alteracions poden aparèixer soles o coexistir amb altres en el mateix tumor (Figura 5). No obstant els esdeveniments moleculars precisos que succeeixen durant el desenvolupament del CE romanen sense caracteritzar i se'n té un escàs coneixement²⁰.

Donat que els EEC són majoritaris, i que és amb el que hem estat treballant en aquesta tesis, passarem a explicar les mutacions típiques d'aquests.

La MI juga un paper important durant la transformació del EEC en etapes inicials del tumor^{23, 24}. Aquesta s'associa a una deficiència del gens de reparació durant la còpia del DNA. Els microsatèl·lits són regions del DNA consistents en la seqüència de dos nucleòtids repetides en tàndem i degut a la seva naturalesa de nucleòtids són especialment susceptibles a sofrir mutacions. Normalment, les mutacions ocorregudes en els microsatèl·lits no tenen cap conseqüència biològica perquè la majoria estan en zones no codificants del DNA. Però algunes vegades hi ha insercions, encara que només siguin d'un nucleòtid en zones codificants i aquestes són perilloses. L'aparició d'aquestes mutacions estan associades a la progressió dels EEC. La MI apareix en un 20% dels EEC²³.

Els EEC també presenten mutacions de guany de funció en KRAS, en un 10-30% dels casos²⁵. Les mutacions en aquest gen ocorren normalment en els codons 12 i 13 i apareixen en estadis molt inicials del tumor (33-85%), sobretot, en aquells que també

presenten MI, tot i això solament apareixen en un 5% dels NEEC ²⁶. De fet, ja s'observa en les hiperplàsies. KRAS és una proteïna que pertany a la família de les proteïnes Ras, que participen en l'alteració de la via de les MAP cinases (MAPK).

El gen codificant per β -catenina (CTNNB1) és un gen que es troba mutat en el EEC, en un 30%. És una mutació que té lloc en moments més avançats del EEC. La β -catenina és un component del complex E-cadherina-catenina, el qual és essencial en la diferenciació i el manteniment d'una arquitectura tissular normal. Les mutacions de CTNNB1 provoquen una estabilització i una acumulació de β -catenina en citoplasma i nucli i participen en la transducció de senyal i l'activació transcripcional, a través de la formació de complexos de DNA-proteïnes unidores de DNA ²⁷.

Pel que fa a PTEN (**P**hosphatase and **TEN**sin homolog) que és un gen supressor de tumors, es troba mutat en el 30-60% dels EEC ²⁸. Es creu que pot ser per mutacions somàtiques, per pèrdua d'heterozigositat o per una desmetilació del promotor. La mutació en PTEN s'ha observat ja en les hiperplàsies, cosa que suggereix que és un fenomen inicial per al desenvolupament d'un EEC. Actua en sentit contrari a PI3K (**P**hosphatidylinositol **3**-Kinase), desfosforilant els PIP₃ en PIP₂, regulant negativament així la via de senyalització de la PI3K/Akt.

Finalment, la freqüent alteració de la via PI3K/Akt en el EEC, pot ser tant deguda a les alteracions observades en PTEN, com a mutacions de guany de funció de PI3K, induint la seva activació constitutiva ^{15, 29, 30}.

Així doncs sembla evident que en el EEC existeix una progressiva acumulació d'alteracions moleculars en el procés de transformació neoplàsica i progressió tumoral. Això explica el solapament que s'observa per algunes de les mutacions més freqüents (Figura 5) i indica que per la formació i progressió d'un carcinoma és necessària més d'una alteració.

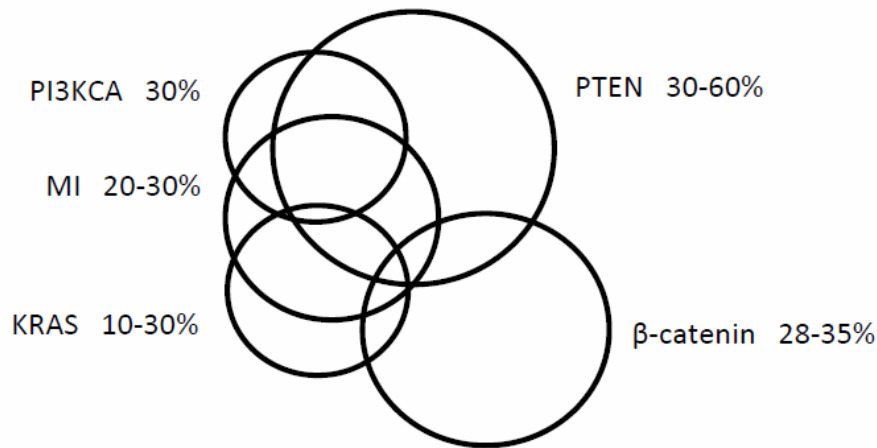


Figura 5. Principals alteracions moleculars dels EEC. Inestabilitat de Microsatèl·lits, mutacions en PTEN, β -catenina i KRAS. (Modificat de ²²).

2.4 Factors de risc associats a l'aparició del carcinoma d'endometri

Un factor de risc és aquell que canvia la seva probabilitat de manifestar una malaltia com el càncer. Els diferents tipus de càncers tenen diferents factors de risc. Alguns no es poden canviar com l'edat, raça o la genètica i altres estan relacionats amb decisions personals com fumar, l'alimentació, pes corporal o l'exercici. Tot i que hi ha certs factors que augmenten el risc d'una dona de manifestar CE, aquests no sempre causen de la malaltia. És un fet contrastat que en el CE no només les alteracions moleculars juguen un paper important en el desenvolupament del carcinoma, sinó que també existeixen diferents factors ambientals/biològics implicats en el procés (Taula 1) ³¹. Algunes dones amb un o més factors de risc mai desenvoluparan la malaltia i d'altres amb CE no presenten cap d'aquests factors de risc conegut.

| FACTORS DE RISC | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Menstruació precoç | Menopausa tardana |
| Longitud de cicles menstruals | Infertilitat o nul·liparitat |
| Obesitat | Factors hormonals |
| Teràpia amb estrògens prolongat | Dieta rica amb grasses animals |
| Diabetis | Hipertensió arterial |
| Càncer de mama i ovaris | Tractament amb Tamoxifen |
| Càncer de còlon hereditari | Radioteràpia pel·lica |
| Ovaris poliquístics | Hiperplàsia endometrial |
| Drogues antiscòtiques | |

Taula 1. Factors de risc. Factors de risc associats al desenvolupament del carcinoma d'endometri ^{21, 32}.

2.5 Estadificació i pronòstic del carcinoma d'endometri

Un cop el CE s'ha generat, aquest passa per diferents etapes fins arribar a l'etapa final, que és la metàstasi. Els especialistes utilitzen dos sistemes, per anomenar l'estadiatge del carcinoma (un cop s'ha extret mitjançant cirurgia) i així referir-se a com està d'estès; el sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics, 1981*) i el sistema de l'*American Joint Cancer Commission* (sistema TNM) mitjançant la utilització de les següents dades clíniques i histològiques: **"T"**: extensió del tumor; **"N"**: afectació dels ganglis limfàtics; **"M"**: presència o no de metàstasi a distància. Així, permet classificar els CE en els diferents estadis clínics, tal i com es mostra en la Taula 2.

| Factor | Sub-factor | Característiques |
|--------|------------|--|
| T | T0 | Sense senyals d'algun tumor en l'úter. |
| | Tis | Tumor localitzat a la superfície de l'endometri, carcinoma in-situ (lesió pre-cancerígena). |
| | T1 | El tumor sols és troba en el cos de l'úter, pot també estar en les glàndules del cervix, però no al teixit connectiu d'aquest. T1a: el tumor es troba a l'endometri, però pot estar començant a envair el miometri (menys de la meitat). T1b: el tumor no s'ha estès més enllà del cos de l'úter, però ha passat al miometri (més de la meitat). |
| | T2 | El tumor no s'ha estès més enllà del cos de l'úter, però està creixent al teixit connectiu del cervix. |
| | T3 | El tumor s'ha estès més enllà del cos de l'úter, però no ha envaït la part del recte o de la bufeta. T3a: el tumor es troba a la superfície exterior de l'úter (serosa) i/o les trompes de fal·lopi i/o els ovaris. T3b: el tumor s'ha estès cap a la vagina o cap als teixits que es troben al voltant de l'úter (parametri). |
| | T4 | El tumor s'ha estès a la paret interna de la bufeta o del recte. |
| N | NX | La possible extensió als ganglis limfàtics adjacents no es pot avaluar. |
| | N0 | El tumor no s'ha estès als ganglis limfàtics. |
| | N1 | El tumor s'ha estès als ganglis limfàtics de la pelvis. |
| | N2 | El tumor s'ha estès als ganglis limfàtics al llarg de l'aorta. |
| M | M0 | El tumor no s'ha estès als ganglis limfàtics (distants), òrgans o teixits |
| | M1 | El tumor s'ha estès als ganglis limfàtics (distants), a l'abdomen superior i altres òrgans (fetge, pulmó) |

Taula 2. Classificació del CE d'acord amb la *FIGO* i la *AJCC.*, segons les dades clíniques i histològiques en relació amb les característiques del tumor ^{21, 33, 34}.

El sistema d'estadificació (Taula 3) és basa amb com s'ha estès el tumor. És pot haver estès *localment* al cervix o en altres parts de l'úter. Es pot haver estès

regionalment als ganglis limfàtics veïns (que formen part del sistema immune). Aquests ganglis es troben a la pelvis i més llunyà al llarg de l'aorta (artèria principal que va des del cor cap avall al llarg de la part posterior de l'abdomen i la pelvis), s'anomenen ganglis para-aòrtics. Finalment, el tumor pot metastatitzar als ganglis limfàtics llunyans (del tumor primari), a la part superior de l'abdomen, l'epipló (replec peritoneal que cobreix l'estómac i intestins) o a altres òrgans com el fetge, pulmons, ossos o cervell.

| Estadi | Sub-estadi | Característiques | Pronòstic (Supervivència) |
|--------|------------|---|---------------------------|
| 0 | | Tumor localitzat a la superfície de l'endometri, <i>carcinoma in-situ</i> (lesió pre-cancerígena). | > 95% |
| I | IA | Tumor solament limitat a l'endometri. | 95% |
| | IB | Tumor envaint menys de la meitat del miometri. | |
| | IC | Tumor envaint més de la meitat del miometri. | |
| II | IIA | Tumor afectant l'endocèrvix sols fins la capa glandular. | 80% |
| | IIB | Tumor afectant l'estroma cervical. | |
| III | IIIA | Tumor envaint la membrana serosa o els annexos (trompes de fal·lopi, ovaris i lligaments de l'úter), la citologia peritoneal pot ser maligna. | 30% |
| | IIIB | Metàstasis vaginal o fins el parametri. | |
| | IIIC | Metàstasis cap a la pelvis o cap als ganglis limfàtics para-òrtics. | |
| IV | IVA | Tumor envaint la bufeta urinària o l'aparell digestiu. | < 5% |
| | IVB | Metàstasis a distància, incloent els ganglis limfàtics intra-abdominals o inguinals. | |

Taula 3. Classificació del CE d'acord amb la FIGO i la AJCC, segons les dades clíniques i histològiques en relació amb les característiques del tumor^{21, 33, 34}.

3. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA

El cos humà d'una persona adulta genera al voltant de 60 bilions de cèl·lules cada dia i a la vegada un nombre similar moriran cada dia per assegurar l'homeòstasi tissular mitjançant un procés altament regulat i irreversible que condueix a la pèrdua de la funció cel·lular conegut com a mort cel·lular programada (PCD, **Programmed Cell Death**). Aquest procés, regulat genèticament ^{35, 36}, i caracteritzat per presentar canvis morfològics, bioquímics i moleculars es coneix avui dia com a **apoptosi** ³⁷. L'apoptosi és un procés conservat evolutivament, ordenat, sincronitzat i ràpid (entre 4 i 6 hores) en resposta a un estrès cel·lular que pot ser tant fisiològic com patològic ^{38, 39}. A més, l'apoptosi juga un paper clau durant el desenvolupament embrionari, en processos proliferatius i permet el correcte funcionament del sistema immune. L'apoptosi inhibeix les funcions principals de la cèl·lula i la condueix a una fagocitosi ³⁸. A través d'aquest procés s'eliminen de manera controlada cèl·lules lesionades, velles, ectòpiques i potencialment perilloses, de fet l'apoptosi és el tipus de mort cel·lular més comuna en el cos humà ⁴⁰. Cal apuntar, però, que aquest tipus de mort no existeix en plantes, eucariotes simples o microbis ^{41, 42}.

3.1 Una mica d'història

Les primeres descripcions per a aquest fenomen les van realitzar Walther Flemming l'any 1885, el qual va descriure els trets típics d'aquesta mort i William Councilman al 1890, va assenyalar la presència de cossos acidòfils vacuolitzats en el fetge de pacients amb febre groga. Més tard, al 1914, Robert Schröder va descriure la presència de partícules amb cromatina pignòtica en les glàndules endometrials dos o tres dies abans de l'inici de la menstruació. No va ser fins el 1965 que el patòleg John Kerr juntament amb el Alister Currier van fer una descripció detallada d'aquesta forma de mort cel·lular i s'estableixen les bases per a l'estudi formal d'aquest fenomen. En l'estudi original aquests investigadors descriuen els canvis histològics que presenten les cèl·lules de fetge dels rosegadors després de que se'ls hi hagi lligat la vena porta. La zona pròxima a aquest vas sanguini presentava cèl·lules necròtiques, mentre que les cèl·lules del voltant presentaven una altra morfologia: estaven encongides, la cromatina estava molt condensada i les seves membranes i orgànuls estaven intactes

⁴³. Van ser aquests mateixos investigadors els quals al 1972 van implantar el terme apoptosi que va substituir al de “necrosis per encongiment”, fins llavors utilitzat ⁴⁴. En els anys 80, H. R. Horvitz va ser el primer en desvelar els aspectes més fonamentals de la biologia de l’apoptosi. Utilitzant com a model el nemàtode *Caenorhabditis elegans*, va identificar un gran nombre de gens involucrats en l’apoptosi que s’han conservat al llarg de l’evolució i que presenten homologia amb gens de mamífer (Figura 6) ^{35, 45, 46}.

| | Death receptors ← | Adaptors ← | 1. Level caspases | Regulators → | | 2. Level caspases |
|-------------------|---|---|--|--|---|--|
| <i>C. elegans</i> | ? | ? | ? | CED-9 | CED-4 | CED-3 |
| Humans | CD95/APO-1/Fas TNF-R1 DR3/TRAMP/ wsl-1/APO-3/LARD DR4/APO-2/TRAIL-R | FADD/MORT1 TRADD MADD RAIDD/CRADD RIP | caspase-8 caspase-10 caspase-2 (caspase-1-like caspases) | <u>Inhibitors</u> Bcl-2 Bcl-x _L A1 Mcl-1 Bcl-w | <u>Promotors</u> Bax Bik/Nbk Bak Bad Bid | Apaf-1 caspase-3-like caspases |

Figura 6. Taula representativa dels gens reguladors d’apoptosi en C. Elegans i els seus homòlegs en humans. Als humans existeix la proteasa “ICE like” (casapase-3-like caspases), que forma una família de proteases suïcides i és homòloga a la proteïna Ced-3 dels nematodes, també s’observa homologia amb els gens Ced-9 dels nematodes i Bcl-2 de mamífers, ambdós gens inhibidors de l’apoptosi. ⁴⁵.

La paraula apoptosi deriva del grec **apo** que significa separació o derivació i **ptosis**, caiguda. Aquest terme s’utilitzava a la Grècia antiga per a descriure la caiguda dels pètals de les flors i la caiguda a la tardor de les fulles dels arbres. Aquest terme ressalta el caràcter fisiològic de l’apoptosi, ja que implica que, per a que un organisme funcioni correctament, no sols ha de tenir la capacitat de produir noves cèl·lules, sinó que també ha de tenir l’habilitat d’eliminar aquelles que ja no són capaces de complir amb la funció que tenen assignades.

En les últimes dècades l’apoptosi ha estat tema de creixent atenció en la biologia cel·lular i en l’estudi del desenvolupament dels organismes, així com en la investigació de malalties tals com el càncer. Així ho demostra el fet que el premi Nobel l’any 2002 per a Fisiologia i Medicina anés atorgat a Sydney Brenner (Gran Bretanya), H. Robert

Horvitz (EE.UU.) i John I. Sulston (GB) "pels seus descobriments concernents a la regulació genètica del desenvolupament d'òrgans i la mort cel·lular programada".

A partir d'aquí, dècades d'estudi han permès identificar i caracteritzar múltiples proteïnes i vies de senyalització implicades en la regulació de l'apoptosi i descobrir, també, que una apoptosi inadequada pot tenir com a conseqüència el desenvolupament de processos patològics com, per exemple, malalties cardiovasculars, malalties neurodegeneratives (Alzheimer, malaltia de Huntington), desordres autoimmunes o càncer^{39, 47}. A més a més, l'acumulació d'alteracions en vies apoptòtiques pot inhibir l'execució de l'apoptosi induïda per agents antitumorals, aquest fet provoca que els tumors es facin resistents a les teràpies convencionals⁴⁸.

3.2 Etapes en l'apoptosi

Quan s'observa al microscopi el procés d'apoptosi es caracteritza pel fet que la cèl·lula s'encongeix i redueix el seu volum total, es torna més densa i adopta una morfologia arrugada a la qual se li associen canvis específics en el nucli i citoplasma (Figura 7).

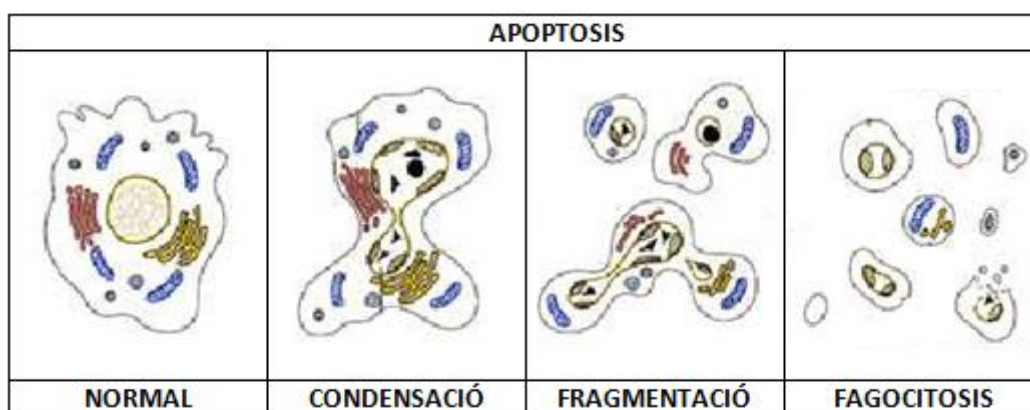


Figura 7. Representació de les diferents etapes de canvis morfològics que segueix un procés apoptòtic. Adaptació de^{49, 50}.

L'apoptosi presenta les següents característiques i unes fases molt concretes:

NORMAL:

1. Activació dels receptors d'apoptosi; quan la cèl·lula ha complert les seves funcions, normalment de desenvolupament, s'ha d'eliminar.

CONDENSACIÓ:

2. El nucli canvia notablement de forma, s'encongeix (pigrosi) i s'observa com la cromatina, que normalment està en forma d'eucromatina (indicant activitat transcripcional de l'ADN) comença a concentrar-se formant cromatina condensada o heterocromatina (indica que l'ADN no s'està transcrivint).

FRAGMENTACIÓ:

3. Condensació nuclear i citoplasmàtica molt densa (els nuclèols es desintegren i es redueix la mida del nucli, falta total de l'activitat transcripcional de l'ADN, falta de síntesis d'RNA missatger, ribosòmic i de transferència, com a conseqüència hi haurà una impossibilitat de síntesi proteica).
4. Mort i fragmentació cel·lular (els orgànuls es condensen i el reticle endoplasmàtic es dilata).
5. Pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial.

FAGOCITOSIS:

6. Formació de cossos apoptòtics, en lloc d'inflar-se o rebentar, i per tant, vessar el seu contingut intracel·lular nociu enzimàtic, cap a l'espai extracel·lular, el nucli i el citoplasma es fragmenten i s'encapsulen en vesícules envoltades de membrana, *blebbing*, i així eviten una inflamació.
7. D'aquesta manera, poden ser eficientment englobades via fagocitosis i, conseqüentment, els seus components són reutilitzats per macròfags o per cèl·lules del teixit adjacent.

De manera paral·lela a aquest canvis morfològics, la cèl·lula apoptòtica experimenta una sèrie de canvis bioquímics que s'utilitzen com a marcadors de les diferents etapes de l'apoptosi.

En el procés d'apoptosi podem distingir tres fases ⁴⁹:

1.- **Fase Iniciadora.** Els factors inductors d'apoptosi entren en contacte amb la cèl·lula i desencadenen una sèrie de respostes intracel·lulars diferents per cada estímul, que transmeten la senyal a la maquinària apoptòtica.

2.- **Fase Executora.** Un cop integrada la resposta als estímuls, la cèl·lula pren la decisió de morir. En aquest punt, moment en que el procés és irreversible, s'activen en forma de cascada les proteïnes efectores de l'apoptosi, les caspases, que són proteases encarregades de la destrucció cel·lular.

Aquest és el punt de convergència de gairebé totes les senyals inductores d'apoptosi.

3.- **Fase destrucció.** L'activació de la maquinària efectora de mort fa que la cèl·lula perdi la seva integritat i presenti els canvis bioquímics i morfològics típics de l'apoptosi. La externalització del lípid de membrana plasmàtica fosfatidilserina, el qual funciona com un senyal que és reconegut per les cèl·lules fagocítiques per tal de fagocitar cèl·lules apoptòtiques.

L'apoptosi és, per tant, un mecanisme que ha d'ésser estrictament controlat en múltiples nivells dins la pròpia cèl·lula ja que alteracions que afectin tant l'execució com a la captació dels estímuls adients poden tenir conseqüències greus en la viabilitat cel·lular.

El mecanisme intern que constitueix la mort cel·lular per apoptosi es pot desencadenar per estímuls d'origen extracel·lular i intracel·lular, és a dir, les vies clàssiques de mort apoptòtica són aquelles que transcorren a través de la via extrínseca o dels receptors de mort i a través de la via intrínseca o via mitocondrial. En

aquestes dues vies i participen unes proteïnes anomenades caspases, que ja he anomenat anteriorment. Hi ha també una altra via menys coneguda anomenada mort cel·lular independent de caspases. Com el seu nom indica és una via que transcorre sense la participació de les caspases, sinó que requereix l'activació d'altres proteïnes.

3.3 Mort cel·lular depenent de caspases

3.3.1 Estructura i funció de les caspases

La maquinària executora de l'apoptosi està constituïda principalment per unes proteases pertanyents a la família de les caspases (**Cystein Aspartae proteases**). Tal com ja s'ha esmentat amb anterioritat, aquestes proteïnes presenten una elevada homologia entre elles i estan altament conservades evolutivament des dels nematodes, hidres i insectes fins als humans ⁵¹.

Les caspases són proteïnes clau en la transducció i execució de la senyal apoptòtica induïda per una diversitat d'estímuls. Les caspases es regulen a nivell post-traduccional assegurant una ràpida activació en el moment precís i necessari. La majoria de les caspases s'expressen de manera constitutiva com a enzims inactius anomenats procaspases, localitzats en el citosol cel·lular o també, segons alguns estudis, en el mitocondri ⁵². Les caspases estan formades per un prodomini N-terminal (2-32kDa), una subunitat llarga (17-21kDa) que conté el centre actiu amb un residu cisteïna i una subunitat petita (10-13kDa) (Figura 8). Durant el transcurs de l'apoptosi seran activades per talls proteolítics en punts concrets de la seva seqüència aminoacídica i seran responsables de molts canvis morfològics i bioquímics de l'apoptosi ^{53, 54}. Les caspases a la vegada tallaran altres substrats, sempre després d'un residu aspàrtic ⁵⁵. Un cop processada i alliberada la forma catalíticament activa aquesta es presenta com a un tetràmer. ⁵⁶⁻⁵⁹.

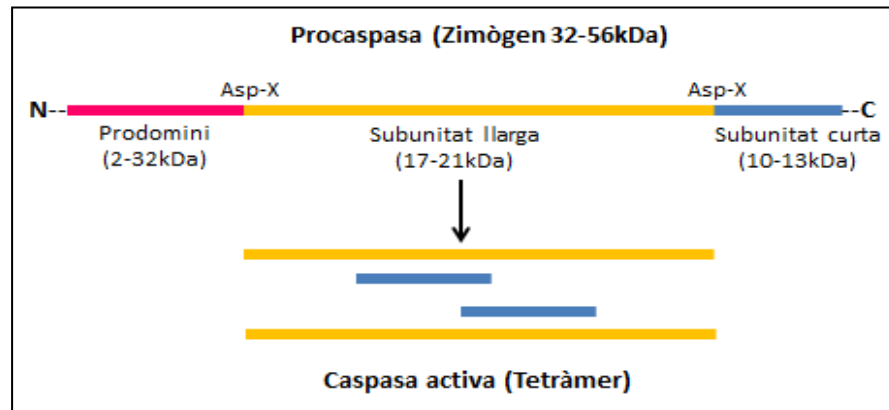


Figura 8. Esquema del processament d'una caspasa. Representació de la forma inactiva i la forma del tetràmer final un cop activada.

3.4 Tipus de caspases

S'estableix una classificació en funció del mecanisme d'activació per processament i en relació a la seva funció pro-apoptòtica (Figura 9). Set de les catorze caspases conegudes en mamífers participen en l'apoptosi, i es classifiquen en tres tipus^{9, 59}.

- **Caspases iniciadores;** s'activen quan hi ha un tall proteolític (autoprotòlisi) en la seva pro-forma inactiva, en aquest grup s'hi troba: CASP2, CASP8, CASP9 i CASP10. Es caracteritzen per tenir un prodomini més gran que les efectores, com per exemple el prodomini DED (**D**eath-**E**ffector **D**omain) o el prodomini CARD (**C**aspase-**R**ecruitment **D**omain) que permet a aquestes caspases interaccionar amb altres molècules per regular-ne la seva activació. Aquestes molècules són proteïnes adaptadores de receptors de membrana com CD-95 (**C**luster of **D**ifferentiation **95**) o TNFR-1 (**T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor-**1**) o proteïnes citosòliques com Apaf-1 (**A**poptotic-**p**rotease-**a**ctivating **f**actor-**1**) que responen a estímuls externs i que per tan serà l'inici de la cascada inductora d'apoptosi. Aquest tipus de caspases són les que activaran les caspases executores.
- **Caspases executores;** són activades a través d'un tall específic produït per les caspases iniciadores, en aquest grup s'hi troba: CASP3, CASP5 i CASP6. Són les que degradaran múltiples substrats.
- **Caspases inflamatòries;** no relacionades amb l'apoptosi.

3.5.1 Via extrínseca o dels receptors de mort

La via extrínseca de l'apoptosi, també coneguda com la via dels receptors de mort és la responsable de l'eliminació de cèl·lules durant el desenvolupament embrionari, de la regulació del sistema immune pel que fa a la seva maduració i a l'eliminació de les cèl·lules tumorals. L'estímul extracel·lular més freqüent, durant el desenvolupament, és la falta de factors tròfics encarregats de mantenir la funcionalitat cel·lular. Aquesta via s'inicia per unió de lligands extracel·lulars a receptors de superfície ^{60, 62} (Figura 11). Es tracta de lligands de superfície, entre les que destaquen les molècules de la superfamília del TNF, que activen la via a través de la seva unió a receptors específics de la membrana cel·lular (apoptosi induïda per activació de receptor/ligand) i no per la falta d'estímuls de supervivència.

La via extrínseca o dels "receptors de mort" estableix connexions amb l'espai extracel·lular, rebent senyals pro-apoptòtiques des de l'exterior i de les cèl·lules veïnes cap a l'interior de la cèl·lula.

Dins d'aquesta gran família els receptors més coneguts són: TNFR-1, Fas o CD95, els seus lligands FasL o CD95L i els receptors DR-4 i DR-5, (**D**eath **R**eceptor **4** i **5**) ⁶³. Tots aquests receptors de mort posseeixen un domini intracel·lular a C-terminal anomenat DD (**D**eath **D**omain). Quant un lligand, com TRAIL (**T**NF-**R**elated **A**poptosis-**I**nducing **L**igand) s'uneix a aquests receptors es pot produir la mort per apoptosi de la cèl·lula que els posseeix (Figura 10).

El receptor de mort més estudiat i rellevant és Fas i el seu lligand, FasL (CD95L); FasL s'uneix a Fas en la mateixa cèl·lula o en cèl·lules adjacents, formant-se grups de tres o més molècules de Fas. A causa d'aquesta agregació, s'indueix el reclutament del complex DISC (**D**eath-**I**nducing **S**ignalling **C**omplex) on els dominis de mort intracel·lulars DD d'aquests receptors agrupats per Fas s'uneixen a una proteïna adaptadora anomenada FADD (**F**as-**A**ssociated protein with **D**eath **D**omain) que conté un altre domini de mort DED ⁶⁴. FADD recluta la forma inactiva de la caspasa-8 (també amb un DED), formant el complex DISC ^{5, 65}. La caspasa-8 experimenta una autoactivació catalítica i és alliberada del DISC al citoplasma formant un heterotetràmer de

dos unitats grans i dos de petites i és llavors quan és capaç d'activar les caspases efectores 3,6 i 7^{9, 63, 65} (Figura 10 i 11).

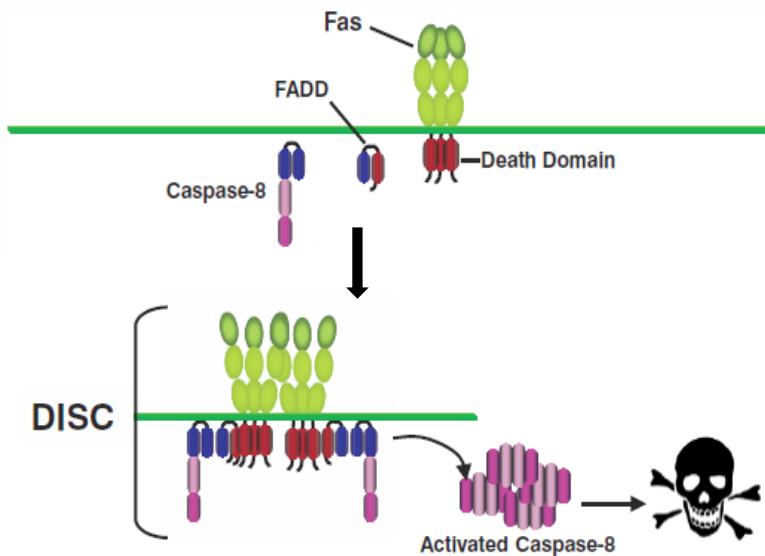


Figura 10. Formació del complex DISC.

Reorganització de les molècules, Fas, FADD, Caspase-8 i els dominis de mort, involucrades en la formació del complex DISC. Adaptat de ⁵.

La inhibició d'aquesta ruta es realitza per proteïnes que contenen dos DED i que s'uneixen al complex CD95-FADD. Estem parlant, per exemple, del regulador negatiu de la via extrínseca FLIP_L (**FLICE**-inhibitory proteins). FLIP_L és una proteïna homòloga a caspasa 8, però li manca la cisteïna del domini catalític, la qual cosa fa que FLIP_L no tingui activitat proteolítica ^{61, 66}. Els nivells d'aquesta proteïna poden tenir dos efectes oposats, pro-apoptòtic o anti-apoptòtic ⁶⁷. Sembla ser que nivells baixos de FLIP_L puguin induir apoptosi, activant la caspasa 8 i que nivells alts de FLIP_L puguin inhibir l'activació de caspasa 8, degut a la competició amb la caspasa 8 per unir-se a FADD en el DISC ^{61, 68, 69}. Apart, també hi ha l'evidència de que FLIP_L pot formar heterodímers amb caspasa 8 amb activitat catalítica, activant-la per dimerització ^{66, 70-74} (Figura 11).

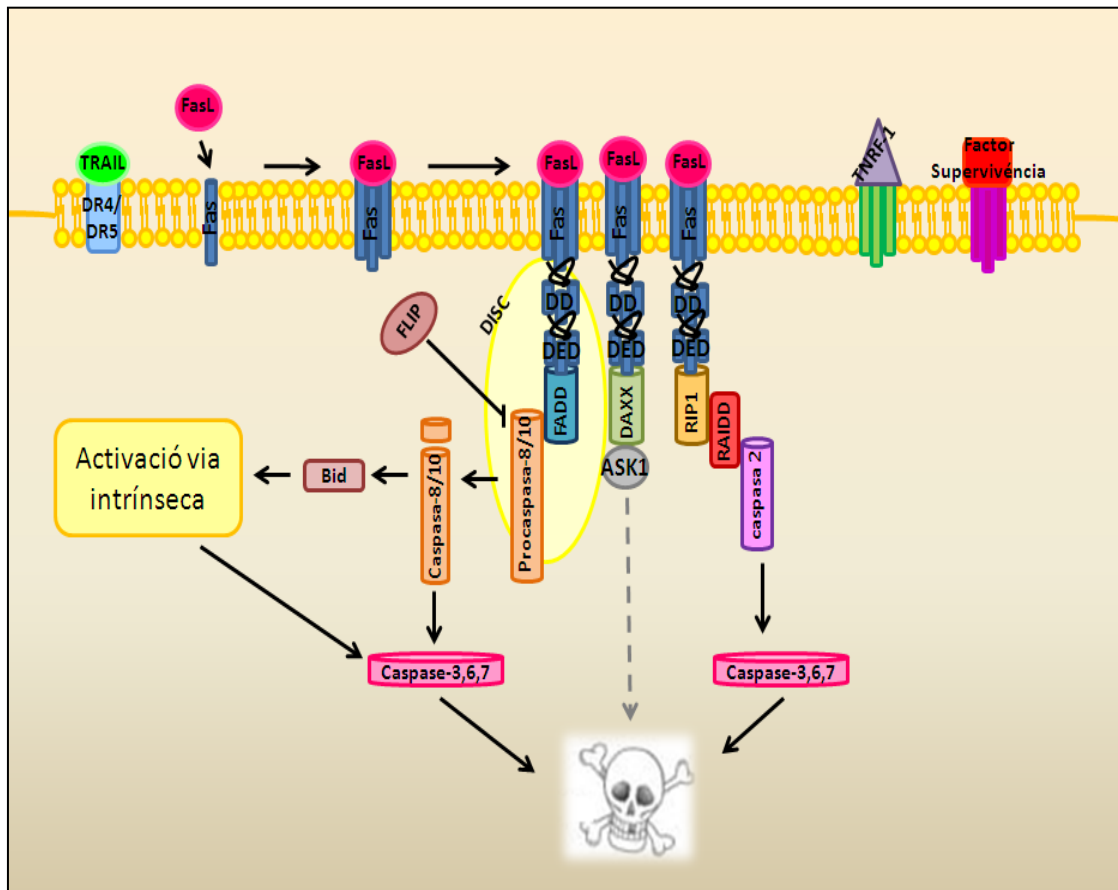


Figura 11. Via de senyalització extrínseca induïda per Fas i on s'observa els diferents receptors i lligands de la superfamília del TNF. Els receptors FasL, DR4 i DR5, un cop activats, reclutaran FADD, mentre que TNFR1 i DR3 reclutaran TRADD (TNFR-associated death domain).

Adapatat de ^{38, 63, 75, 76}.

3.5.2 Via intrínseca o mitocondrial

La major part d'apoptosi vista en cèl·lules de vertebrats transcorre a través de la via intrínseca ⁷⁷ (Figura 12). En aquesta via, el mitocondri hi juga un paper fonamental. Aquesta via pot ésser activada per una gran varietat d'estímuls, com per exemple, els fàrmacs quimioterapèutics, radiació ultraviolada, hipòxia, estrès oxidatiu, l'expressió de missatges genètics de suïcidi cel·lular o que la cèl·lula no passi els controls – *check-points* – per entrar en mitosis.

Un cop la cèl·lula ha rebut el senyal de morir s'activen un grup de proteïnes que produeixen canvis en el mitocondri. El pas clau en aquest procés és la permeabilització

del mitocondri; és produeixen porus en la membrana externa dels mitocondris, que resulta en la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial (MMP, **Mitochondrial Membrane Perturbation**)^{77, 78}, i permet l'alliberament de nombroses proteïnes a l'espai citosòlic; entre elles, les proteïnes inductores d'apoptosi anomenades AIF (**A**poptosi **I**nducing **F**actor), l'endonucleasa EndoG (**E**ndonuclease **G**, mitochondrial), Diablo/Smac (**S**econd **m**itochondria-derived **a**ctivator of **c**aspases) i el citocrom C⁷⁹⁻⁸¹ (Figura 12).

El citocrom C, una vegada al citosol, s'uneix a Apaf-1, en presència d'ATP, activa un complex multiproteic heptamèric anomenat apoptosoma⁸⁰⁻⁸². L'apoptosoma és una roda de set braços, amb un nucli central que conté el domini de reclutament de la procaspasa 9, que està unit al domini CARD de Apaf-1 i amb una molècula de citocrom C a cada braç^{82, 83}. Es creu que l'activació de la caspasa 9 és anàloga a l'activació de la caspasa 8, es a dir, a través d'una transició de monòmer a dímer. L'apoptosoma activa directament la procaspasa-9. Una vegada que la caspasa-9 està activada, aquesta proteolitza i activa a les caspases efectores com la caspasa-3, 6 i 7 que són les principals responsables dels canvis bioquímics i morfològics que tenen lloc en la cèl·lula en les últimes fases de l'apoptosi, alguns dels seus substrats són proteïnes del citoesquelet, de la membrana nuclear o bé encarregades de la reparació del DNA (Figura 12)^{84, 85}.

A més de la sortida de citocrom C des del mitocondri, una altra proteïna anomenada Diablo/Smac, que és inhibidor dels inhibidors de caspases IAPS (**I**nhibitor of **A**poptosi **P**rotein) surt de la mateixa. Així es té una via en la qual la caspasa efectora està lliure d'actuar (atès que els seus inhibidors van ser neutralitzats per Diablo/Smac)⁷⁹⁻⁸¹ (Figura 12).

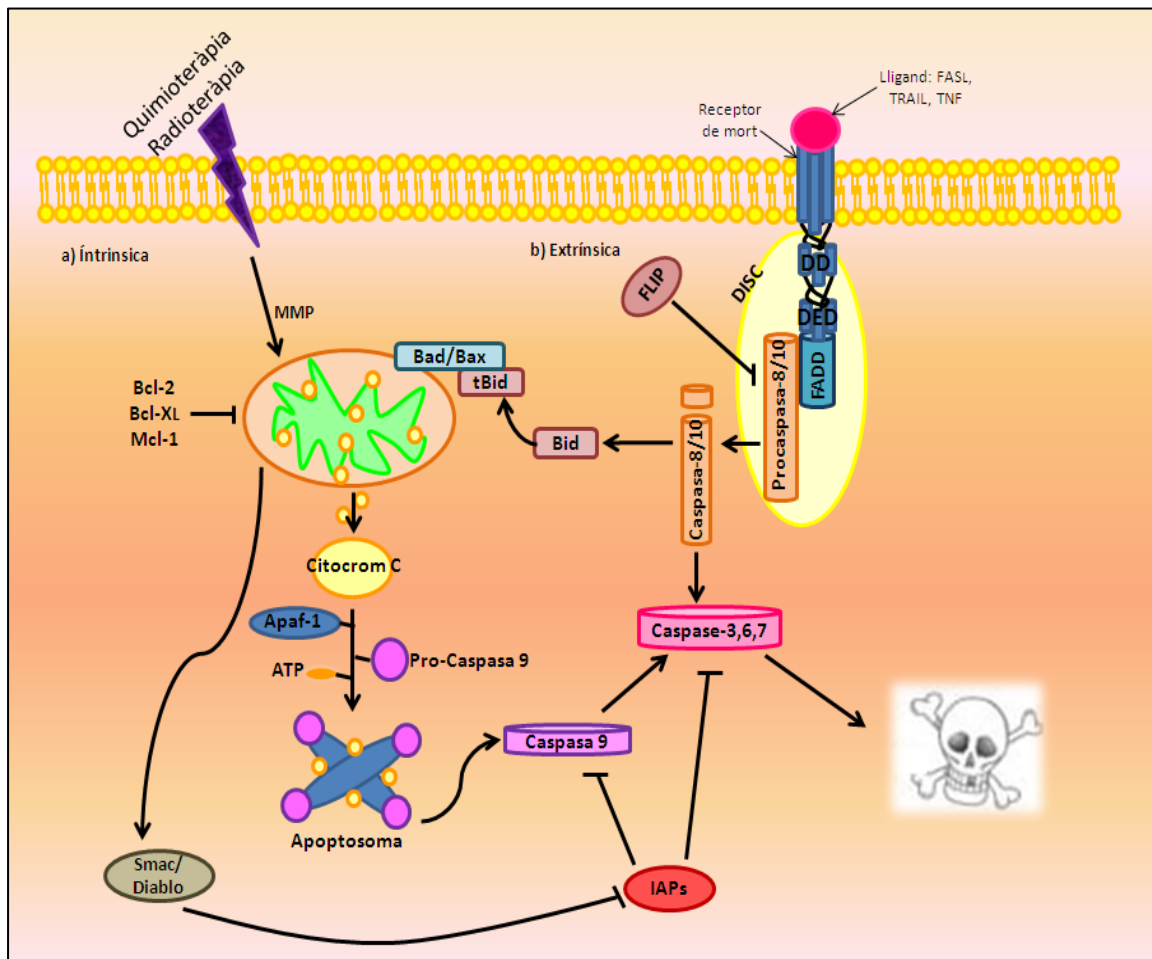


Figura 12. Activació de la via mitocondrial gràcies a la formació de l'apoptosoma. Els estímuls apoptòtics, com agents quimioterapèutics o radioteràpia provoquen l'alliberament de citocrom C. Aquest s'uneix a l'Apaf-1 i a la pro-caspasa-9, aquesta unió indueix un canvi conformacional en Apaf-1, permetent la unió de l'ATP (Adenosin Triphosphate). Aquest fet causa la seva oligomerització formant l'apoptosoma i alliberant la caspasa-9 que més tard activarà les caspases executores com la caspasa 3, 6 o 7. La via extrínseca a través de l'alliberament de Bid (BH3 interacting-domain death antagonist) per part de la caspasa-8/10, i de la unió d'aquest amb Bax (Bcl-2 associated X protein)/Bad (Bcl-2 associated death promoter) també pot activar la via intrínseca. La via intrínseca és pot veure inhibida per la presència de factors de supervivència i proteïnes com Bcl-2, Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) i Mcl-1. Adaptat de ^{38, 75, 76, 85}.

3.6 Convergència entre vies

Les vies extrínseca i intrínseca de l'apoptosi no són independents sinó que convergeixen a nivell de les caspases 3 i 7 (Figura 13) ⁸⁶. La caspasa 9 de l'apoptosoma

de la via intrínseca queda inhibida per les proteïnes de la família de les IAPs, la més important de les quals és XIAP (**X**-linked Inhibitor of **A**ppoptosi Protein). Alhora, aquestes proteïnes inhibidores estan inhibides per la proteïna Diablo/Smac que és alliberada juntament amb citocrom C⁸⁷. Cal tenir en compte que en la majoria de les condicions, aquest solapament és mínim, i les dues vies operen de manera independent⁸⁸.

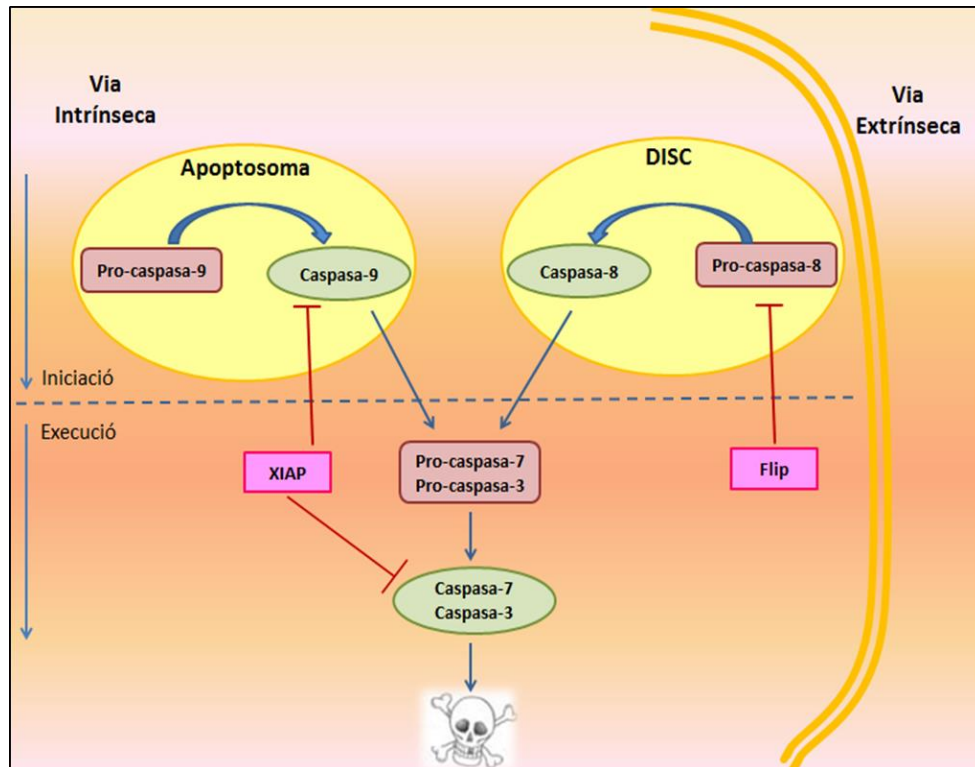


Figura 13. La cascada proteolítica de les caspases en la iniciació i l'execució de l'apoptosi.

Tant la via extrínseca com la via intrínseca de l'apoptosi utilitzen principis relacionats per a detectar les senyals apoptòtiques i executar l'apoptosi. En la via intrínseca es forma l'apoptosoma, el qual activa la caspasa 9, mentre que en la via extrínseca és forma el DISC, el qual activa la caspasa 8. Un cop activades les caspases 9 i 8, aquestes activen les caspases 3 i 7 per tall. En totes dues vies existeixen inhibidors de l'apoptosi. Per una banda FLIP bloqueja l'activació de la caspasa 8 en el DISC, XIAP pot bloquejar la fase iniciadora (caspasa 9) i la fase executora (caspases 3 i 7). Adaptat de⁸⁷.

3.7 Proteïnes reguladores de l'apoptosi

3.7.1 Família de Bcl-2

Bcl-2 (**B Cell Leukemia/Lymphoma 2** gene) va ser el primer pro-oncogen detectat i es va associar amb processos malignes de les cèl·lules B ⁸⁹. Durant la maduració de les cèl·lules B pot tenir lloc una translocació cromosomal en el gen Bcl-2; aquest fet provoca un augment en l'expressió de la proteïna citoplasmàtica Bcl-2, que provoca la inhibició de l'apoptosi en les cèl·lules B i resulta amb la supervivència de la cèl·lula transformada. Està demostrat que la sobre expressió del gen Bcl-2 en limfomes induïts experimentalment, s'associa amb la proliferació neoplàsica provocada pels efectes inhibidors de Bcl-2 sobre les vies d'apoptosi ⁹⁰. Per contra, els experiments antisentit demostren que la reducció de Bcl-2 feia les cèl·lules més sensibles a l'apoptosi però que en si mateix era insuficient per causar la mort cel·lular ⁹¹⁻⁹³. Aquest gen facilita l'augment de la supervivència de la cèl·lula transformada i d'aquesta manera augmenta la possibilitat de futurs errors genètics que poden induir una progressió maligna. L'expressió d'aquest gen en alguns tipus de càncers és un marcador de mal pronòstic.

3.7.1.1 Classificació

Tal i com s'ha dit anteriorment el gen Bcl-2 forma part d'una família de gens que intervenen en la regulació de la supervivència de la cèl·lula (Figura 14).

En mamífers hi ha una vintena de proteïnes de la família Bcl-2, incloent la proteïna Bcl-2 i altres proteïnes que tenen una estructura tridimensional similar o bé una estructura secundària predita, que és similar a Bcl-2. Aquestes proteïnes s'anomenen homòlogues de Bcl-2 i presenten un gran ventall d'activitats com la inhibició o la promoció de l'apoptosi ^{90, 94}. Aquest grup tenen en comú la presència d'un domini conservat homòleg a Bcl-2, el **BH (Bcl-2 homology domain)**, els seus membres contenen dominis BH1, BH2, BH3 i BH4 (**Bcl-2 homology domain 1, 2, 3 i 4**).

Apart, també existeixen unes proteïnes de la família Bcl-2, anomenades *BH3-only*, que només presenten el motiu BH3 ⁹⁵. Les proteïnes d'aquesta subfamília, excepte Bid, presenten una estructura que no sembla estar relacionada evolutivament amb els

membres de la família Bcl-2, però totes les proteïnes BH3 interaccionen i regulen les proteïnes de la família Bcl-2 per promoure l'apoptosi.

El destí d'una cèl·lula de morir o sobreviure bé determinat per les diferències en expressió d'aquestes proteïnes, actuant algunes com a promotores i altres com a inhibidores de les senyals apoptòtiques.

3.7.1.2 Les proteïnes homòlogues a Bcl-2

Fins l'actualitat es coneix un total de 25 proteïnes homòlogues a Bcl-2. La seva funció és de regular la permeabilització de la membrana externa del mitocondri. Les proteïnes pertanyents a aquesta família tenen efectes oposats, és a dir, mentre Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A1, Mcl 1, Bcl-RAMBO, Boo i Bcl-G són denominades proteïnes anti-apoptòtiques, Bax, Bad, Bak i Bok són denominades proteïnes pro-apoptòtiques^{94, 96, 97} (Figura 14).

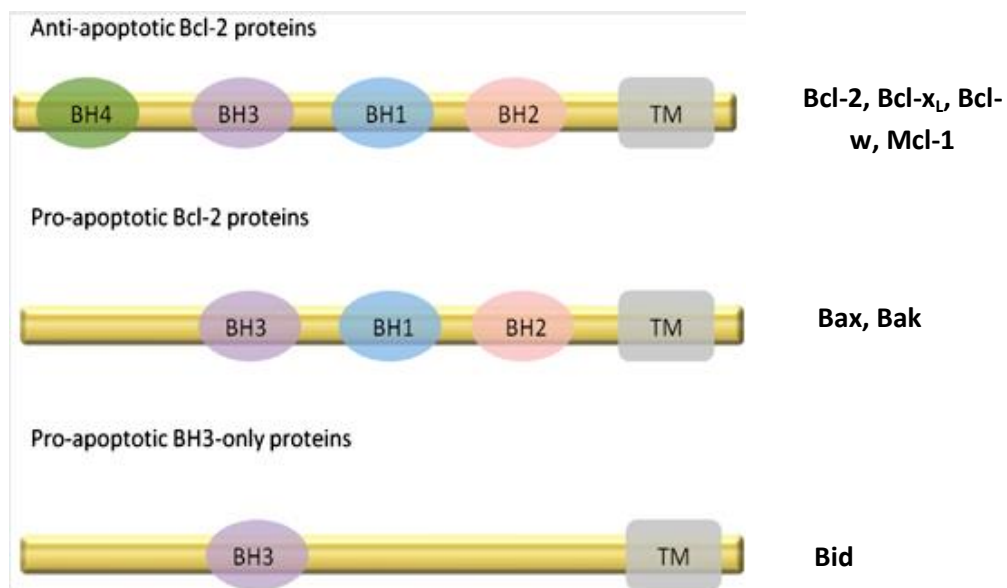


Figura 14. Les tres subfamílies de la família Bcl-2. S'aprecien els dominis d'homologia (BH).

Molts dels elements presenten un domini hidrofòbic a l'extrem carboxil-terminal que els faculta per associar-se a membranes intracel·lulars⁹⁵.

Està comprovat que Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-W inhibeixen l'apoptosi en resposta a agents citotòxics com, per exemple, la radiació gamma, ultraviolada o ionitzant o fàrmacs quimioterapèutics⁹⁸.

Bax i Bak són crucials per induir la permeabilització de la membrana externa mitocondrial^{99, 100}. D'aquesta manera es poden alliberar molècules apoptogèniques (com el citocrom C i Diablo/Smac, les quals conduiran a l'activació de caspases). Com a membres anti-apoptòtics, Bcl-2 i Bcl-X_L, inhibeixen Bax i Bak. A més a més, s'ha vist que aquestes proteïnes poden quedar inhibides per membres de la família BH3-only, ja sigui mitjançant la unió directa amb Bcl-2 o amb altres proteïnes anti-apoptòtiques^{98, 100, 101}. En canvi, un altre model proposa que Bax i Bak poden activar-se directament gràcies a algunes proteïnes BH3-only, com Bim, tBid (**truncated Bid**) i Puma^{102, 103}.

Bax i Bak, a més, poden promoure l'activació de caspases mitjançant els seus efectes en el mitocontri^{100, 104}. Ja sigui directament o indirectament, aquestes dues proteïnes pro-apoptòtiques indueixen l'alliberament de proteïnes des de l'espai intermembranal al citosol¹⁰⁴. Aquesta permeabilització de la membrana externa mitocondrial provoca l'alliberament de citocrom C i altres proteïnes solubles^{100, 105}. Està àmpliament acceptat que Bax i Bak poden formar porus en la membrana mitocondrial gràcies a la seva oligomerització, procés que es pot veure afavorit pel paper que poden jugar altres membres BH3-only com Bad o Noxa, les quals interaccionen amb proteïnes anti-apoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-X_L^{105, 106}. No obstant, la naturalesa bioquímica d'aquests porus i com les proteïnes anti-apoptòtiques poden regular-los encara és un fenomen poc conegut⁷⁸. Es creu que Bax podria interaccionar amb components del PTP (**P**orus **T**ransitori de **P**ermeabilitat) com per exemple la proteïna VDAC (**V**oltage-**d**ependent **a**nion **c**hannel) per crear un canal més gran i poder provocar així la total permeabilització de la membrana externa mitocondrial^{107, 108}.

3.7.2 Les proteïnes BH3-only

Les proteïnes BH3-only de la família de Bcl-2, la qual inclou: Bim, Bmf, Bik, Bad, Bid, Puma, Noxa and Hrk intervenen en processos de desenvolupament, immunitat,

supressió tumoral i també indueixen senyals citotòxics i mantenen la homeòstasis tissular^{8,95}.

Estudis amb estructures en 3D han demostrat la unió de les proteïnes BH3-only amb membres anti-apoptòtics de la família de Bcl-2, aquests estudis també han confirmat que dins la cèl·lula sols es troben certes unions. Bim, Puma i tBid s'uneixen a totes cinc proteïnes anti-apoptòtiques: Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A1 i Mcl1; mentre que altres proteïnes BH3-only mostren una gran selectivitat¹⁰⁹ (Figura 15).

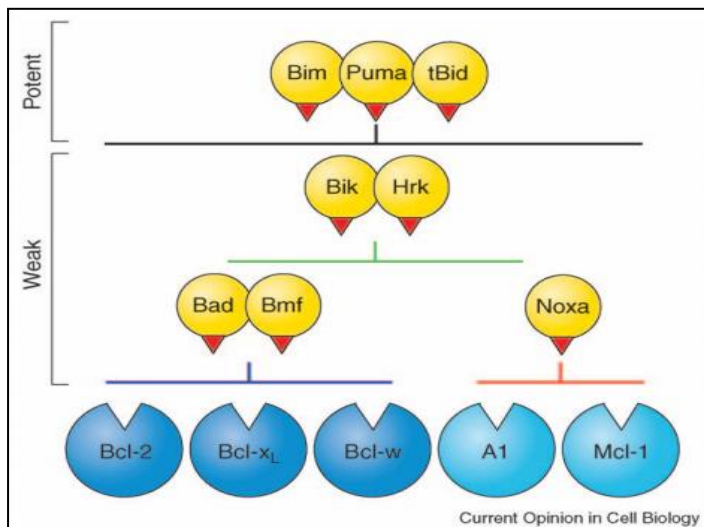


Figura 15. Proteïnes BH3-only i les seves unions amb membres de la família de Bcl-2. Les proteïnes BH3-only mostren una gran selectivitat al moment d'unir-se a membres de la família de Bcl-2⁸.

Les proteïnes BH3-*only* tenen funció pro-apoptòtica i funcionen com a sensors d'estímuls apoptòtics, els quals provenen de diferents processos cel·lulars, és a dir, són les encarregades d'iniciar la mort apoptòtica en resposta a una gran quantitat de senyals¹¹⁰. Els seus membres indueixen la mort a través de la seva unió al domini receptor d'altres membres de la família Bcl-2, inhibint-los (si són proteïnes anti-apoptòtiques) o activant-los (si són membres pro-apoptòtics).

Tot i això es caracteritzen per no poder desencadenar mort apoptòtica en absència de Bax i Bak i, per tant, la seva funció l'hem de situar "al cap damunt" d'aquesta via de senyalització.

L'expressió de proteïnes BH3-*only* poden ser induïdes per factors de transcripció. Per exemple, Noxa i Puma són induïts per p53, com a resposta al dany en el DNA¹¹¹⁻¹¹³. Bim pot ser induït per FOXO3A com a resposta a la deprivació de factors tròfics¹¹⁴, per

fàrmacs i llum ultraviolada. També poden ser activades post-transcripcionalment. Per exemple, s'ha vist que Bad pot ser activada per una pèrdua de fosforilació deguda a la deprivació de factors tròfics ¹¹⁵. Bid pot ser activat per proteòlisi gràcies a la caspasa 8, convertint-se en tBid ^{116, 117}. També pot activar-se gràcies a l'alliberament de calci o degut a la pèrdua de fosforilació per part de les ERK. Aquest fet fa que Bim sigui ubiquitinitzat i degradat via proteasoma. Bmf es pot activar mitjançant llum ultraviolada o bé gràcies als HDACi. Per últim, Bik s'activa per un mecanisme no molt conegut, com a resposta a la inhibició de la síntesi proteica ¹¹⁸ (Figura 16).

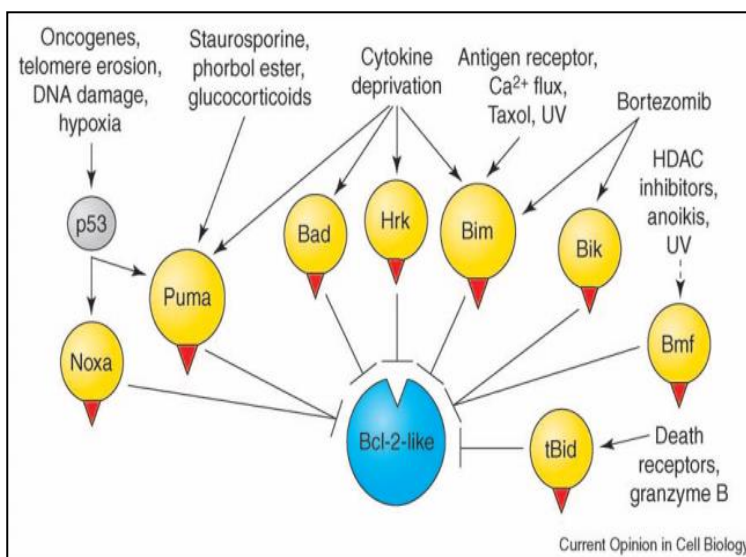


Figura 16. Les proteïnes BH3-only poden ser activades per varis processos cel·lulars. Un cop activades les proteïnes BH3-only, neutralitzen les proteïnes anti-apoptòtiques de la família de Bcl-2 i inicien l'apoptosi ⁸.

4. TRACTAMENT EN LA CLÍNICA DEL CARCINOMA D'ENDOMETRI

El tractament del carcinoma d'endometri depèn de les característiques del tumor (estadificació) i de la pacient (edat, salut i intenció de tenir fills) ¹¹⁹. Existeixen diverses possibilitats terapèutiques: cirurgia, quimioteràpia, radioteràpia i hormonoteràpia. El principal problema de la quimioteràpia i la radioteràpia, però, és que no distingeixen entre cèl·lules tumoral i no-tumorals podent causar toxicitat en teixits normals. En els últims anys, diversos estudis han desenvolupat tractaments biològics més selectius i dirigits, per a que és pugui vèncer el creixement tumoral i al mateix moment minimitzar al màxim els efectes adversos ⁶³.

En algunes ocasions es pot utilitzar una combinació de tractaments per tal d'incrementar-ne l'efectivitat ¹²⁰⁻¹²².

4.1 Cirurgia

La cirurgia és el principal tractament per a dones amb CE. La supervivència depèn fortament, de l'estadi del tumor (Taula 3). La histerectomia abdominal/radical amb doble annexectomia (l'extirpació quirúrgica de l'úter, ovaris i trompes) i l'ooforectomia bilateral (l'extirpació dels dos ovaris i de les trompes) és l'aproximació terapèutica més comuna del CE ¹²⁰. Aquest és el tractament primari. Els carcinomes en estadi I que tenen un alt risc de recurrència i aquells en estadi II s'operen quirúrgicament i s'administra radioteràpia de manera conjunta. Els CE que es troben confinats en l'úter (estadi I) presenten al voltant d'un 80% de supervivència ¹²³. En canvi, quan el CE es troba en estadi avançat té un pronòstic molt pobre.

4.2 Quimioteràpia

La quimioteràpia consisteix en la utilització de medicaments contra el càncer que s'administra per via intravenosa o oral ¹²⁴. Aquests medicaments entren al flux sanguini i arriben a tot el cos, per tant aquest tipus de tractament és potencialment útil contra el càncer que s'ha estès més enllà de l'endometri. En el tractament contra el càncer, la combinació de quimioteràpia algunes vegades funciona millor que la monoteràpia ¹²⁵. Els medicaments utilitzats per a tractar el CE poden ser:

- Paclitaxel (Taxol)
- Carboplatí
- Doxorubicina (Adriamycin)
- Cisplatí

Les combinacions més freqüents són Carboplatí amb Paclitaxel i Cisplatí amb Doxorubicina ^{126, 127}.

La quimioteràpia se sol considerar en alguns casos dels estadis III i IV. El tractament quimioterapèutic del CE continua sent el mateix des de fa anys, sense variació depenent del tipus de carcinoma.

4.3 Radioteràpia

La radioteràpia consisteix en la utilització de radiació d'alta energia (per exemple, rajos X) per tal de destruir les cèl·lules cancerígenes. La radioteràpia es pot administrar col·locant materials radioactius dins del cos en un lloc pròxim al tumor, s'anomena radioteràpia interna/intracavitària o braquiteràpia. Aquesta última es duu a terme quan no es realitza un tractament quirúrgic i consisteix en introduir dins la cavitat uterina càpsules de radium, amb una dosi de fins a 8.000 rads, aconseguint una radiació del tumor adequada inclús dels ganglis pèlvics ¹²¹. Existeixen dos tipus de braquiteràpia pel CE: dosis baixes (LDR, *Low Doses Radiation*) i altes dosis (HDR, *High Doses Radiation*), la principal diferència és el temps d'exposició a la radiació, mentre que a la primera la pacient rep tractament de 1-4 dies, la segona és realitza en menys d'una hora.

Una altra opció és la radioteràpia externa o de rajos externs, consisteix en administrar radiació des d'una màquina fora del cos, procediment semblant a fer una radiografia. Acostuma a ser el complement al tractament quirúrgic, la dosi a tota la pelvis ha de ser com a mínim de 4.000 rads. Normalment es realitza 5 dies a la setmana durant 4-6 setmanes. Els rajos són perfectament dirigits al focus tumoral, evitant així al màxim la radiació de zones sanes.

Durant dècades s'ha estat utilitzant la radioteràpia pre- o post-operatòria per creure que millorava els resultats ¹²⁸. Sobretot disminueix el risc de recidives a la vagina i als ganglis pèlvics. Els tumors pocs diferenciats (estadi II o III), els que envaeixen el miometri o quan hi ha metastasi ganglionar són els tractats amb radioteràpia.

4.4 Hormonoteràpia

La teràpia hormonal o hormonoteràpia consisteix en la utilització d'hormones o medicaments que bloquegen les hormones per combatre el càncer ¹²⁹.

Progestines

Normalment els CE és tracten amb medicaments anàlegs de la progesterona anomenats progestines ¹³⁰. Les més utilitzades són:

- Provera (intravenosa o oral)
- Megace (oral).

Aquests medicaments funcionen desaccelerant el creixement de les cèl·lules del CE.

GNRH

Els GNRH són els agonistes de la hormona alliberadora de la hormona gonadotropina. Aquest tractament es duu a terme en les pacients en les que no se'ls hi ha extirpat els ovaris, i que encara produeixen estrògens. Aquests medicaments redueixen la producció d'estrògens pels ovaris en dones que no han arribat a la menopausa. Són injectats cada 1-3 mesos ¹²⁹. Alguns exemples són:

- Goserelina (Zoladex)
- Leuprolida (Lupron)

Inhibidors de l'aromatassa

Un cop s'extirpen els ovaris (o ja no funcionen), la producció d'estrògens continua al teixit adipós, convertint-se en la principal font d'estrogen de tot l'organisme. Aquest tipus de medicament, molts d'ells encara en estudi, pot reduir o aturar la producció d'aquest estrogen. Alguns exemples són:

- Anastrozol (Arimidex)
- Letrozol (Femara)
- Exemestano (Aromasin)

També es pot recórrer a tractaments no-hormonals, com la clonidina. En general, els resultats dels tractament no han millorat des de fa 30 anys ¹³¹. Per aquesta raó, la

cerca de noves dianes terapèutiques en el CE és essencial i conforma un dels eixos principals d'investigació ¹²⁹.

5. L'ÉPIGENÈTICA

L'epigenètica és un terme derivat del grec que significa “més enllà de la genètica”, estudia els canvis reversibles en el DNA que no afecten la seqüència nucleotídica d'un gen però que produeixen canvis en la seva expressió, s'estudia com l'ambient i la història de l'individu influeixen sobre l'expressió dels gens i més exactament el conjunt de la transmissió dels caràcters adquirits d'una generació a l'altra ^{132, 133}. Per tant, aquests canvis en l'expressió genètica o en els fenotips cel·lulars són heretables i són causats per altres mecanismes independents a la seqüència d'ADN. Alguns indicis apunten que aquesta informació es podria mantindre durant la meiosi i per tant, l'herència epigenètica podria transmetre's inclús als descendents d'organismes pluricel·lulars.

Durant dècades la qüestió de l'herència biològica s'ha respost a través del llenguatge del DNA. Aquesta visió situava al DNA com a únic material hereditari que determina els trets que diferencien un organisme d'un altre i que es transmet de generació en generació. El DNA utilitza un llenguatge basat en l'existència de quatre lletres (A; Adenina, C; Citosina, T; Timina i G; Guanina, en el RNA trobem també U; Uracil), que es combinen al seu torn en paraules de tres lletres per donar lloc a les proteïnes, les molècules que doten d'estructura i funcions específiques als organismes (Figura 17). Al llarg dels darrers anys s'ha evidenciat que aquesta visió era incompleta.

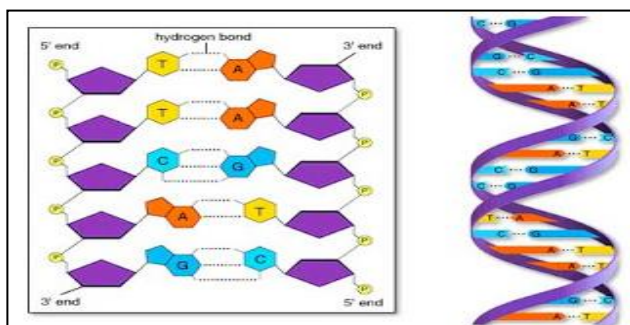


Figura 17. Estructura dels nucleòtids. Els nucleòtids estan formats: base nitrogenada (A, C, T, G), pentosa (sucre de 5 àtoms de carboni i àcid fosfòric ³).

Així per exemple, encara que totes i cadascuna de les cèl·lules d'un organisme tenen la mateixa informació emmagatzemada en el seu DNA, resulta evident que una cèl·lula de la pell és molt diferent a una neurona o un glòbul blanc sanguini. Que diferència llavors una cèl·lula sanguínia d'una neurona, si no és el seu DNA? La resposta ens la dóna l'epigenètica.

L'ADN dins del nucli cel·lular s'enrotlla al voltant d'uns grups de proteïnes anomenades histones, són la H1, H2A, H2B, H3 i H4. El DNA, que en cadascuna de les cèl·lules humanes, forma una espècie de fibra d'uns dos metres de longitud, es troba empaquetat exquisidament a fi de ser confinat a l'interior d'un nucli d'un diàmetre d'un milió de vegades més petit. L'embolcall d'histones amb l'ADN enrotllat s'anomena nucleosoma i es compacten per formar els cromosomes ^{134, 135} (Figura 18). Aquest mecanisme, a part d'endreçar el ADN, també ajuda a regular l'expressió del gens. La forma en què el DNA és empaquetat determina en realitat com aquest DNA funcionarà.

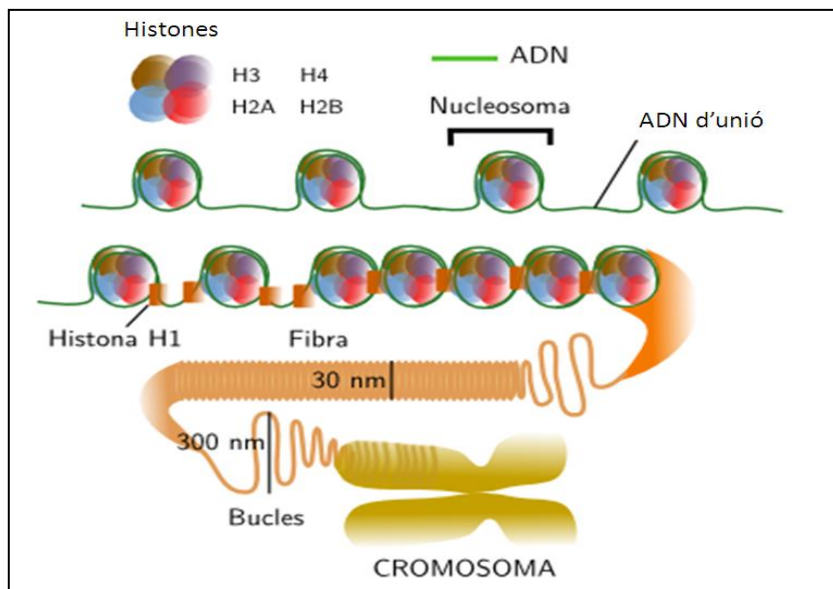


Figura 18: Formació dels cromosomes. Les histones H1, H3, H4, H2A i H2B s'organitzen per a formar l'estructura del nucleosoma, on s'hi troba també dos voltants de cadena de DNA, tot aquest complex s'organitza per a formar els cromosomes. Extret de ¹³⁶.

Els mecanismes i modificacions que pateix el DNA i el seu embolcall serien les modificacions epigenètiques, que en darrer terme decideixen les funcions que estan activades i inactivades en cada tipus de cèl·lula. Si l'embolcall d'histones és molt compacte, els gens que contenen no es poden expressar i no sintetitzen proteïnes. Els gens de les zones compactades estan inactius, ja que la maquinària que permet la síntesi de proteïnes a partir del gen no pot accedir-hi.¹³⁷ Quan s'ha de sintetitzar una proteïna determinada, les histones on està el gen d'aquesta proteïna se separen entre si per permetre que la maquinària que sintetitza la proteïna pugui accedir al gen corresponent. L'obertura de les histones facilita que el gen s'activi (Figura 19).

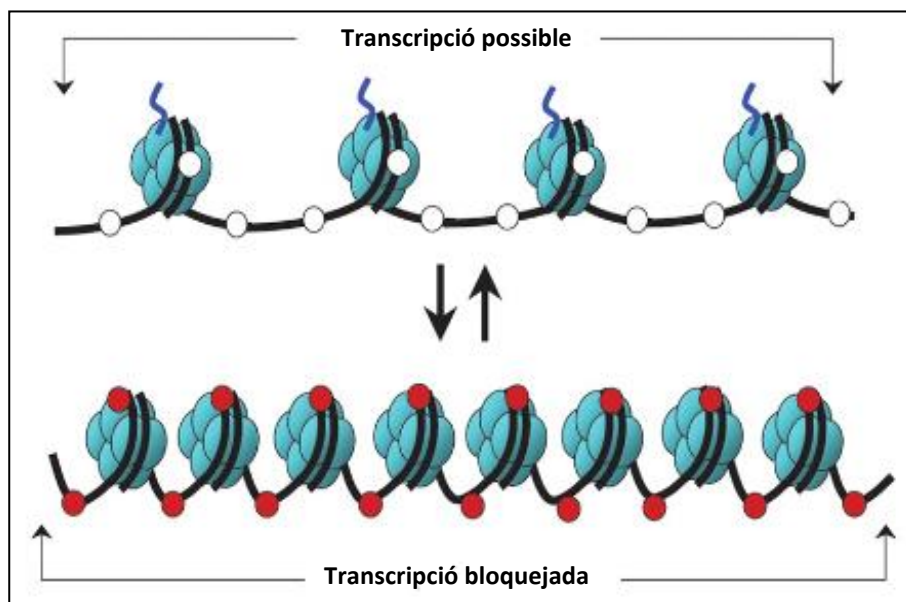


Figura 19. Remodelació de la cromatina. Quant la cromatina és troba relaxada té lloc la transcripció gènica, les citosines no es troben metilades (cercles blancs) i les histones estan acetilades, per contra, quant la cromatina està compactada resulta en el silenciament de gens, no hi ha transcripció, les citosines es troben metilades (cercles vermells) i les histones deacetilades. Modificat de¹³⁸.

Molècules químiques anomenades "senyals epigenètics" es situen sobre l'ADN o sobre les histones, activant o desactivant el gen corresponent. Uns senyals epigenètics provoquen que les histones s'ajuntin i desactiven els gens que hi ha en aquestes histones. Altres, com els grups acetils, provoquen el contrari: fan que les histones se

separin entre si i que es permeti l'expressió dels seus gens i que es sintetitzin proteïnes.

Per tant, els senyals epigenètics determinen que un segment d'un cromosoma s'obri (les histones es separen unes de les altres) o es compacti. En el primer cas, els gens corresponents es poden activar i en el segon els gens romanen inactius.

Els senyals epigenètics no empaqueten o desempaqueten els cromosomes directament, sinó que atrauen proteïnes que tendeixen a obrir o tancar el cromosomes. Si una determinada zona d'un cromosoma presenta molts grups metils, aquests atrauen una sèrie de proteïnes que, segons on estiguin aquests grups metils, facilitaran o dificultaran l'activació dels gens de la zona. Al contrari, si una determinada zona té molts grups acetils, s'atraurà un grup de proteïnes que obren els cromosomes i faciliten la seva activació.

5.1 Regulació de l'expressió gènica; les modificacions post-traduccionals

La complexa fisiologia de les cèl·lules eucariotes està regulada per nombrosos mecanismes entre els que s'inclou la transcripció de nous ARN missatgers (ARNm), el processament alternatiu de l'ARNm, la traducció de proteïnes i les alteracions post-traduccionals de les mateixes, que constitueixen un complex entramat de regulació contínua en la cèl·lula.

L'epigenètica estudia tots aquells grups químics que provoquen una pèrdua de pèptids en la seva estructura, que afegeixen grups funcionals (metil, acetil, fosfat, entre altres) o proteïnes (ubiquïtina o SUMO) que s'uneixen al DNA o a les proteïnes associades amb aquest, donant lloc a metilacions, acetilacions, fosforilacions, ubiquitinitzacions i sumoilacions. Aquestes modificacions, més de 200 descrites fins el moment, tenen lloc després de la traducció de les proteïnes, és a dir, després de la seva síntesis, i que anomenem modificacions post-traduccionals¹³⁹ (Taula 4).

| MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS |
|--|
| Modificacions N- i C- terminal: <ul style="list-style-type: none"> - Eliminació de la Met N-terminal - Eliminació del pèptid senyal - Acilació N-terminal - Aminació N-terminal |
| Glicosilació: <ul style="list-style-type: none"> - N-Glicosilació - O-Glicosilació |
| Fosforilació |
| Acetilació |
| Metilació |
| Sumoilació |
| Ubiquitinització |
| Formació de ponts disulfurs |
| Hidroxilació |
| ADP-ribosilació |
| Carboxilació |
| Selenització |
| Sulfatació |
| Nitrosilació |
| Unió d'ions metàl·lics |

Taula 4. Modificacions post-traduccionals. Taula representativa d'algunes de les 200 modificacions post-traduccionals descrites fins el moment ¹³⁹.

La gran varietat de modificacions constitueix un mecanisme de regulació dinàmica de la funcionalitat de les proteïnes, de la seva activitat i de la seva localització subcel·lular, els i proporciona un paper important en la senyalització cel·lular, la maduració, el correcte plegament, també intervenen en processos tan importants com: el destí d'una cèl·lula, el desenvolupament embrionari, la inestabilitat genòmica i el càncer.

Una proteïna pot ser diana de més d'una modificació, o estar modificada en varis residus. Aquestes modificacions poden produir-se separades en el temps, o de forma seqüencial en un mateix residu de la proteïna ¹⁴⁰.

Poden establir-se nombroses classificacions d'aquestes modificacions, seguint diferents criteris. A grans trets, els principals mecanismes que hi ha al darrere dels fenòmens epigenètics són la modulació de la modificació de les histones (mitjançant l'acetilació, la fosforilació i la metilació), que determina com està estructurat l'ADN en el nucli cel·lular, la modificació covalent de la pròpia molècula d'ADN per metilació i la remodelació de l'estructura de la cromatina. El nostre interès es centrarà en la modificació de la cua de les histones, especialment en l'acetilació d'aquestes. A continuació s'explicarà què volen dir aquests mecanismes (Figura 20).

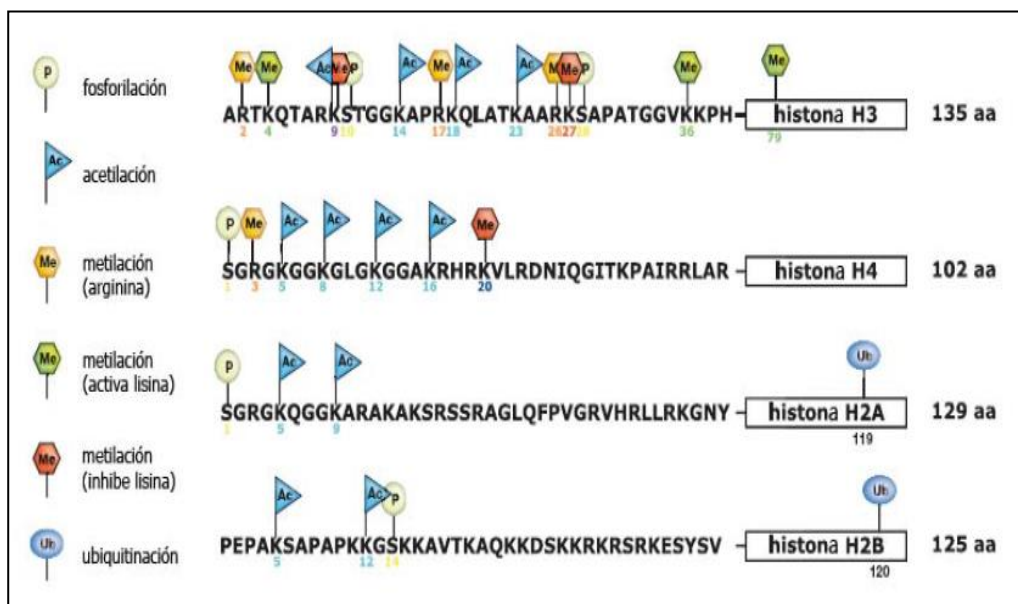


Figura 20. Modificacions post-traduccionals. Codi d'histones on es representen els diferents tipus de modificacions epigenètiques en els aminoàcids de cada histona: R=Arginina; K=Lisina; S=Serina; T=Treonina ¹⁴¹.

5.1.1 Metilació de l'ADN

La metilació de l'ADN consisteix en la unió d'un grup metil a molècules de citosina, i està relacionada amb la silenciament de gens. Els residus de cisteïna metilats tendeixen

a acumular-se en regions pròximes a l'extrem 5' de l'anell de pirimidina dels gens, lloc on normalment es troben les regions promotores (Figura 21). Aquest fet pot provocar que les polimerases no es puguin reconèixer els promotors (i per tant no s'expressarà el gen en qüestió), o que s'indueixi la unió d'enzims encarregats de la condensació d'aquesta regió de la cromatina, fet que pot comportar el silenciament d'un gen concret o de tota una regió de DNA. Aquesta modificació post-traduccional té una gran importància en la regulació de l'expressió gènica en la majoria dels vertebrats ¹³².

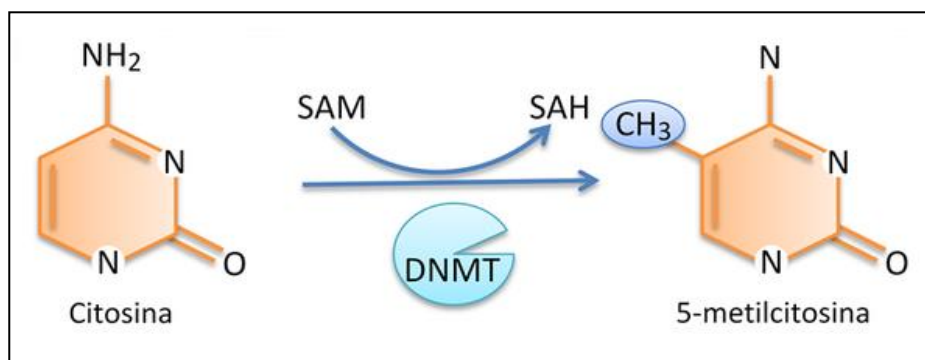


Figura 21. Procés de metilació de l'ADN. La metilació té lloc al carboni 5 de la citosina, SAM (S-adenosil-metionina) proporciona el grup metil, SAH (S-adenosil-homocisteïna) i DNMT (DNA metiltransferasa). Extret de ¹⁴².

Les proteïnes encarregades de la metilació s'anomenen metiltransferases, i tal com s'ha dit anteriorment, metilen les citosines seguides de guanines, que es troben en seqüències 5'-CG-3', o en les complementàries a 3'-GC-5'. A més a més, un cop el DNA s'ha replicat, la cadena nova de DNA és metilada, a través dels patrons de metilació de la cadena que actua com a motlle. D'aquesta manera, s'aconsegueix que aquestes modificacions puguin ser transmeses d'una generació a l'altra.

5.1.2 Modificació de la cua de les histones

Les modificacions post-traduccional de les histones estan relacionades amb la regulació de la transcripció. S'ha proposat l'existència d'un codi histònic (paral·lel al codi genètic), segons el qual diferents combinacions de modificacions de les cues

amino-terminals de les histones afectarien de forma específica, sinèrgica o antagònicament a les interaccions de les histones amb altres proteïnes associades a la cromatina. D'aquesta manera, també es veuria modificada l'accessibilitat al DNA. Aquest "codi" es transmet de cada cèl·lula als seus descendents en forma de memòria epigenètica¹⁴³. Així, el codi histònic no es veuria implicat exclusivament en la regulació de la transcripció sinó també en altres processos cel·lulars com el control del cicle cel·lular, la replicació i la reparació de l'DNA.

Les modificacions de les cues de les histones són reversibles (Taula 5). Per exemple, les fosforilacions poden ser revertides per les fosfatases, les acetilacions per les deacetilases i les metilacions per les desmetilases. La possibilitat de revertir les modificacions proporciona a la cèl·lula mecanismes per adaptar ràpidament els seus patrons d'expressió gènica als canvis que es poden produir¹⁴⁴.

L'existència de tants tipus diferents de modificacions i de tants residus modificables, fan que el codi histònic tingui una gran potencialitat i una elevada versatilitat per a regular tots aquells processos en els que intervenen.

Cadascuna dels quatre tipus d'histones que formen l'octàmer del nucleosoma, presenta més de 30 residus que es poden modificar post-traduccionament.

Les molècules d'histones presenten una regió que sobresurt de l'estructura, i que és utilitzada com a objectiu per l'addició de grups metil, acetil o fosfat. Les diferents combinacions de grups afegits a les histones són llegides de diferents maneres per altres proteïnes, que s'encarreguen de condensar o descondensar l'estructura fins el nivell d'empaquetament necessari. El que es coneix com codi d'histones.

5.1.2.1 Tipus de modificacions en les cues de les histones

- Les **acetilacions** de les lisines en neutralitzen la seva càrrega, aquest fet provoca un debilitament en la interacció de les histones (en N-terminal) amb el DNA permetent una estructura de la cromatina més oberta i accessible (Figura 22)¹⁴⁵ L'acetilació de les histones s'associa amb l'activació de la transcripció, la

regulació del cycle cel·lular, la reparació del DNA, la recombinació i l'apoptosi

146

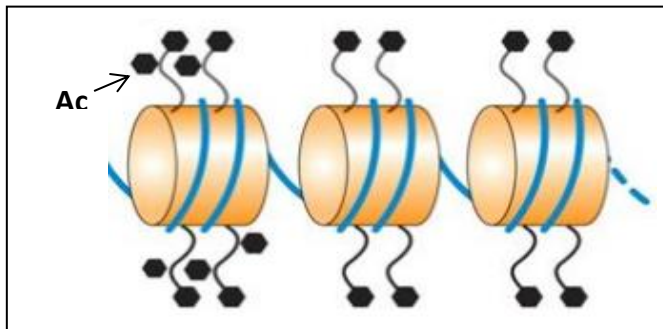


Figura 22. Acetilació en la cua de les histones. L'acetilació té lloc en les lisines. Modificat de ⁴.

- La **metilació** de les histones *in vivo* es produeix principalment en sis Lys (H3K4, 9,27,36,79 i H4K20) i en algunes Arg regulant tant la transcripció com la resposta al dany genètic i la formació de l'heterocromatina. Les Lys poden ser mono-, di- o trimetilades, mentre que les Arg sols poden ser mono- o dimetilades simètrica o asimètricament produir (Figura 23) ¹⁴⁴.

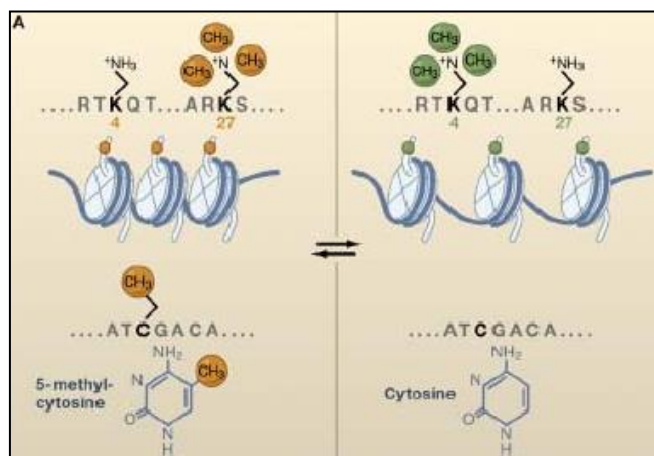


Figura 23. Metilació en la cua de les histones. La metilació té lloc en les lisines (K) 4 i 27, entre d'altres. Extret de ².

- Els cinc tipus d'histones són susceptibles a la **fosforilació** en els residus de Ser i Tre. No obstant, *in vivo* la fosforilació es produeix principalment en la Ser 10 de l'histona H3 durant la interfase, fet que comporta l'activació transcripcional d'una sèrie de gens (*Fos*, *Jun*, *Heat-shock*), la mitosis (participant en la condensació dels cromosomes metafàsics) i la meiosi (participant principalment en la condensació dels cromosomes) ¹⁴⁷. A més a més, la fosforilació de la histona H2A participa en la reparació del DNA ¹⁴⁸.

- La **ubiquitinització** de les histones es produeix generalment en els residus de Lys de les histones H2A i H2B, tot i que les Lys de les histones H1 i H3 també poden ser ubiquitinitzades.
- En la **sumoilació** s'afegeix un grup SUMO (**S**mall **U**biquitin **M**odifier) i és un procés antagonista a l'acetilació.

| MODIFICACIÓ | HISTONA | RESIDU | EFFECTES EN LA TRANSCRIPCIÓ |
|-------------------------|---------|--------------------|-----------------------------|
| Metilació | H3 | K4, K79 | Eucromatina |
| | | K9, K27 | Silenciació |
| | | R17 | Activació |
| | | K16 | Allargament |
| | H4 | R3 | Activació |
| | | K20 | Silenciació |
| Acetilació | H2A | K5 | Activació |
| | H2B | K5, K12, K15, K20 | Activació |
| | H3 | K4, K14, K18, K23, | Activació |
| | | K27 | Deposició d'histones |
| | H4 | K9 | Deposició d'histones |
| K5, K12 | | Activació | |
| | | K8, K16 | |
| Fosforilació | H2A | S1, T119 | Mitosis |
| | H2AX | S139 | Reparació del DNA |
| | H3 | T3, S10, T11, S28 | Mitosis |
| | H4 | S1 | Mitosis |
| Ubiquitinització | H2A | K119 | Silenciació |
| | H2B | K120 | Activació |
| Sumoilació | | | |

Taula 5. Modificacions en les cues de les histones i els efectes en la transcripció. Les histones poden sofrir modificacions post-traduccionals en les seves cues, les més conegudes són: la fosforilació, l'acetilació, la metilació, la simulació i la ubiquitinització. K, lisina; R, arginina; S, serina; T, treonina.

5.1.3 Remodelació de l'estructura de la cromatina

L'alt nivell de compactació de la cromatina, fa que el DNA no sigui accessible a proteïnes no histones importants, com per exemple diversos enzims que participen en els processos de replicació, reparació, recombinació i transcripció del DNA. Per que aquestes proteïnes puguin interaccionar amb el DNA es necessari que es produeixin canvis en l'estructura de la cromatina, procés que és coneix amb el nom de remodelació de la cromatina.

Així, la cromatina relaxa la seva estructura i exposa determinades regions del DNA a les proteïnes que ho requereixen. Però aquest procés ha de ser capaç de revertir-se, és a dir, de compacta les fibres de cromatina en els períodes d'inactivitat.

Els complexos de remodelació de la cromatina poden actuar de diferents maneres: catalitzant la mobilització i reposicionament de nucleosomes, transferint els octàmers a posicions diferents del DNA o generant estructures similars a dinucleosomes a partir de mononucleosomes per a generar un gir superhelicoidal al DNA. Es tracta de proteïnes o complexos multiproteics que utilitzen l'energia de la hidròlisis del ATP per a modificar l'estructura de la cromatina, i per tant, tots ells posseeixen una subunitat ATPasa.

6. EPIGENÈTICA I CÀNCER

L'epigenètica d'un individu ve determinada per molts factors: exposició a agents químics durant la vida intrauterina i després del naixement, variants genètiques en els gens que regulen l'epigenètica (DNA metiltransferases i histones deacetilases, tots explicats anteriorment), la radiació, l'alimentació. És interessant comprovar que mentre la genètica d'una persona no és fàcilment modificable, l'epigenètica és més dinàmica.

És en el camp de la oncologia on s'ha avançat més en el coneixement epigenètic del cos humà. L'alteració de l'epigenoma és un mecanisme fonamental en el càncer, durant les dues últimes dècades, la recerca preclínica i clínica ha implicat les

alteracions epigenètiques en la patogènesi i desenvolupament del càncer (de tots), ja que, la iniciació i la progressió del càncer està controlat tant per processos genètics com per epigenètics¹⁴⁹. A diferència de les alteracions genètiques que són impossibles de revertir, les aberracions epigenètiques són potencialment reversibles, permetent que la població de cèl·lules malignes pugui tornar a un estat més normal. Els canvis epigenètics, que impliquen tant la metilació de l'ADN com alteracions en l'estructura de la cromatina, estan associats amb la inhibició de la transcripció de gens reguladors clau de les cèl·lules que, en condicions normals, controlen el cicle cel·lular i inicien la mort cel·lular apoptòtica en les cèl·lules neoplàsiques.

Per exemple, s'ha estudiat que els tumors humans perden la metilació del seu DNA, que es converteixen en una estructura fràgil i que per això apareixen aberracions cromosòmiques. Curiosament, gens protectors del càncer (els anomenats gens supressors de tumors) deixen d'exercir aquesta acció, ja que la metilació en bloqueja la seva expressió. Els exemples més clars d'aquest últim aspecte són els gens: BRCA1, MLH1, MGMT i GSTP1 als càncers de mama, colon, cervell i pròstata respectivament. En general, es pot afirmar que la metilació es relaciona, la majoria dels cops, amb la repressió de l'expressió del gen, mentre que l'acetilació es relaciona amb el desempaquetament i la transcripció, és a dir, l'expressió del gen. Concretament, la pèrdua de la metilació i l'acetilació de la histona H4, està present en la majoria dels tumors humans. De fet, l'elevada freqüència d'aquesta alteració podria convertir-la, en un futur pròxim, en un important marcador per al diagnòstic del càncer, així com una diana terapèutica per a fàrmacs antitumorals. Tot i això, el nombre de canvis a determinats llocs i les combinacions específiques de les modificacions són els que determinen la remodelació final de la cromatina i, per tant, la repressió o la expressió gènica.

Amb l'arribada de nombrosos medicaments, dirigits a enzims específics implicats en la regulació epigenètica de l'expressió gènica, la utilització de dianes epigenètiques està sent cada cop més estudiada i sembla ser eficaç com a tractament quimioterapèutic (han demostrat prolongar la supervivència i per ser menys tòxics que la quimioteràpia convencional) i també com a tractament preventiu del càncer¹⁵⁰.

Aquests medicaments amb efectes funcionals, incloent la hipometilació de l'ADN i l'acetilació d'histones, serveixen per restaurar el procés normal de la transcripció de gens reguladors cel·lulars (per exemple, gens supressors de tumors). Agents hipometilants de l'ADN, com azacitidina (Vidaza) i decitabina (Dacogen) i els inhibidors de la histona desacetilasa com romidepsina (Istodax) i vorinostat (Zolinza) han estat aprovat als EUA per al tractament de càncer, el que reforça la importància d'aquestes vies en la biologia d'aquesta malaltia. La investigació actual implica la combinació d'aquestes classes d'agents i la identificació de noves dianes terapèutiques en la creixent família d'enzims epigenètics ¹⁵¹.

Tot i els importants avenços, segueix havent-hi problemes, com la manca de marcadors predictius, els mecanismes poc clars de resposta i resistència al tractament, així com respostes poc comuns en els tumors sòlids.

6.1 Desregulació de l'epigenètica

Com s'ha comentat anteriorment, les alteracions en gens supressors de tumors o en oncogens no són sempre degudes a mutacions, sinó que, algunes d'elles poden ser degudes a una desregulació de la transcripció a través dels diferents tipus de mecanismes epigenètics, com per exemple, l'acetilació i la desacetilació de les histones o proteïnes no-histones, per dos enzims, histones acetiltransferases (HATs) i histones desacetilases (HDACs), respectivament ¹⁵².

6.2 Funció de les HATs i les HDACs

Les histones són les proteïnes cel·lulars més freqüents, cada cèl·lula eucariota en presenta cents de milions de molècules d'histones. Són proteïnes de massa molecular baixa, aproximadament 11-12 kDa, i presenten un alt contingut, prop del 20%, de lisina i arginina (aminoàcids bàsics).

Les histones són proteïnes encarregades d'empaquetar el DNA. La doble hèlix del DNA dona dos tombos sobre les histones. Les histones poden unir-se agrupant encara més el DNA, fent que ocupi menys espai. Aquestes voltes al voltant de les histones

determina, molts cops, que el DNA estigui o no accessible a la maquinària que sintetitzarà les proteïnes, és a dir, molts cops la cèl·lula no podrà llegir part del DNA perquè l'amaguen les histones. Aquesta mania d'amagar el DNA de les histones es veu augmentada per l'acetilació, ja que les histones ocupen més lloc i no poden empaquetar tant el DNA, no el poden amagar tant bé.

Les **HATs** són enzims que acetilen les lisines (K) conservades dels aminoàcids de les histones, transferint el grup acetil de l'acetil CoA per formar ϵ -N-acetyllysine, provocant una hiperacetilació de les histones. En general, l'acetilació proteica està relacionada amb l'activació de la transcripció i associada amb l'eucromatina (cromatina que s'està transcrivint). L'acetilació de les lisines neutralitza les càrregues positives de les histones (carregades positivament gràcies als grups amino presents en les lisines i arginines), causant una reducció en l'afinitat del DNA (carregat negativament degut als grups fosfats) per unir-se a les histones. El DNA és més accessible a factors de transcripció i a la maquinària per a la síntesi proteica, a part, també es genera llocs d'unió específics entre proteïna-proteïna^{153, 154} (Figura 24).

Les **HDACs** són enzims que eliminen aquest grup acetil dels residus de lisina, provocant una hipoacetilació de les histones, la desacetilació compacta el DNA limitant-ne l'accés. Aquest procés, està relacionat amb la supressió de la transcripció^{153, 154} (Figura 24).

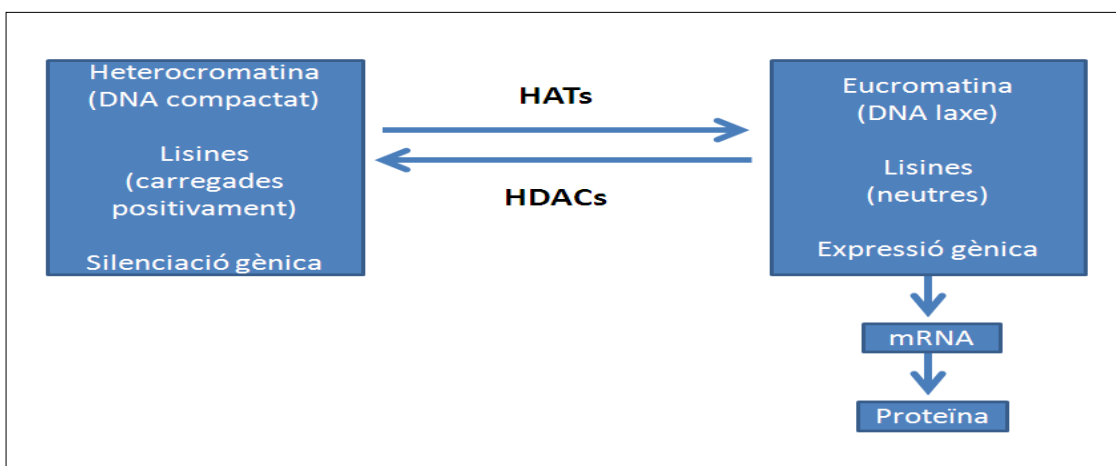



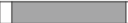










Figura 24. Funció de les HATs i les HDACs. Les HATs i les HDACs regulen la transcripció gènica, activant-la o reprimint-la. La distribució subcel·lular de les HATs i les HDACs és tant al nucli com al citoplasma, depèn del tipus/classe.

El balanç dinàmic entre aquests dos enzims està, en general, ben regulat, però quant no és així, pot comportar la promoció de la proliferació i la diferenciació en les cèl·lules normals provocant la iniciació del tumor.

A més de les histones, les HATs i les HDACs també poden regular la funció d'altres proteïnes (no-histones), involucrades en la regulació de la proliferació, supervivència, angiogènesis o inflamació, també regulen el balanç entre les proteïnes pro- i anti-apoptòtiques, entre aquestes proteïnes no-histones, també substrats d'aquests enzims, podem trobar: factors de transcripció, factors nuclears, proteïnes del citoesquelet i xaperones ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

6.2.1 Classificació de les HDACs

La família de les HDACs està formada per 11 membres, els quals requereixen Zinc (Zn^{2+}) com a cofactor per la seva activitat deacetilasa (són Zn^{2+} dependents), i es troben dividits en quatre grups segons la seva homologia ^{158, 159} (Taula 6).

| Structure of Zn ²⁺ dependent HDACs | | Cellular localization |
|---|--|-----------------------|
| References | | |
| Class I | | |
| HDAC1 |  482 a.a | Nucleus |
| HDAC2 |  488 a.a | |
| HDAC3 |  428 a.a | |
| HDAC8 |  377 a.a | |
| Class IIa | | |
| HDAC4 |  1084 a.a | Nucleus & cytoplasm |
| HDAC5 |  1122 a.a | |
| HDAC7 |  855 a.a | |
| HDAC9 |  1011a.a | |
| Class IIb | | |
| HDAC6 |  1215 a.a | Nucleus & cytoplasm |
| HDAC10 |  669a.a | |
| Class IV | | |
| HDAC11 |  347 a.a | Nucleus & cytoplasm |
|  | | |

Taula 6. HDACs. Classificació, estructura i localització cel·lular de les isoformes de les HDACs dependents de Zn^{2+} ¹⁵².

Aquests enzims estan considerats com a moduladors de la transcripció gènica i estan associats amb proliferació i diferenciació en una gran varietat de tipus cel·lulars i en la patogènesis de certes malalties. De fet, la desregulació de les HDACs està directament relacionada amb la iniciació i progressió de diferents tipus de càncers, com per exemple el d'endometri i el d'ovari ^{160, 161}, el limfoma Hodgkin i el càncer de còlon ¹⁶². Recentment, i no es d'estranyar, els HDACs han estat considerats dianes crucials en certes malalties, incloent: càncer, fibrosis intestinal, desordres metabòlics, malalties inflamatòries i autoimmunes ^{156, 163, 164}.

7.DIANES MOLECULARS EN EL TRACTAMENT DEL CARCINOMA D'ENDOMETRI

Un dels problemes principals alhora de tractar els carcinomes tant d'endometri com d'altres, és l'aparició de resistència d'aquests enfront als tractaments terapèutics convencionals. Aquest és un dels principals motius pels quals la ciència està en constant evolució per tal de trobar nous fàrmacs, que presentin a més de propietats anticancerígenes, propietats selectives, i així protegir les cèl·lules sanes.

El fàrmac ideal per al tractament d'un càncer, doncs, hauria de complir una sèrie de condicions; la primera, evidentment, ser efectiu alhora de eliminar les cèl·lules tumorals i evitar-ne la seva reaparició, tant local com a distància. La segona, ser selectiu, és a dir, eliminar solament les cèl·lules tumorals, preservant, al màxim, les cèl·lules sanes adjacents al tumor i així evitar efectes secundaris, els quals avui en dia són les principals dificultats clíniques dels tractaments quimioterapèutics. I la tercera, poder fer un bon seguiment del tractament a través de biomarcadors.

Diverses estratègies i agents actuals es troben en diferents fases clíniques, s'estudien i avaluen per a poder servir algun dia com a tractament eficaç en els humans. Són molts els estudis que demostren una disminució del creixement tumoral després de l'administració d'inhibidors del proteasoma ¹⁶⁵, inhibidors de receptor tirosin cinasa ¹⁶⁶, inhibidors de la via PI3K/AKT/mTOR ¹⁶⁷, inhibidors del factor de creixement dels fibroblasts ¹⁶⁸ o inhibidors de les histones deacetilases ^{160, 169}.

8. INHIBIDORS DE LES HISTONES DEACETILASES (HDACis)

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, les HDACs estan sent les noves dianes terapèutiques, per excel·lència, en el tractament del càncer. Aquest fet ha inspirat als investigadors a estudiar i desenvolupar els inhibidors de les HDACs ^{157, 160, 170, 171}. S'ha demostrat que els HDACis alteren el creixement de varis tipus de càncers, tant sòlids com hematològics ¹⁷²⁻¹⁷⁷. Al inhibir aquesta activitat es produeix una hiperacetilació de les proteïnes histones i no-histones, aquestes últimes poden incloure: factors de transcripció, receptors nuclears, xaperones... ^{155, 178, 179}. Realment, però, el mecanisme exacte de funcionament d'aquests compostos no està del tot clar, per tant és un punt important en els estudis actuals. Es pensa que cada inhibidor actua sobre una histona deacetilasa en concret, el qual té un efecte sobre l'expressió genètica, la regulació del cicle cel·lular, la proliferació, la diferenciació, i l'apoptosi. Alguns també creuen que els HDACis causen canvis en el citoesquelet, promovent la seva activitat contra els tumors. Varis d'aquests fàrmacs són molt efectius a dosis baixes i semblen actuar sobre regions específiques del genoma, alterant la transcripció de certs gens. La veritable eficàcia dels HDACis, encara queda per determinar, però en les avaluacions han demostrat ser tractaments efectius i selectius per a certs tipus de càncers. Aquests compostos poden ser utilitzats tant en monoteràpia com en combinació amb altres agents contra el càncer. Almenys 12 HDACis estan actualment en assajos clínics (fase I-III), com a monoteràpia o en combinació amb altres fàrmacs o radioteràpia.

Una de les característiques més emocionants d'aquesta molècula és que ha demostrat tenir una baixa toxicitat en les proves preliminars, tot i que la majoria sols estan fetes en cultius cel·lulars i models animals, els resultats d'aquestes proves són molt prometedors i varis fàrmacs ja es troben en proves clíniques.

8.1 Tipus i classificació

Els HDACis actuen exclusivament sobre els HDACs de classe I i II unint-se al domini catalític de zinc. Els HDACis es troben classificats en categories basats en les seves estructures químiques (Taula 7):

1. Àcids hidroxàmics
2. Tetrapèptids cíclics
3. Benzamides
4. Quetones electrofíliques
5. Àcids alifàtics

| INHIBIDORS HISTONES DEACETILASES | |
|----------------------------------|-------------------------|
| Vorinostat (SAHA) | Entinostat (MS-275) |
| Belinostat (PXD101) | Mocetinostat (MGCD0103) |
| Panobinostat (LBH589) | MBL-210 |
| Tacedinaline (CI-994) | M344 |
| Tubastatin A | CBHA |
| BML-281 | HNHA |
| Salermide | NCH 51 |
| ITF2357 | PCI-24781 |
| Droxinostat | SB939 |

Taula 7: Inhibidors de les histones deacetilases. HDACis que actualment es troben en assajos clínics (fase I-III) ¹.

8.2 Vorinostat

8.2.1 Situació actual

El Vorinostat (MK-0683) està dins del grup dels àcids hidroxàmics, inhibeix la HDAC1, HDAC2, HDAC3 (classe I) i la HDAC6 (classe II). Aquest inhibidor s'uneix directament al lloc catalític de l'enzim bloquejant la seva unió al substrat (Figura 25).

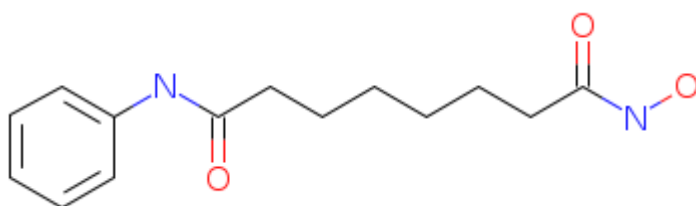


Figura 25. Estructura química del Vorinostat ¹. Té un pes molecular de 264,33g/mol i la seva fórmula molecular és $C_{14}H_{20}N_2O_3$.

Va ser el primer dels HDACis aprovat per l'Administració d'aliments i fàrmacs (FDA) de USA per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T (CTCL) (Octubre 2006). Està sent distribuït per Merk & Co.

El Vorinostat també està sent usat en el tractament d'altres tipus de limfomes, demostrant avantatges en el tractament del glioblastoma multiforme i el càncer de pulmó.

El Vorinostat s'administra per via oral, normalment un cop al dia amb els aliments. La dosi es pot variar segons els pacients però normalment són uns 400 mg un cop començat el tractament, el pacient es va sotmetent a una sèrie de proves, que inclouen: revisió de la pell, anàlisis de sang, revisió dels òrgans com el fetge o ronyons, també es sotmeten a exàmens psicològics, per tal de detectar qualsevol efecte secundari derivat al tractament.

8.2.2 Mecanisme del Vorinostat

Aquest fàrmac incorpora nous mecanismes d'acció enfront a varis tipus de tumors, en els que existeix una sobreexpressió de l'activitat de les HDACs. Com s'ha comentat en l'apartat corresponent, l'acetilació de les histones (o no-histones) permet la transcripció gènica. La HDAC elimina aquests grups acetil, mantenint la cromatina tancada i per tant inhibint la transcripció de gens. La sobreexpressió d'aquesta activitat per la cèl·lula tumoral impedeix l'activació de gens relacionats amb la inhibició del creixement i l'apoptosi. Tot i que, com ja s'ha comentat, el mecanisme no està del tot establert, es pensa que la inhibició de les HDACs permet l'activació del gens que controlen l'activitat de la cèl·lula normal, es considera que involucra l'activació de gens supressors de tumors i ha demostrat un potent efecte per impedir el creixement i la diferenciació cel·lular, així com induir apoptosi.

9. VITAMINA D

La vitamina D (VD) és un nutrient essencial per a l'absorció òptima del calci i el fòsfor de la dieta, jugant un paper important en l'homeòstasi d'aquests minerals i el metabolisme dels ossos. A més a més de la seva acció coneguda, aquesta també exerceix un rang molt ampli d'accions biològiques. Per exemple, la forma activa de la VD, la 1,25-hidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃ o 1,25D), coneguda com calcitriol, modula el sistema immune, inhibeix el creixement i la diferenciació de diverses cèl·lules i teixits, com ara les cèl·lules òssies ¹⁸⁰, els queratinòcits ¹⁸¹, el cartílag i les cèl·lules hematopoètiques ¹⁸². Aquest efecte de la 1,25D en inhibir el creixement i promoure la diferenciació suggereix una funció de la VD en la prevenció de càncers ⁶. Aquest és el motiu principal que associa els nivells baixos de VD amb molts tipus de malalties com el càncer, les malalties autoimmunes i la hipertensió ¹⁸³.

Tot i això, la insuficiència de la VD segueix sent persistent en la major part del món, incloent Amèrica del Nord i Europa, degut fonamentalment al dèficit nutricional i a la falta d'exposició a la llum solar o l'ús freqüent de protectors solars ^{184, 185}.

9.1 Tipus i estructura

La VD també coneguda com **calciferol** és un heterolípid insaponificable del grup dels esteroides, de la qual existeixen 5 formes:

- **Vitamina D₁**: lamisterol
- **Vitamina D₂**: ergocalciferol (obtingut de l'ergosterol)
- **Vitamina D₃**: colecalciferol (obtingut del 7-deshidrocolesterol)
- **Vitamina D₄**: dihidrotaquisterol (22:23-dihidrovitamina D₂)
- **Vitamina D₅**: 7-dehidrocitosterol irradiat

Les dues formes principals i fisiològicament més rellevants de la VD és la vitamina D₂ (VD₂, ergocalciferol) i la vitamina D₃ (VD₃, colecalciferol) (Figura 26).

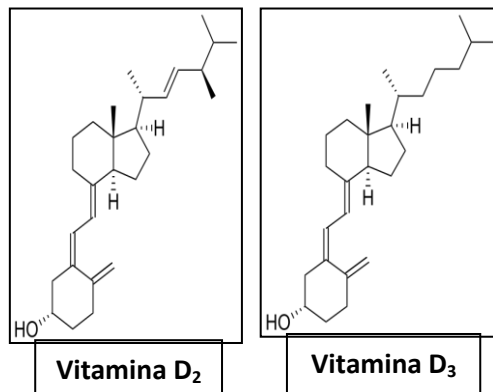


Figura 26. Estructures químiques de les formes més importants des d'un punt de vista nutricional de la VD. La VD₂, ergocalciferol i la VD₃, el colecalciferol. La diferència principal està en que l'ergocalciferol té un doble enllaç i un grup metil més que el colecalciferol.

9.2 Biosíntesi de la vitamina D

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, hi ha diverses formes d'aquesta vitamina. És una provitamina soluble en greixos i es pot obtenir de dues maneres:

- **Dieta:** el cos també es proveeix de VD₂ produïda en plantes i VD₃ produïda en teixits animals a través de la dieta, especialment amb la ingesta de peix i productes làctics ¹⁸⁶. Tot i això, actualment molts aliments que consumim són enriquits amb VD (colecalciferol). Els bolets exposats a la llum solar poden proporcionar més del 100% de la quantitat diària recomanada de VD.
- **Acció llum solar sobre la pell:** per la transformació de l'ergosterol (propi dels vegetals) quan reacciona amb la radiació solar, d'aquesta manera s'obté la VD₃.

Com a hormona esteroide, la VD₃ deriva del colesterol, concretament del 7-dehidrocolesterol. La seva síntesi s'inicia en l'organisme amb l'exposició de la llum ultraviolada UVB (λ 290-315 nm) sobre la pell, on pateix una conversió fotolítica a provitamina D₃ i d'aquesta a VD₃ ¹⁸⁷.

La capacitat del cos per a produir quantitats suficients de VD amb una exposició adequada a la llum solar indica de fet que la VD no és una vitamina. La VD és una prohormona que s'activa quan els raigs UVB de la llum solar indueixen la conversió fotolítica de la 7-dehidrocolesterol (Figura 28) a la provitamina D, seguida d'una isomerització tèrmica a VD ¹⁸⁸.

El següent pas en aquest procés és l'activació metabòlica, aquesta transformació es porta a terme en diferents passos: al fetge té lloc la primera hidroxilació, de la VD ¹⁸⁷ (Figura 28), mitjançant la hidroxilació del carboni 25. Aquesta reacció és produïda

gràcies a l'acció de diferents citocroms P450 hepàtics, especialment CYP2R1 i CYP27A1, per donar lloc a 25(OH)D.

El segon pas de la bioactivació de la VD consisteix en la formació de la forma activa 1,25D a partir de la 25(OH)D mitjançant l'enzim 1α hidroxilasa, CYP27B1.

L'acció de la 1α hidroxilasa (CYP27B1) és un punt limitant a la ruta biosintètica de la VD i està estretament regulada per la pròpia 1,25D mitjançant retroalimentació negativa, a més d'altres factors com la hormona paratiroidea (PTH) i la concentració de calci i fosfat ¹⁸⁹.

El metabòlit actiu 1,25D és una hormona esteroide que exerceix la seva acció biològica unint-se estructuralment als receptors intracel·lulars, els quals alhora interaccionen amb una seqüència determinada de gens regulables per tal de modular la seva activitat ¹⁹⁰. La 1,25D en aquest cas, interacciona activant al seu receptor cel·lular VDR ⁶.

Els nivells del metabòlit actiu de la VD es regulen tant a nivell de síntesi com de degradació. La degradació és produïda per l'acció de l'enzim 24-hidroxilasa, o CYP24A1, responsable de la hidroxilació de la 25(OH)D i de la 1,25D per donar lloc a 24,25(OH)₂D₃ i 1,24,25(OH)₂D₃ respectivament ¹⁸⁹. La seva afinitat per la 1,25D és més gran que per la 25(OH)D, fet pel qual és considerada a l'enzim CYP24A1 com un mecanisme per a eliminar l'excés de 1,25D i per tant evitar-ne la seva toxicitat ^{189, 191}. Quant es presenten nivells alts de VD poden acabar essent tòxics (2000UL/dia), aquests nivells elevats de VD augmenta l'absorció de calci en l'intestí i també la reabsorció en els ossos apareixent la hipercalcèmia que pot induir calcificacions metastàtiques. Al augmentar els nivells de calci en sèrum apareix la hipercalciúria i es generen les condicions per la formació dels càlculs renals. El ronyó, però, com ja hem comentat sintetitza la forma 24,25-(OH)₂D el que ajuda a disminuir la concentració de la VD en la seva forma activa.

Tots els metabòlits de la VD tenen una gran afinitat per la proteïna transportadora, la DBP, en el següent ordre 25(OH)D > 1,25D > VD. La unió DBP-metabòlit en limita l'accés a les cèl·lules diana, de manera que no podrà ser metabolitzat i aquest fet

comportarà un augment de la vida mitja dels metabòlits. Les hormones esteroides, com els metabòlits de la VD, poden entrar dins les cèl·lules diana per difusió en la membrana plasmàtica per ser metabolitzats o exercir la seva acció biològica.

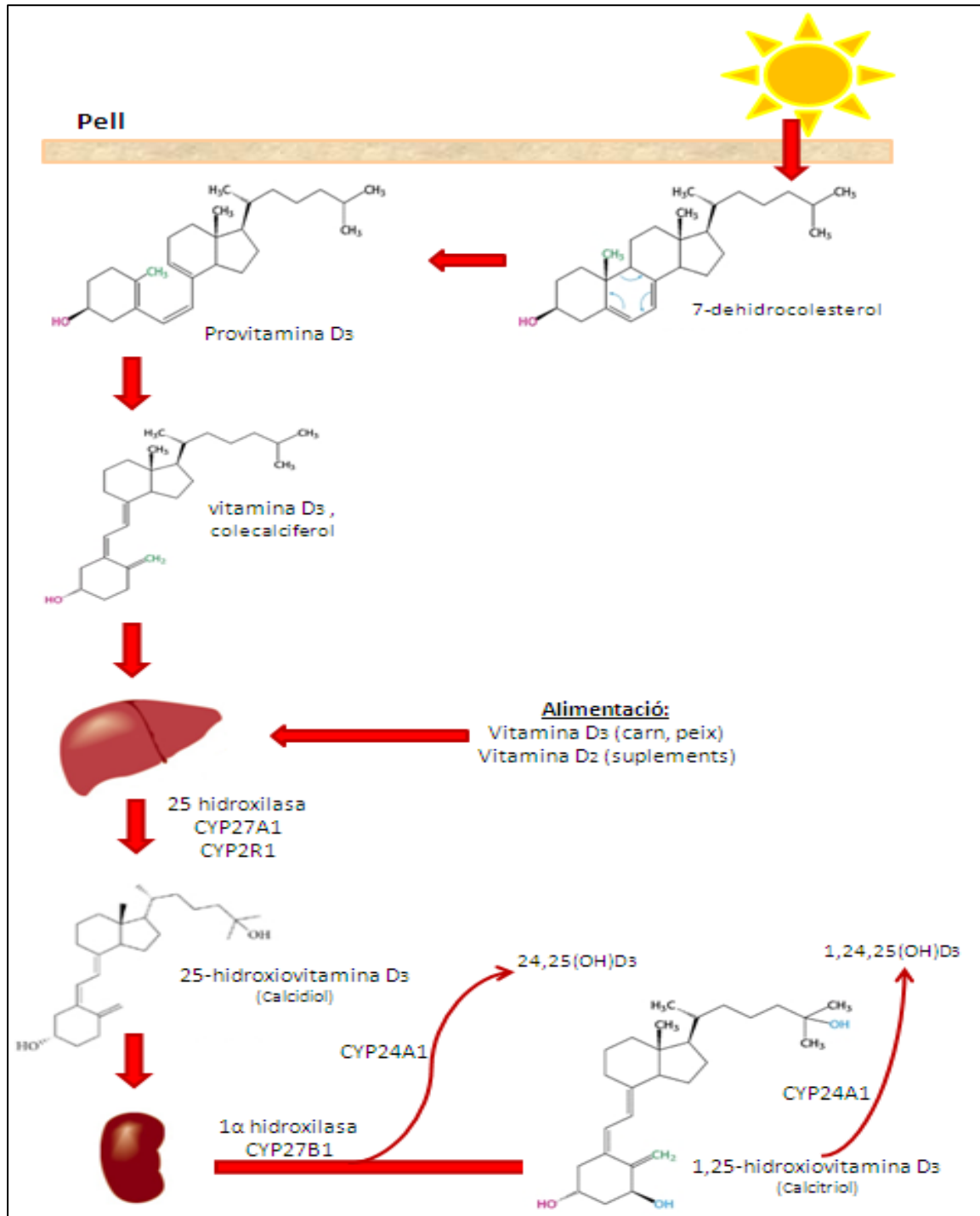


Figura 28. Síntesi de la VD. El precursor de la VD que s'obté de la dieta (VD₂) o de la bioactivació del 7-dehidrocolesterol (VD₃) a través de les radiacions solars (UVB) pateix una sèrie d'hidroxilacions fins a obtenir la forma activa 1,25D. Adaptat de ^{6,7}.

9.3 Metabòlits de la vitamina D

La VD₃ (colecalfiferol) en aquesta forma no té activitat biològica i per això necessita ser metabolitzada fins a la forma activa. Els metabòlits de la VD són molècules lipofíliques, per tant un cop a la circulació sanguínia han de ser transportades per proteïnes plasmàtiques. Mentre se sap que el transport de la VD fins els òrgans o fins els teixits diana té lloc gràcies al transport sanguini dels metabòlits de la VD per la DBP (**V**itamin **D** **B**inding **P**rotein)¹⁸⁷, es desconeix el mecanisme responsable del transport de la VD de la pell a la sang.

9.2.1 VDR, el receptor de vitamina D

Un cop arriba a l'òrgan diana l'acció biològica del metabòlit actiu (25(OH)D; 1,25D) es duu a terme a través del seu propi receptor, el VDR (**V**itamin **D** **R**eceptor).

El VDR és un factor transcripcional i un receptor nuclear, membre de la superfamília de receptors de les hormones nuclears esteroidees/tiroidees^{6, 192}. Quant s'uneix a 1,25D forma un complex heterodímer amb el RXR (**R**etinoide-**X**-**R**eceptors) unit-se al VDRE (**V**itamin **D** **R**esponse **E**lements) amb els coreguladors i el complex transcripcional preiniciador, podent regular de manera positiva o negativa la transcripció d'altres gens implicats en la regulació cel·lular, el creixement, i la immunitat. Els receptors nuclears activen o inhibeixen la transcripció genètica unint-se a elements de resposta amb motius d'unió a promotors dels seus gens diana¹⁹³. El VDR en aquest cas s'uneix a VDREs dins de la regió promotora dels gens de resposta a la VD, en forma d'homodímer o heterodímer, amb el receptor d'àcid retinoic o receptor de l'hormona tiroide¹⁹⁴.

El VDR, com a receptor nuclear que és, presenta una estructura modular i conté els següents dominis ben definits que poden funcionar de forma autònoma (Figura 27):

- i. Domini regulador N-terminal.
- ii. Domini d'unió al DNA (DBD, DNA Binding Domain)
- iii. Regions d'heterodimerització amb el receptor de l'àcid retinoic (RXR, Retinoic X Receptor)

- iv. Domini d'unió al lligand (LBD, Ligand Binding Domain)
- v. Lloc d'unió a proteïnes nuclears correguladores del complex transcripcional que regulen el nivell de transcripció dels gens diana (heterodimerització).

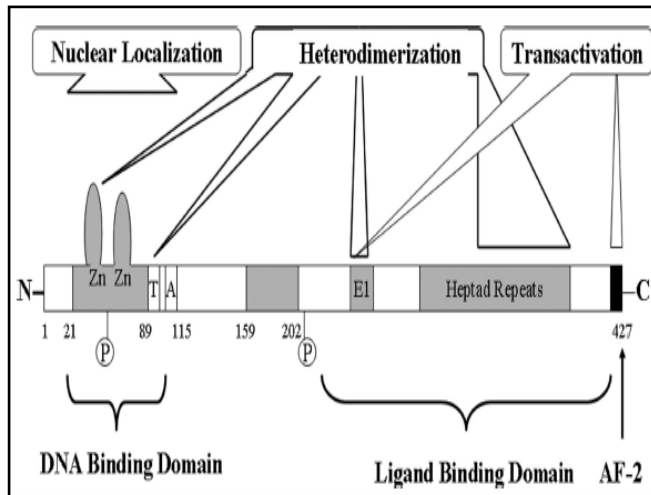


Figura 27. Dominis funcionals del VDR: domini d'unió al DNA amb funció d'heterodimerització i localització nuclear; domini d'unió a lligand, també responsable de l'heterodimerització i de la transactivació del receptor. Adaptat de ⁶.

El domini més conservat en diferents espècies és el domini d'unió al DNA en la part N-terminal i que conté dos dits de zinc (complex tetraèdric format per 4 cisteïnes amb una molècula de zinc de manera que es crea un llaç o dit d'aminoàcids que estableixen la unió amb el DNA). El primer dit de zinc (pròxim a N-terminal) és el responsable de la unió del VDR amb els promotors dels gens dependents de VD, específicament en les seqüències anomenades VDREs. El segon dit de zinc és, en canvi, el responsable de l'heterodimerització necessària amb el RXR. Aquesta dimerització és un procés indispensable perquè el VDR adquireixi la conformació essencial d'alta afinitat al DNA i així exercir la seva funció transactivadora o transrepressora.

9.2.2 CYP27A1, l'enzim de síntesi de la vitamina D, 25(OH)D

El gen CYP27A1 codifica per una oxidasa de la de la superfamília d'enzims del citocrom P450, i es coneix comunament com esterols 27-hidroxilasa.

Aquest enzim es troba a les mitocondries de molts teixits diferents, però la seva funció en la majoria d'ells està sense caracteritzar. És l'enzim més implicat en la

síntesis de l'àcid biliar participa en la degradació del colesterol a àcids biliars tant en la via clàssica com àcida.

CYP27A1, és el metabòlit de la VD més abundant en la circulació i té una llarga vida mitja, pel que es considera l'índex d'estatus nutricional de VD.

9.2.3 CYP2R1, l'enzim de síntesi de la vitamina D, 25(OH)D

La vitamina D 25-hidroxilasa, CYP2R1, codifica per un membre de la superfamília d'enzims del citocrom P450.

Com s'ha dit anteriorment, les proteïnes d'aquesta família són monooxigenases que catalitzen moltes reaccions implicades en el metabolisme de fàrmacs i síntesi de colesterol, esteroides i altres lípids.

Aquest enzim és una hidroxilasa microsomal de la VD, localitzada al fetge, que converteix VD en 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃ o 25(OH)D), anomenada calcidiol, que és la principal forma circulatòria de la VD.

Una mutació heretada en el gen CYP2R1 que es tradueix en la substitució d'una prolina per un residu de leucina al codó 99, elimina l'activitat de l'enzim i s'associa amb nivells baixos circulants de 25(OH)D i amb els símptomes clàssics de deficiència de VD.

9.2.4 CYP27B1 l'enzim de síntesi de la vitamina D activa, 1,25D

El gen CYP27B1, o 1 α -hidroxilasa, codifica per un membre de la superfamília d'enzims del citocrom P450.

Es troba localitzat principalment en el ronyó. Tot i això, també s'han descrit altres parts d'hidroxilació extra renals per la CYP27B1 en diferents tipus cel·lulars¹⁹⁵, com en cèl·lules endotelials¹⁹⁶, cèl·lules de la mucosa del colon¹⁹⁷, macròfags¹⁹⁸ i endometri¹⁹⁹ que poden contribuir als nivells en circulació de la 1,25D en determinades condicions (embaràs, insuficiència renal crònica, artritis reumatoide). CYP27B1 catalitza la reacció d'hidroxilació del calcidiol (25(OH)D), al calcitriol (1,25D, la forma activa de la VD).

9.2.5 CYP24A1, l'enzim de degradació de la vitamina D, 24,25(OH)D₃

El gen CYP24A1 codifica per un membre de la superfamília d'enzims del citocrom P450.

Les proteïnes d'aquesta família són monooxigenases que catalitzen moltes reaccions implicades en el metabolisme de fàrmacs i síntesi de colesterol, esteroides i altres lípids. L'enzim CYP24A1 s'expressa fonamentalment al túbul renal, però la seva distribució tissular és molt àmplia.

Hidroxilant la cadena lateral de la forma fisiològicament activa de la VD, 1,25D, aquesta proteïna mitocondrial, CYP24A1, es important en l'homeòstasi del calci i el sistema endocrí de la VD.

En vista de les evidències que l'1,25D inhibeix la proliferació i l'angiogènesi a més d'induir diferenciació i apoptosi redueix el risc de càncer. A més a més, és plausible assumir que la ràpida degradació de la 1,25D per la CYP24A1 podria interrompre la fisiologia normal de les cèl·lules essent una possible causa de la iniciació i la progressió d'aquesta malaltia. De fet, en varis tipus de càncers s'ha informat de l'augment en l'expressió d'aquest enzim i s'ha associat amb mal pronòstic ²⁰⁰⁻²⁰². Basant-se en aquestes troballes, inhibidors específics o anàlegs de la VD, resistents al catabolisme de la CYP24A1 podrien ser útils per al tractament de diferents tipus de càncers ²⁰³.

9.3 Carència

Nivells de VD inferiors a 20 nanograms per mil·lilitre (ng/mL), generalment són considerats insuficients pel bon manteniment dels ossos i el metabolisme del calci. Tot i això alguns experts apunten que els nivells òptims són fins a 80 (ng/mL). Infants, nonats i joves amb nivells inferiors a 11 (ng/mL) se'ls hi atribueix una carència d'aquesta vitamina. L'institut de medicina de l'acadèmia nacional (*Institute of Medicine of the National Academies*) ha establert les següents quantitats de dosis recomanades (Taula 8):

| ANYS | DOSI DE VD MÍNIMA RECOMANADA (µg/dia i IU/dia) |
|--------------|--|
| 0-50 | 5 µg (=200 IU) |
| 51-70 | 10 µg (=400 IU) |
| +71 | 15 µg (=600 IU) |
| Embarassades | 5 µg (=200 IU) |
| Lactants | 5 µg (=200 IU) |

Taula 8. Taula de les quantitats mínimes establertes d'ingestió de VD. µg=microgram; 1 µg = 40 International Units (IU).

Se l'anomena també vitamina del raquitisme ja que el seu dèficit provoca aquesta malaltia. La VD és l'encarregada de regular el pas dels ions de calci (Ca^{2+}) als ossos. Per això si la VD falta, aquest pas no es produeix i els ossos comencen a debilitar-se i a corbar-se produint-se malformacions irreversibles.

El raquitisme és una malaltia caracteritzada per la reabsorció del fosfat als ronyons, la disminució de la VD i de calci i fosfat en la sang, el calci contribueix al manteniment dels nivells normals de calci i fòsfor en el torrent sanguini. Els casos de raquitisme poden ser deguts a la manca de VD en la dieta, a la manca d'exposició solar (la llum estimula la fabricació de VD a l'organisme) o al consum insuficient d'aliments rics en calci i fòsfor durant la infantesa. És més comú en la infantesa perquè és quan l'organisme demana grans quantitats de calci i fosfat; per això els llocs més freqüents on es dona aquesta malaltia són les poblacions que tenen problemes d'alimentació. L'osteomalàcia és un tipus de raquitisme però s'anomena així quan afecta a adults. El dèficit de VD és el defecte nutricional més freqüent entre la població espanyola. També se li han atribuït altres funcions relacionades amb la regulació del creixement (inhibició), maduració i diferenciació cel·lular^{204, 205}, la secreció hormonal²⁰⁶ i la funció immune²⁰⁷ (Figura 29).

Persones amb deficiència de VD necessiten més medicaments i tractaments per pal·liar el dolor, en malalts amb dolor crònic com fibromialgia, també mostren un estat pitjor de salut i un augment de l'índex de massa corporal (IMC).

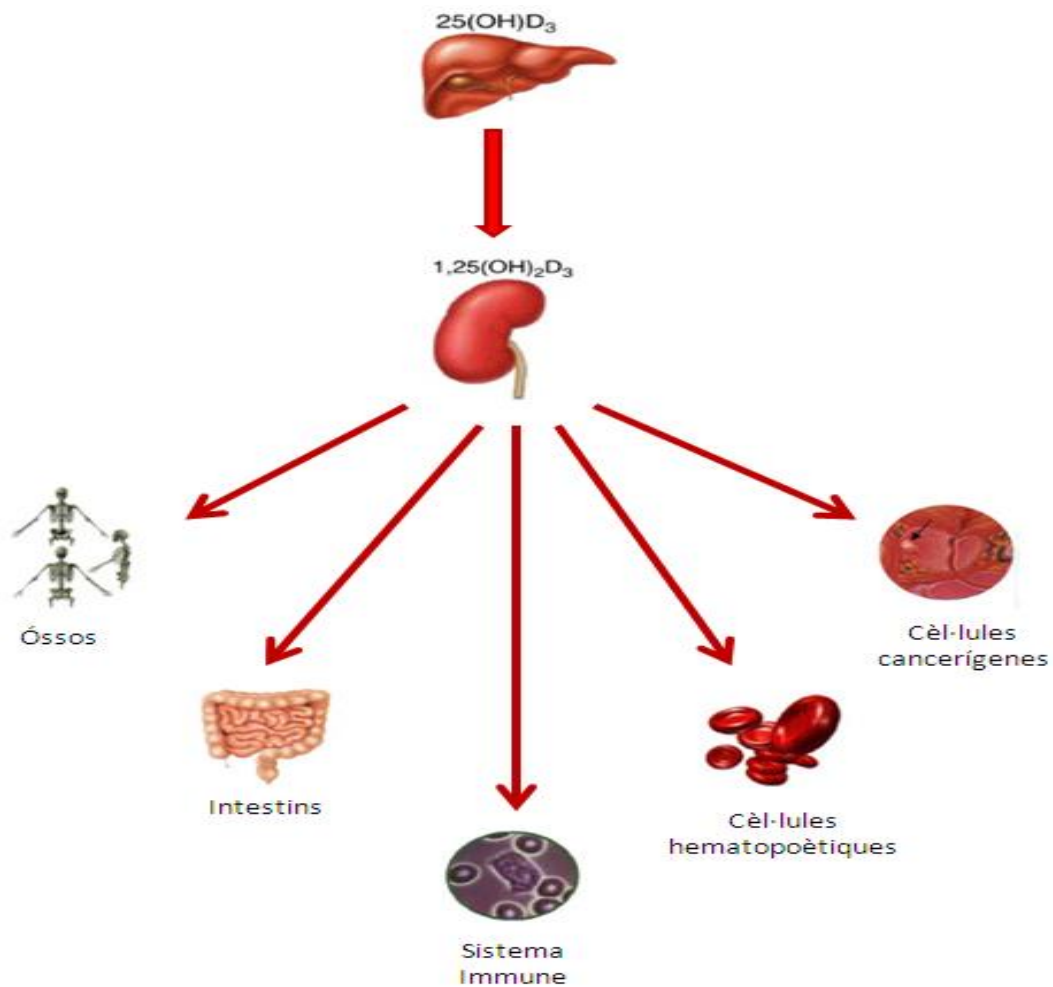


Figura 29. Esquema representatiu dels beneficis extra renals de la VD. En aquest esquema s'observa que la VD té un paper important en la millora de la hematopoesi, induïx diferenciació en cèl·lules del sistema immune, augmenta la mineralització dels òssos, augmenta la correcta absorció del calci i el fòsfor en els intestins, i una de les funcions més importants descrites és que inhibeix/reduïx el creixement de cèl·lules tumorals. Adaptat de ⁶,

10. CÀNCER I VITAMINA D

Com ja s'ha comentat anteriorment, la VD té un paper indispensable en el manteniment del balanç de calci, en la mineralització dels ossos, en la prevenció de malalties autoimmunes i càncer. La funció, però, de la VD en la prevenció del càncer genera controvèrsia. Es parla de deficiència de VD quant els nivells de 25(OH)D, en sèrum, són inferiors a 20ng/ml ^{209, 210}, aquesta carència està associada amb un augment de risc de desenvolupar diferents tipus de càncers ¹⁸³. No obstant això, i, malgrat la gran quantitat de beneficis que suposen uns correctes nivells de VD en la prevenció del càncer, la relació entre nivells baixos de VD, en sèrum, i la predisposició a desenvolupar CE o algun altre tipus de càncer no està del tot ben caracteritzat. El sistema de funcionament de la VD, és força complex, i involucra precursors, metabòlits actius, enzims i receptors. Els coneixements actuals suggereixen que la VD, actua com un factor de transcripció, reduint el risc de desenvolupar càncer a través de la regulació de la proliferació, diferenciació així com la inhibició de la angiogènesis. Per altra banda, un nombre considerable d'estudis afirmen que els principals càncers humans poden ser candidats adequats per la quimioprevenció amb VD ²¹¹⁻²¹⁴.

Cal remarcar que individus amb nivells insuficients de VD, el que determina un possible augment en el risc de desenvolupar càncer, no és solament un defecte en la producció renal de 1,25D. De fet, individus amb nivells normals de 1,25D i nivells baixos de 25(OH)D, en sèrum, tenen un alt risc de desenvolupar càncer de còlon ²¹⁵, mama ²¹⁶ i pròstata ²¹⁷. L'explicació d'aquest fenomen és que diferents tipus cel·lulars, no renals, com colon, mama, cervell, placenta, pàncrees i pell expressen l'enzim CYP27B1 ²¹⁸, per tant són capaces de duu a terme la conversió local de 25(OH)D a 1,25D, que promourà la translocació nuclear de VDR per tal d'induir la seva activitat antitumoral. L'EN humà, expressa CYP27B1 ¹⁹⁹, l'enzim responsable de la última hidroxilació de la VD, per produir 1,25D. Durant l'embaràs, quant l'endometri es apte per la recepció de l'embrió es produeix un augment, en aquest teixit (i s'anomena decidua), de CYP27B1 i aquesta activitat promou l'augment dels nivells de 1,25D circulant per a mantenir uns correctes nivells de calci ^{219, 220}. De fet, alguns especialistes indiquen que dones amb nivells elevats de 1,25D són més fèrtils, ja que

millora la implantació de l'embrió. Un cop l'embrió està implantat i comença a créixer, la placenta produirà 1,25D, que passarà a la circulació.

L'endometri és un teixit diana per a les accions antitumorals del complex 1,25D/VDR, induint diferenciació, apoptosi i aturada del creixement en les línies de CE. En resum, nivells reduïts de 25(OH)D (carència de VD) limiten la producció de 1,25D, per l'enzim endometrial CYP27B1, que, conseqüentment reduirà els efectes antitumorals de l'activitat del VDR, en l'EN, l'EC i en la decidua.

A més a més, estudis recents en ratolins deficients en CYP27B1, incapaços de produir 1,25D, han demostrat que la 25(OH)D activa directament VDR i que hi ha una sinergia amb la unió de 1,25D-VDR, per aturar el creixement en les cèl·lules de càncer de pròstata ^{201, 221}. Per altra banda, ratolins deficients en VDR van ser els més propensos en presentar lesions al còlon comparats amb els heterozigots o els normals.

Com s'ha comentat anteriorment, en humans, els dos enzims responsables de la hidroxilació de la VD₃, són CYP27A1 i CYP2R1. Cal remarcar, que CYP2R1 és considerat l'enzim més crític en aquest pas, ja que mutacions en CYP2R1 però no en CYP27A1 han resultat amb deficiències importants de VD ²²².

L'augment de l'expressió de CYP24A1, l'enzim que degrada tan 1,25D com 25(OH)D, en estats de carència de VD, també contribueix en la progressió del càncer. Aquest augment indueix una reducció en la unió de 1,25D-VDR, ja que per una banda es redueix el seu substrat, 25(OH)D, i per altra banda, hi ha un augment en la degradació local de 1,25D. No obstant això, en el curs del càncer humà, les reduccions en els nivells de VDR, CYP27B1, i, els augments en l'expressió de CYP24A1, compromet l'acció antitumoral local del complex 1,25D/VDR, malgrat els nivells òptims de 25(OH)D.

Els investigadors també estan provant d'utilitzar la VD juntament amb els tractament quimioterapèutics, ja que sembla atenuar els efectes secundaris; millora la qualitat de vida, disminució del dolor, relaxació muscular ²²³. El principal problema, però, de l'administració de calcitriol (1,25D) recau en els seus efectes hipercalcèmics, es tractaria doncs de desenvolupar nous anàlegs de la VD prou efectius per induir

activitat antitumoral i a la vegada minimitzant l'acumulació de calci en les artèries. De fet, estudis clínics han demostrat que la 1,25D (o el seu anàleg amb menys efectes calcèmics) és eficaç en la prevenció i el tractament del càncer ²²⁴⁻²²⁶.

Aquestes propietats anticancerígenes han estat atribuïdes a la 1,25D (calcitriol). Una acurada recerca a mostrat que les cèl·lules, incloent les cancerígenes, expressen el receptor VDR. Quant la 1,25D s'uneix a VDR i aquest al RXR provoca la regulació de més de 200 gens relacionats amb la proliferació, apoptosi, regulació del cycle cel·lular, diferenciació, efectes antimetastàtics, reparació del DNA, angiogènesis ²²⁷⁻²³⁰ (Figura 30). Tot i això són necessaris més estudis per entendre el mecanisme molecular que provoca aquesta millora.

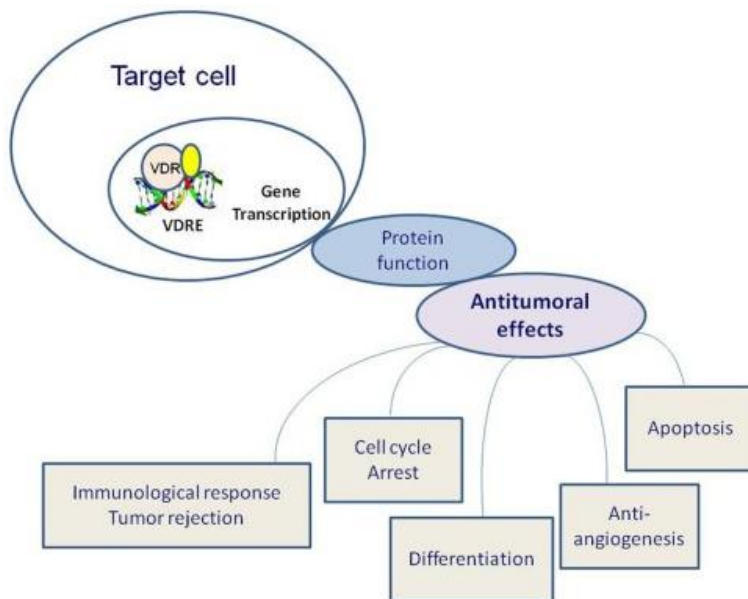
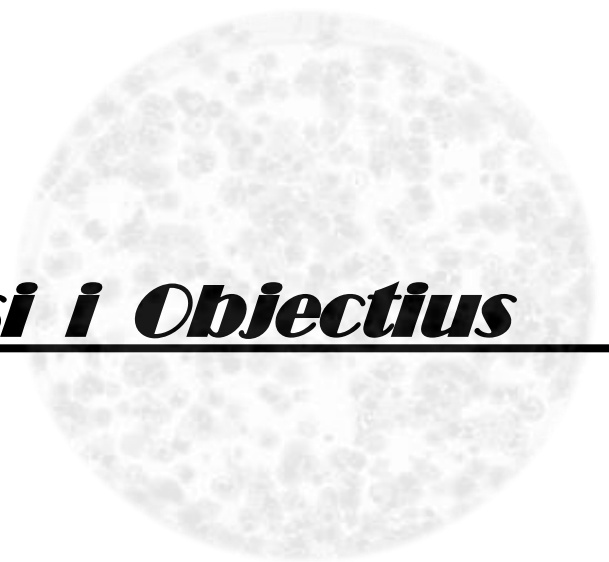


Figura 30. Efectes del antitumorals del VDR. La unió del calcitriol amb el VDR forma un heterodímer amb el RXR i el seu lligand, aquest dímer ocupa seqüències específiques: elements de resposta de la vitamina D (VDREs) que es transcriuran regulant tot una serie de gens ⁷.

Hipòtesi i Objectius



HIPÒTESI I OBJECTIUS

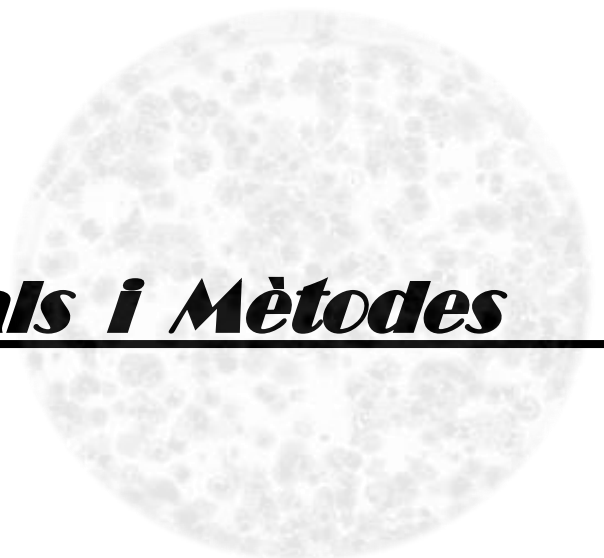
El carcinoma d'endometri detectat a temps té bon pronòstic, però, presenta molt poques opcions terapèutiques un cop es troba en fase avançada, fet que ocorre en un 20% dels carcinomes. Els tractaments actuals per al carcinoma d'endometri són la cirurgia, la quimioteràpia, radioteràpia o la hormonoteràpia, tot i això, en alguns casos el tumor torna a reaparèixer. En aquest sentit, és un fet crucial trobar nous tractaments o noves combinatòries de tractaments actuals per al carcinoma d'endometri que siguin útils.

En aquest treball, hem volgut avaluar l'efecte de diferents agents antitumorals sobre el desenvolupament del carcinoma d'endometri, en monoteràpia o en combinació. Aquestes anàlisis farmacològiques les hem dut a terme en línies de carcinoma d'endometri.

Per assolir aquesta fita ens hem marcat els següents objectius:

1. Caracterització dels efectes del inhibidor de histones deacetilases, Vorinostat (Zolinza), sobre el carcinoma d'endometri.
 - Anàlisi dels efectes de la inhibició de la caspasa-8 en el creixement tumoral en el càncer d'endometri.
 - Estudi dels efectes del tractament conjunt resultant de la inhibició de la caspasa-8 amb Vorinostat com a possible eina terapèutica en el càncer d'endometri.
 - Avaluació dels efectes del tractament combinat amb Vorinostat i diferents antioxidants en la proliferació i la inducció de mort en el carcinoma d'endometri.
2. Testar els efectes de la radioteràpia sobre cultius de carcinoma d'endometri.
 - Comparativa dels efectes del co-tractament amb radioteràpia i Vorinostat en carcinoma d'endometri.
3. Determinar els efectes del tractament amb Vitamina D inactiva (colecalfiferol) sobre línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

Materials i Mètodes



MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

1.1. Cultius cel·lulars de línies de carcinoma d'endometri

Les línies cel·lulars utilitzades en el nostre laboratori i en aquesta tesi són línies de CE humà (tipus I): IK, HEC-1A, RL.95 i AN3CA obtingudes de l'*American Type Culture Collection* (Figura 9)(Taula 31). Totes elles creixen adherides a la superfície de poliestirè de la placa de cultiu, encara que algunes tenen certa tendència a apilar-se.

| EC CELL LINE | PATHOLOGY |
|--------------|---|
| IK | <i>Well differentiated adenocarcinoma</i> |
| HEC-1A | <i>Moderately differentiated adenocarcinoma</i> |
| RL.95 | <i>Moderately differentiated adenosquamos carcinoma</i> |
| AN3CA | <i>Metastatic deposit of adenocarcinoma</i> |

Taula 9. Característiques histopatològiques de les línies de CE.

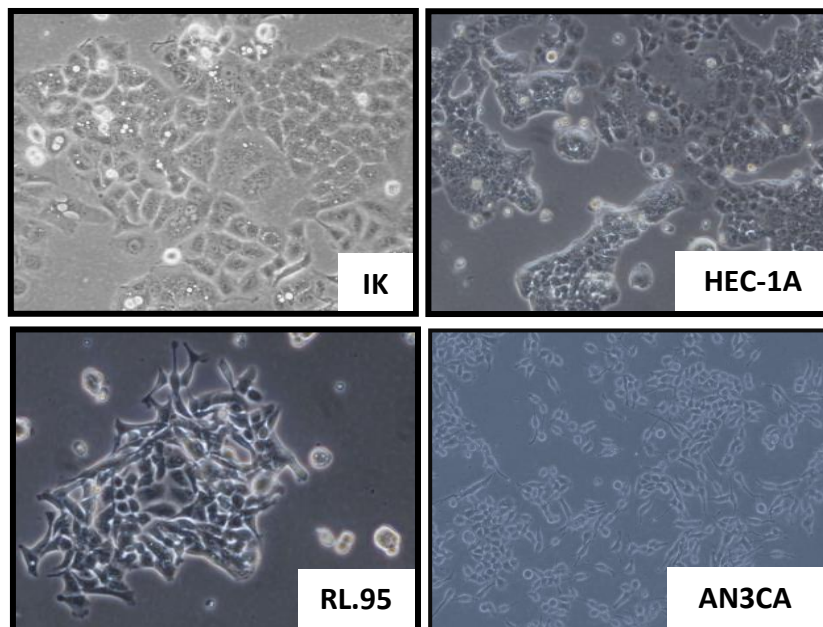


Figura 31. Imatges amb contrast de fase de les línies de CE utilitzades en aquesta tesi: IK, HEC-1A, RL.95, KLE i AN3CA (40X).

El medi utilitzat pel cultiu de les cèl·lules endometrials va ser el medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, GIBCO Invitrogen) complementat amb 10% de FBS inactivat, 10% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1Nm Piruvat Sòdic (GIBCO), i es mantenen a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂. Per al manteniment de les línies, es renta la placa de cèl·lules en tampó fosfat salí (PBS), es desenganxen les cèl·lules amb Tripsina-EDTA (GIBCO) a temperatura ambient, s'inactiva la tripsina amb medi amb sèrum, tot seguit les cèl·lules es recullen i es centrifuguen a 1000rpm durant 3 min. Un cop centrifugades les cèl·lules es dilueixen 1:10 o 1:4 (depèn del tipus cel·lular, ja que cadascuna té un temps de duplicació diferent) i es procedeix al recompte cel·lular mitjançant la cambra de *Neubauer* i amb el colorant vital blau de tripa (0,4%) (SIGMA-Aldrich) a continuació es sembren a la concentració desitjada.

1.2 Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T

Les HEK 293T, una línia cel·lular humana de ronyó embrionari, és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana del epitelí renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. El manteniment d'aquesta línia cel·lular es realitza desenganxant les cèl·lules de forma mecànica (no és necessari l'ús de tripsina), després es centrifuguen les cèl·lules a 1000rpm durant 3 minuts i es divideixen les cèl·lules 1:10 o 1:15, ja que el temps de duplicació és molt ràpid. Les cèl·lules s'incuben a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO₂.

1.3 Recompte cel·lular

1.3.1 Recompte de mort apoptòtica per tinció de *Hoechst 33342*

El reactiu *Hoechst 33342* (SIGMA-B2261) o Bisbenzimidida és un compost fluorescent que s'uneix al DNA i que es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. Pot tenyir tant cèl·lules vives com fixades, ja que degut a la seva estructura molecular pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules intactes.

Pel recompte de la mort apoptòtica es planten les cèl·lules i es realitza el tractament adequat en el temps necessari, es tenyeixen les cèl·lules amb 0.5 µg/ml de colorant *Hoechst* durant 30 minuts a temperatura ambient. Per comptabilitzar la mort

apoptòtica, es consideren positives aquelles cèl·lules que presenten condensació de la cromatina nuclear o aquells nuclis que formen petits orgànuls anomenats nuclis apoptòtics.

1.3.2 Recompte de la proliferació mitjançant l'assaig d'incorporació de BrdU

La BrdU (Bromodeoxyuridine o 5-bromo-2'-deoxyuridine) (SIGMA-B5002) és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina. La BrdU és un compost que s'utilitza de forma molt comú a l'hora de detectar cèl·lules que proliferen; això es degut a que la BrdU té la capacitat de ser incorporada substituint a la timidina en les noves cadenes de DNA, sintetitzades per les cèl·lules que repliquen. El fenomen de replicació és dona durant la fase S del cicle cel·lular.

Per fer l'assaig d'incorporació de la BrdU es necessari que en el medi, de les cèl·lules que volem analitzar, hi hagi aquest compost. Així doncs afegim la BrdU a una concentració final de 4 µg/ml durant 45 minuts.

Un cop transcorregut el temps necessari perquè s'incorpori la BrdU a les cèl·lules, les fixem amb una solució que conté 4% de paraformaldehid (PFA) fred durant 20 minuts a temperatura ambient. Tot seguit fem tres rentats amb solució salina (PBS) i afegim HCl 2M durant 30 minuts a 37°C, perquè el DNA de les cèl·lules es desnaturalitzi i l'anticòs primari sigui capaç de reconèixer la BrdU incorporada. Transcorreguts els 30 minuts afegim Tetraborat Sòdic 0,1M durant 2 minuts al pou, per tal de neutralitzar el HCl. Tot seguit tornem a fer 3 rentats amb PBS i afegim la solució de bloqueig, que conté PBS + 5% *Horse Serum* (HS) + 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS) + 0.2% glicina + 0.1% Tritó (TX-100), durant 1 hora a temperatura ambient. Després rentem 3 cops amb PBS, i incubem les cèl·lules amb l'anticòs primari durant 18 hores a 4°C. L'endemà rentem els pous tres cops amb PBS i afegim l'anticòs secundari, en el nostre cas és un anticòs conjugant a un fluorocrom Dylight594 (Jackson), i també s'afegeix 0,5 µg/ml de *Hoechst* durant 1 hora a temperatura ambient. Després es renten els pous res cops més amb PBS i s'analitzen i es compten el nombre de cèl·lules positives per BrdU mitjançant un microscopi òptic de fluorescència.

1.4 Viabilitat cel·lular

1.4.1 MTT

La valoració de la viabilitat cel·lular es va realitzar mitjançant la determinació de l'activitat enzimàtica cel·lular, pel mètode de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazol (MTT) (SIGMA-M-2128). Aquest assaig avalua l'activitat de l'enzim succinat deshidrogenasa (SDH) de les mitocondries de les cèl·lules en cultiu. La SDH catalitza la conversió del MTT a un formazan intracel·lular de color púrpura, que és soluble amb DMSO i quantificable amb un espectròmetre. La quantitat de cèl·lules metabòlicament actives és directament proporcional a l'absorbància obtinguda. Pels assajos de proliferació de les cèl·lules es va plantar 10.000 cèl·lules en pous d'una placa "multi-well" de 96 pous (M96 (0.32-0.6cm²)) i es van contar el nombre de cèl·lules al llarg dels dies indicats. Es van realitzar almenys triplicats per cada temps i l'experiment es va repetir com a mínim tres vegades.

1.4.2 Assaig Clonogènic

La capacitat clonogènica d'una cèl·lula be donada, per la capacitat que té aquesta de formar una colònia de cèl·lules a partir d'una sola. Les cèl·lules són plantades el més individualitzades possible (1x10³ per pou M6 (9,5cm²) o bé 7x10² per pou M24 (2cm²)), cada condició es va plantar per triplicat, la determinació d'aquesta capacitat és duu a terme quan han passat de 12-14 dies. És realitza una tinció d'MTT (0,5mg/ml), després es fixen les cèl·lules amb formol durant 10 minuts i es renten amb PBS. Les colònies es quantifiquen amb el programa de processament d'imatge digital *Image J*.

1.5 Producció de lentivirus

1.5.1 Transfecció amb polietilenamina (PEI)

La majoria de les membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, essent molt difícil que les molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin travessar-les. Els lípids catiónics, com la polietilenamina, condensen el DNA plasmídic, neutralitzant així les carregues negatives i protegint-lo de l'acció de les DNases. Els agregats resultants tenen alta afinitat per les cèl·lules, donant lloc a una alta efectivitat de transfecció²³¹. La polietilenamina (PEI) (SIGMA-408727) s'utilitza des de 1995 com a

vector de concentració i presenta l'avantatge que no requereix d'alta confluència en el cultiu i és força econòmic.

La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics. Diluïm 5 µl de PEI 1X (10 mM) per cada µg de DNA, en una solució salina estèril (NaCl 150 mM) 5 cops superior al PEI. El DNA el diluïm en solució NaCl 150 mM en el mateix volum que està diluït el PEI. Un cop tenim les dues barreges per separat, afegim la solució de PEI damunt de la solució del DNA i es vorteja durant 30-60 segons. La barreja es deixa reposar durant 20 minuts a temperatura ambient, temps durant el qual es formen els complexos de PEI amb el DNA. La solució de transfecció s'afegeix damunt la placa de cultiu gota a gota. Entre 3-4 hores després de la transducció, es canvia el medi que conté els complexos per el mateix medi de cultiu de la línia cel·lular.

1.5.2 Producció i concentració de lentivirus en la línia cel·lular HEK293T

Degut a la gran quantitat de partícules lentivirals necessàries per infectar cultius primaris es necessari partir almenys de 3 plaques p100 de cèl·lules HEK293T a una concentració aproximada de 35×10^4 cèl·lules per placa. L'endemà de ser plantades les cèl·lules, es canvia el medi de les cèl·lules per un medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum, i es mantenen les cèl·lules en repòs a l'incubador a 37°C durant almenys una hora, temps durant el qual aprofitarem per fer la barreja de transfecció.

Es transdueix un total de 30 µg de DNA per placa, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 1:1:1. És a dir, 10 µg del plasmidi lentiviral, 10 µg de plasmidi empaquetador psPAX2 i 10 µg del plasmidi PMD2G que codifica per l'embolcall víric. Cal un total de 100 µl de PEI per transduir 30 µg de DNA. Tant el DNA com el PEI es ressuspenen en 0,5 µl de solució NaCl 150 mM estèril. S'afegeix la solució de PEI sobre la solució del DNA i es vorteja immediatament. La barreja es deixa reposar durant 10 minuts, passats els quals s'afegeix a la placa de HEK293T i es deixa a l'incubador durant 3-4 hores. Posteriorment es canvia el medi. Al cap de 24 hores el medi ja conté partícules víriques. Generalment recollirem el medi amb les partícules víriques al cap de 3-4 dies després de la transfecció. Segons l'eficàcia de transducció del model cel·lular, els cultius es poden o bé transduir directament del medi recollit al cap de 3-4 dies, o bé (com és el nostre cas) cal que els virus siguin concentrats. Per concentrar el

virus, es fa servir una columna de concentració (VIVASPIN 20) i es centrifuga durant 2 hores a 4000 rpm el volum obtingut de tres plaques de cultiu.

1.5.3 Transducció de línies cel·lulars mitjançant lentivirus

Un cop obtinguda la concentració de cèl·lules desitjada en la placa de cultiu en respòs en l'incubador a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂, s'afegeix al pou que volem infectar, una desena part del medi concentrat de partícules lentivirals més Polybrene (Hexadimethrine Bromide) (SIGMA-H9268) a una concentració final de 8 µg/ml. Les línies cel·lulars es deixen en contacte amb el virus durant 16-18 hores i posteriorment reemplacem el medi, les cèl·lules hauran incorporat la partícula en uns 4 dies.

1.6 Tractaments *in vitro*

Els tractaments als que van ser sotmeses les cèl·lules són els següents:

- Tractament amb Vorinostat: afegint al medi de cultiu Vorinostat a diferents concentracions (1-10µM) durant 24, 48 o 72 hores.
- Tractament amb Antioxidants: afegint al medi de cultiu Nac (5mM, 10mM), Tiron (1mM, 5mM), Bha (300µM, 500µM) durant 24 hores. Els antioxidants van ser utilitzats en concentracions no tòxiques per a aquestes línies cel·lulars.
- Tractament amb l'inhibidor general de caspases: es va realitzar un tractament de z-VAD-fmk, a concentracions de 2,5-15µM.
- Tractament amb l'inhibidor de la caspasa-8: es va realitzar un pre-tractament de 2 hores amb z-IETD-fmk, a concentracions de 100 i 200µM.
- Tractament amb l'inhibidor de la caspasa-9: es va realitzar un pre-tractament de 2 hores amb z-LEHD-fmk, a concentracions de 50, 100 i 200µM.
- Tractament amb Vitamina D₃/Cholecalciferol: afegint al medi de cultiu VD₃ a una concentració de 10µM durant 48 hores.

| FÀRMAC | PROVEÏDOR | SOLUCIÓ STOCK | SOLVENT |
|-------------------------|-------------------|---------------|---------|
| Vorinostat | Merk | 50mM | DMSO |
| Nac | SIGMA-A7250 | 50mM | PBS 1X |
| Tiron | SIGMA-172553 | 1M | PBS 1X |
| Bha | SIGMA-B1253 | 1M | PBS 1X |
| z-VAD-fmk | Calbiochem-551476 | 10mM | DMSO |
| z-IETD-fmk | Calbiochem-218759 | 10mM | DMSO |
| z-LEHD-fmk | Calbiochem-218841 | 5mM | DMSO |
| Vitamina D ₃ | Calbiochem-679101 | 4,5M | Etanol |

Taula 10: Fàrmacs utilitzats en aquesta tesi.

- Tractament amb radiació ionitzant: les plaques de cultiu amb les cèl·lules són irradiades al Servei de Radioteràpia Oncològica de l'HUAV, a dosis de 0-10 Gy. S'utilitza l'accelerador lineal Clinac 2100C (Varian), prèviament els físics del servei juntament amb la Dra. Virginia Garcia van calcular l'amplada del plàstic (de les plaques de cultiu) per tal de que les radiacions ionitzant penetressin perfectament fins el medi de cultiu on es troben les cèl·lules en monocapa.

2. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

2.1 Construccions plasmídiques

En l'enginyeria genètica, un vector és una molècula de DNA que pot ser utilitzada per introduir una seqüència de DNA a una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plasmidi o un genoma viral. Els plasmidi són petites molècules de DNA circular extracromosòmic que es troben a molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i poden haver-hi múltiples còpies del plasmidi en la mateixa cèl·lula.

Els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per la seva pròpia estructura, però no tenen la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. És per això que els virus es repliquen envaint cèl·lules.

2.1.1 Clonatge de construccions de shRNAi

La interferència de RNA mitjançant shRNAi (*short hairpin RNA interference*) indueix la degradació d'un RNA missatger concret, mitjançant la utilització de siRNA (*small interfering RNA*), que són fragments de RNA entre 22-25 nucleòtids, derivats de la fragmentació del RNA lineal de doble cadena, que s'uneix a les seqüències de RNA homologues induint la seva degradació. Veure Figura 32.

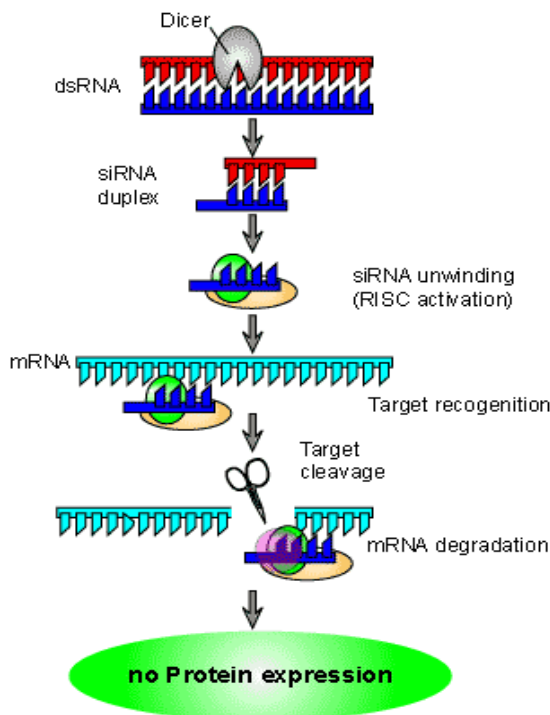


Figura 32: Via d'interferència del RNA. DICE, un membre de la família de RNAsa III, talla de forma dependent d'ATP les cadenes llargues de RNA de doble cadena formant el shRNAi. Aquests siRNA un cop relaxats s'incorporen dintre el complex inductor del silenciament del RNA (RISC). Un cop la cadena simple anti-sense està unida a RISC dirigeix aquest cap al RNAm que li és complementari i es dona un tall endonucleotídic de la cadena del RNAm, truncant així la traducció del mRNA.

La tècnica d'interferència del RNA s'utilitza àmpliament per a silenciar l'expressió gènica d'una seqüència específica.

2.1.1.1 Subclonatge shRNAi en vector FSVsi

Primer de tot, i com en qualsevol clonatge, hem de digerir el vector amb els enzims corresponents, per tal de crear uns extrems compatibles amb els extrems del nostre insert. En el nostre cas digerirem amb els enzims Age I i Bam HI. Un cop digerit el vector, aquest s'ha de netejar de sals i dels enzims de restricció i/o dels fragments de

DNA que no ens interessin. Per dur a terme aquest procés s'utilitzen kits comercials (Qiagen) de purificació de DNA a partir de gels d'agarosa.

Un cop tenim l'insert i el vector preparats, es fa la reacció de lligació, que es realitza en una proporció molar de 1:3 de plasmidi respecte a l'insert, utilitzant l'enzim T4 Lligasa (Roche-10799009001), i es transforma en la soca bacteriana *E. Coli* DH5 α . La transformació dels bacteris competents es realitza per un protocol de xoc tèrmic.

Un cop transformada la lligació, cal escollir quines colònies han internalitzat el vector amb l'insert i descartar aquelles que han internalitzat el plasmidi buit. Per aquest motiu es realitza una reacció de PCR utilitzant uns primers que s'uneixen al plasmidi, concretament a la regió flanquejant de l'insert. Així doncs, si el plasmidi conté l'insert obtindrem un fragment de 250bp, en canvi si el plasmidi no conté l'insert obtindrem un fragment de 200bp.

En el cas del sistema en el vector FSVsi, és provoca una disminució de l'expressió de gen diana de forma eficient i específica. El FSVsi és un vector d'expressió en mamífers que dirigeix la síntesi de transcrits de siRNA sota el promotor U6. A més a més, aquest vector conté una variant de "Venus" YFP (proteïna fluorescent groga) sota el control del promotor V40. L'estratègia del subclonatge es basa en trobar una seqüència adient de 19-21 nucleòtids que pertanyi al gen diana amb la que es dissenyen els dos primers, el Fwd (*Forward*) i el Rev (*Reverse*).

L'anellament del primers es realitza en 50mM Hepes a un pH de 7,4 en 100mM NaCl, utilitzant una concentració de cada primer de 3 μ g/ μ l. El protocol d'anellament del primers va disminuint progressivament la temperatura de 94 $^{\circ}$ C a 25 $^{\circ}$ C.

Així doncs, utilitzat dita tècnica hem obtingut les seqüències descrites en la Taula 11.

| GEN | SEQÜÈNCIA DE OLIGONUCLEÒTIDS (5'→3') |
|----------------------|--------------------------------------|
| FSV-Caspasa-8 (humà) | GAATCACAGACTTTGGACAA |

Taula 11. Seqüència de Oligonucleòtids, escollida per al RNA d'interferència del gen d'estudi.

2.2 Amplificació en cadena de la polimerasa

2.2.1 Extracció de RNA

L'extracció del RNA dels cultius cel·lulars es fa utilitzant el kit comercial *RNAeasy mini kit* (Qiagen-74104) acoblat a digestió amb DNAsa I, que elimina tot el DNA genòmic contaminant que pugui restar en la mostra i que donaria una senyal falsa. Els extractes de RNA es guarden a -80°C i es verifica que no hi hagi degradació, mitjançant un gel d'agarosa al 2%. La quantitat de RNA es quantifica en el NanoDrop ND-1000.

2.2.2 Síntesi de cDNA

Un cop obtingut el RNA total, utilitzarem 1 µg de mostra per la síntesi de cDNA mitjançant el protocol de l'enzim retrotranscriptasa de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems-4304437). Un cop sintetitzat el cDNA, aquests ja es pot utilitzar per una PCR a temps real (RT-PCR).

2.2.3 RT-PCR

La tècnica de PCR a temps real, a més d'utilitzar *primers* específics, utilitza també una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom que el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) llegeix i quantifica. El programa que vam utilitzar va ser de quaranta cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Tant els primers com les sondes van ser adquirides a Applied Biosystems (Taula 12).

| GEN | CODI |
|-------------------|---|
| Flip/CFLAR | Hs01116280_m1 |
| HIF-1α | Hs00153153_m1 |
| VEGFRA | Hs9999970_m1 |
| GAPDH | Hs99999905_m1; com a control de càrrega |
| GUSB | Hs.PT.53a.3993263; com a control de càrrega |
| CYP27A1 | Hs.PT.56a.14491853 |
| CYP2R1 | Hs.PT.56a.39660677 |

Taula 12. Sondes per a l'anàlisi de RT-PCR.

Els resultats van ser obtinguts en forma de nombre de Ct (*cycle threshold*) que és el cicle de PCR en que comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA teníem de partida més baix era el Ct que obteníem de resultat. La quantitat relativa de mRNA de cada gen es va calcular de la següent manera: $\Delta Ct = Ct$ del gen diana - Ct del gen GAPDH, $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct$ mostra - ΔCt control. A partir d'aquests càlculs la concentració relativa de RNA en comparació al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Amb aquests valors vam calcular les mitges i els errors estàndards de cada mostra per triplicat.

2.3 Immunodetecció de proteïnes

2.3.1 Immunofluorescència

Un cop finalitzat el tractament en els nostres cultius cel·lulars, les cèl·lules es renten en solució salina PBS i es fixen o bé amb Paraformaldehid al 4% durant 15 minuts o bé amb metanol 100% durant 5 minuts. A continuació es fan tres rentats amb PBS, aspirant suaument i amb compte de no deixar eixugar els pouets.

Abans de la incubació amb l'anticòs primari, cal incubar durant una hora en solució de bloqueig (PBS amb 2% HS, 2%BSA i 0,2% Tritó X-100). Durant el procés de bloqueig en realitat es donen dos processos, ja que el Tritó permet la permeabilització de les membranes, fet que permetrà l'accés dels anticossos als seus antígens específics; al l'hora gràcies a l'acció de la BSA i el Sèrum de cavall és fa el bloqueig dels llocs d'unió inespecífics.

L'anticòs primari (Taula 13) s'incuba durant dos hores, en el cas dels cultius en dues dimensions, o bé durant 16 hores en el cas de cultius en tres dimensions a temperatura ambient. Després de tres rentats amb PBS s'incuba durant 2-3 hores l'anticòs secundari i el *Hoechst* (Taula 14). Aquesta incubació es realitza a les fosques ja que l'anticòs secundari està marcat amb fluorescència. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts en PBS i es guarden les plaques a 4°C i a les fosques fins la seva observació al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus.

| ANTIGEN | DILUCIÓ | PROVEÏDOR | Nº CATÀLEG |
|------------------------|---------|-----------|------------|
| VDR-antibody clone 9A7 | 1/300 | Millipore | 04-1526 |
| H2AX (Ser 139) | 1/500 | Millipore | 05-636 |

Taula 13: Anticossos primaris utilitzats en assaigs d'immunofluorescència.

| ANTIGEN | DILUCIÓ | PROVEÏDOR | Nº CATÀLEG |
|------------------------------|---------|------------|------------|
| FITC labeled Rat (Red fluor) | 1/300 | Invitrogen | 11007 |
| Mouse IgG (H+L) Green | 1/300 | Invitrogen | A11029 |
| Mouse IgG (H+L) Red | 1/300 | Invitrogen | T6390 |
| Rabbit IgG (H+L) Green | 1/300 | Invitrogen | A11008 |

Taula 14: Anticossos secundaris utilitzats en assaigs d'immunofluorescència i/o Western Blot.

2.3.2 Western Blot

2.3.2.1 Extracció de proteïna total en SDS

Després de cada tractament, les cèl·lules en qüestió es renten en tampó fosfat salí fred (PBS) a pH 7,2 abans de procedir a l'extracció proteica pertinent. L'extracció proteica s'ha de fer de forma ràpida i eficient, per evitar degradacions i per a què l'extracte representi fidelment l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. D'aquesta manera s'obté una barreja desnaturalitzada dels components cel·lulars. És un mètode d'extracció eficient perquè trenca les interaccions entre les proteïnes i permet l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més el detergent SDS (**Sodi Dodecyl Sulfate**) desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims incloses les proteases que podrien danyar l'extracte. El tampó d'extracció és Tris-HCL 62,5 mM (pH 6,8) al 2% de SDS (Lab Clinics-20760.03), s'afegeix sobre la placa de cultiu, que prèviament ha estat rentada en PBS fred.

2.3.2.2 Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry

La quantificació de proteïnes abans de migrar les mostres en gels SDS-PAGE és necessària per a la posterior interpretació dels resultats. Si les diferents mostres, d'un mateix experiment per a la immunodetecció de proteïnes, no estan igualment carregades al gel, no es podran extraure conclusions, ja que no se sabrà si les diferències són degudes només a la càrrega o als efectes del nostre tractament. Per aquest motiu, hem utilitzat el mètode de Lowry per a determinar la quantitat de

proteïna en cada mostra. La casa Bio-Rad, comercialitza els reactius per a la quantificació. Breument, en una placa de 96 es fiquen unes mostres amb concentracions conegudes de BSA, que ens faran de punts en la recta patró, i les mostres a determinar, per duplicat. Es barregen els reactius A i S (en proporció 50:1) (Biorad 500-0113, 500-0115) i s'afegeix 25 µl de la barreja als pous. A continuació s'afegeix el substrat fluorogènic (reactiu B) (Biorad-500-0114) a cada pou, i es deixa reposar la reacció durant 5 minuts. Transcorregut aquests temps, es llegeix la placa a una absorbància de 595nm. Els valors d'absorbència de les mostres s'extrapolen als de la recta patró per tal de determinar la seva concentració proteica.

2.3.2.3 Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Els gels desnaturalitzants de poliactilamida en presència de SDS s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (Biorad-161-0156), que és una solució al 30% acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (SIGMA-T9281) com a iniciador de la reacció i el persulfat d'amoni (S₂O₈) al 0,05 % com a catalitzador.

Hem utilitzat gels discontinus, formats bàsicament per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior (o gel concentrador) on es carreguen les mostres, hi fiquem un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara en tampó Tris-HCL 125µM a pH 6,8, i serveix per a portar totes les proteïnes del pouet al mateix temps a l'entrada del gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCL 375µM a pH 8,8, el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 250 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 720nM β-mercaptoetanol (Biorad-161-0710) i blau de bromofenol), es porten totes a un mateix volum amb tampó de càrrega 1x i es carreguen al gel. En el primer pou es carrega un marcador de pes molecular pretenyit (Invitrogen-10748-010). L'electroforesi es migra a un amperatge constant a 100 V en

un tampó de migració (25mM Tris, 1,44% glicina, 0,1% SDS) en el sistema de BioRad's MiniProtean System.

2.3.2.4 Transferència de proteïnes

Un cop les proteïnes estan separades es transfereixen a una membrana de PDVF (Immobilon-P, IPVH00010). El mètode usat per la transferència és el BioRad's MiniProtean System on es forma un *sandwich* amb el gel, la membrana i paper Watman; tot això és col·locat en una solució de transferència (25 mM Tris, 192 mM glicina a pH=8,3) i es corre a 280 mA constants durant 1 hora i mitja. En acabar, la membrana es bloqueja amb llet en pols descremada en TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) a una concentració del 3-5% durant una hora, per tal d'eliminar les hibridacions inespecífiques.

2.3.2.5 Immunodetecció de proteïnes

Un cop bloquejada la membrana, es fan tres rentats de 15 minuts en TBS-T i s'incuba la membrana en una dilució de l'anticòs primari (Taula 15), amb 0,02% d'Azida sòdica per evitar contaminacions bacterianes i així poder reutilitzar l'anticòs. La incubació s'acostuma a realitzar durant tota la nit a 4°C, encara que en alguns casos es pot fer durant 1 hora a temperatura ambient.

Tot seguit es recupera i guarda a 4°C la solució de l'anticòs primari i es fan 3 rentats de 15 minuts de la membrana en TBS-T, i s'incuba amb la dilució de l'anticòs secundari (Taula 14) en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. En acabar, es renta la membrana tres vegades amb TBS-T.

L'anticòs secundari està conjugat a peroxidasa, i per detectar-la utilitzem uns reactius comercials que associen la catàlisi de l'aigua oxigenada a l'oxidació del luminol, donant lloc a un increment de la quimioluminescència. Els reactius utilitzats per revelar la senyal són EZ-ECL (REACTIVA-20-500-120) i ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences-RPN2135, RPN2232) que utilitzem respectivament si tenim molta o poca senyal quimioluminiscent. La membrana s'analitza amb el *VersaDoc Imaging system Model 4000* (BioRad Laboratories). Les senyals han estat quantificades amb el software del *Quantity One* (BioRad).

| ANTIGEN | DILUCIÓ | PROVEÏDOR | Nº CATÀLEG |
|--------------------|---------|--------------------------|------------|
| Acetyl-Histona 4 | 1/1000 | Cell Signaling | 2591S |
| Bcl-2 | 1/1000 | BD Transduction | 610538 |
| Bcl-xL | 1/1000 | BD Transduction | 610212 |
| Caspasa-8 | 1/1000 | Calbiochem | AM46T |
| Caspasa-9 | 1/1000 | Cell Signaling | 9508 |
| Caspasa-2 | 1/1000 | BD Transduction | 611023 |
| Caspasa-3 (Asp175) | 1/1000 | Cell Signaling | 9661 |
| Ciclina D1 | 1/1000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-20044 |
| FADD | 1/1000 | BD Pharmingen | 556402 |
| Flag | 1/1000 | SIGMA | F.1804 |
| Flip (NF6) | 1/1000 | Enzo Life Science | L13913 |
| H2AX (Ser139) | 1/1000 | Millipore | 05-636 |
| Histona H1 | 1/1000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-8030 |
| LDH | 1/1000 | Rockland | 100-1173 |
| Tubulina | 1/10000 | SIGMA | T5168 |

Taula 15: Anticossos primaris utilitzats en assaigs de Western Blot.

2.4 Assaig d'activitat luciferasa

La línia cel·lular de carcinoma endometrial, IK, es va sembrar en plaques múltiples de 24 pouets, i es van transfectar utilitzant Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant, amb el reporter NFkB-LUC juntament amb un plasmidi que codifica β -galactosidasa. Després de 24 hores, les cèl·lules es van tractar amb Vorinostat 3 μ M. Un cop finalitzat el temps de tractament les cèl·lules es van lliar amb 60 μ l de tampó de lisi de luciferasa (glicina 25mM pH=7.8, Mg₂SO₄ 15mM, 1% de Tritó X-100, EGTA 5mM) i remoure durant 15 minuts sobre gel. Es van transferir 30 μ l del lliat en plaques de 96 pouets i es va afegir a sobre del lliat 30 μ l del tampó d'assaig de luciferasa a una concentració final de (glicina 25mM, KHPO₄ 15mM pH=7.8, Mg₂SO₄ 15mM, 1% de Tritó X-100, EGTA 5mM, que conté 1mM de ditiotretitol, 2mM d'ATP, 100mM d'acetil-coenzim A i 100mM de luciferina). L'activitat luciferasa es va mesurar utilitzant un luminòmetre de microplaques. Després de la mesura de la luciferasa 60 μ l de tampó β -galactosidasa 2X (NaPO₄ 200mM, KCl 20mM, MgSO₄ 2mM i 4mg/ml d' α -nitrofenil β -D-galactopiranòsid) es va afegir a cada pouet i es va mesurar en un lector de microplaques a 415, per la lectura de la proteïna.

3. CITOMETRIA DE FLUX (FACS)

3.1 Detecció del ROS (Espècies reactives d'Oxigen)

Les cèl·lules un cop incubades el temps necessari i amb el tractament adequat, es van incubar amb la sonda H2DCFDA (20µM) (Invitrogen, D-399), per la mesura de la producció de ROS. Passats 30 minuts, les cèl·lules van ser rentades en PBS i tripsinitzades, centrifugades durant 5 minuts a 1000 rpm i rentades amb PBS, ressuspeses en 500 µl de PBS i estimada la fluorescència a través de citometria de flux. Es va assumir com a control positiu cèl·lules tractades amb H₂O₂ durant 30 minuts.

3.2 Avaluació del MMP (Potencial de Membrana Mitocondrial)

Les cèl·lules un cop incubades el temps necessari i amb el tractament adequat, es van incubar amb la sonda *Rhodamine 123* (0,3µgr/ml) (SIGMA-83702), per tal de detectar pèrdua en el potencial de membrana mitocondrial. Passats 30 minuts, les cèl·lules van ser rentades en PBS i tripsinitzades, centrifugades durant 5 minuts a 1000 rpm i rentades amb PBS, ressuspeses en 500 µl de PBS 1X i estimada la fluorescència a través de citometria de flux. Es va assumir com a control positiu cèl·lules tractades amb H₂O₂ durant 30 minuts.

3.3 Assaig d'Annexina

Les cèl·lules un cop incubades el temps necessari i amb el tractament adequat, les cèl·lules van ser rentades dos cops en PBS i tripsinitzades, centrifugades durant 5 minuts a 1000 rpm i rentades amb PBS, ressuspeses en 500 µl de Binding Buffer 1X (0.1M HEPES (pH=7.4), 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂). A 100 µl del volum es va afegir 5µl d'AnnexinaV FITC (Santa Cruz, sc-4252) i 5µl de Iodur de Propidi (BD Falcon-556463). Passats 15 minuts en la foscor, es va afegir 400 µl de Binding Buffer 1X i les cèl·lules van ser avaluades en la fluorescència a través de citometria de flux. Els resultats van ser analitzats utilitzant el programa Win MDI 2.9, pel càlcul del nombre de cèl·lules apoptòtiques, necròtiques o les supervivents.

| | |
|--|--|
| A - / IP + Cèl·lules necròtiques | A + / IP + Cèl·lules mortes totals |
| A - / IP - Cèl·lules vives | A + / IP - Cèl·lules apoptòtiques |

Taula 16: Quadre representatiu d'un assaig d'Annexina. Cada apartat ens informa de l'estat de les cèl·lules.

3.4 Cicle cel·lular

La distribució del cicle cel·lular es va determinar amb l'addició del iodur de Propidi, un compost de color vermell que s'uneix tant al DNA com al RNA. Un cop acabat el tractament en qüestió, es recullen les cèl·lules, es van fixar amb etanol al 70% fred i mantingudes a 4°C, fins el dia de l'anàlisi. Es van rentar les cèl·lules dos cops amb PBS, centrifugar i es van ressuspèndre en PBS amb iodur de Propidi (0.02mg/ml), Tritó X-100 (0,1%) (SIGMA-T8787) durant 30 minuts en la foscor. Es va mesurar la fluorescència estimada a través de citometria de flux. Els resultats van ser analitzats utilitzant el programa Win MDI 2.9.

4. DETECCIÓ DE 25(OH)D₃

La quantitat de 25(OH)D₃ sintetitzada a partir de vitamina D inactiva (cholecalciferol), en les IK, que quedava dins la cèl·lula es va mesurar utilitzant l'assaig de quimioluminiscència-Immuno de 25(OH)D a l'enllaç XL Analyzer (DiaSorin).

Les IK es van sembrar en plaques de 100 mM i es van exposar al vehicle (0.1% d'etanol) o 10µM de cholecalciferol durant 0, 12, 24 o 48 hores. A continuació, es va retirar el medi, i les cèl·lules unides enganxades es van rentar amb PBS. Els metabòlits de la vitamina D es van obtenir mitjançant l'extracció amb acetonitril, tal i com s'ha descrit anteriorment²³². Les mostres es van centrifugar a 2500 rpm durant 10 minuts per obtenir-ne el sobrenedant (que contenen els metabòlits de la vitamina D) i es van assecar durant 2 minuts sota buit.

La solució restant es va sotmetre a dos extraccions líquid-líquid amb acetat d'etil, com es descriu a ²³³. Les fases superiors, agrupades, es van assecar en atmosfera de nitrogen i la 25(OH)D₃ intercel·lular es va mesurar per a l'assaig de Liason.

5. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

5.1. Consideracions prèvies

Els mètodes experimentals utilitzats en els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

1. Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
2. Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
3. Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

A més a més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

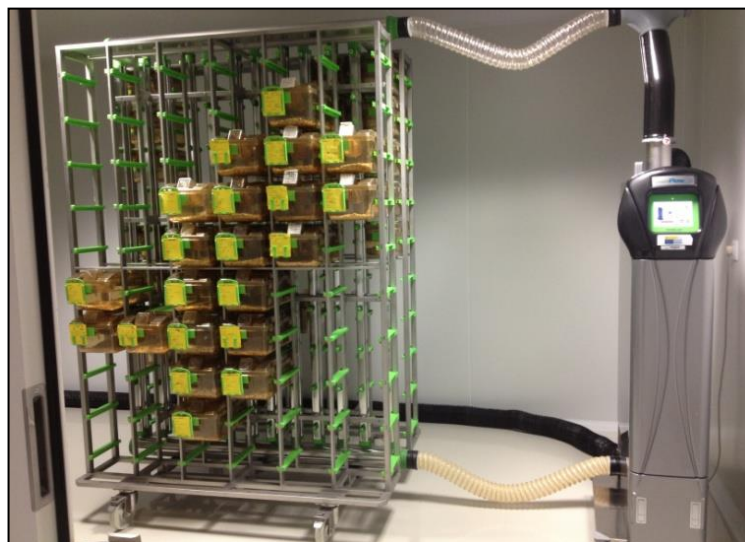


Figura 33. Imatge de la sala on es troben els *racks* ventilats amb els ratolins SCID.

5.2. Animals i tractaments

5.2.1 Ratolins SCID

Els ratolins SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de poder donar una resposta immune apropiada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments. Aquests ratolins s'utilitzen com a model animal per l'estudi de tumors subcutanis o xenografts.

5.4.2 Tumors subcutanis en ratolins SCID

Per l'estudi de la proliferació dels tumors subcutanis o xenografts *in vivo* es van utilitzar ratolins SCID femella d'aproximadament 8-12 setmanes d'edat i un pes comprès entre els 20-25 grams. El menjar i l'aigua estaven disponibles *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12. Es va injectar subcutàniament 10^6 cèl·lules de les línies cel·lulars IK o HEC-1A (segons experiment). El creixement tumoral es va mesurar cada setmana mitjançant un peu de rei digital, a partir del dia 38 es van començar els tractaments (detallats a l'apartat 3.4.3), els animals van ser sacrificats per dislocació cervical quant el tumor va adquirir un tamany màxim de $2,5\text{cm}^3$. El volum tumoral es va calcular d'acord amb la fórmula TV (*Tumor Volume*): $d^2 \times D / 2$, on la lletra *d* equival al diàmetre més curt i la lletra *D* al més llarg.

Els cultius cel·lulars utilitzats en els experiments *in vivo* d'aquesta tesis eren negatius en la detecció de la contaminació de micoplasma. Per la detecció d'aquest organisme es va utilitzar el MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex).

5.4.3 Tractament dels animals

Els tractaments dels animals varen ser:

- Vorinostat: 200 mgr de Vorinostat van ser dissolts en 800µl de DMSO fins arribar a una concentració de 12.5mg/ml. Aliquotats i mantinguts a -80°C fins la

seva utilització. En el moment del tractament vam afegir 475µl de Corn Oil (amb PBS va resultar no se soluble) fins arribar a una concentració de 50mg/kg/day. Es va injectar intraperitoneal 100µl/animal durant 2 setmanes 5 dies/setmana.

- Nac: aquest antioxidants es preparava cada dia fresc. 50mg de N-acetilcistina (SIGMA-A7250) van ser dissolts en 200µl de PBS fins arribar a una concentració de 62.5mg/ml, es mantenia en agitació entre 28-40°C durant 45 minuts. En el moment del tractament vam afegir 2250µl de PBS per cada 75µl inicials, fins arribar a una concentració de 250mg/kg/day. Es va injectar intraperitoneal 150µl/animal durant 2 setmanes 5 dies/setmana, una hora abans d'injectar el Vorinostat.

6. HISTOLOGIA I TINCIONS D'IMMUNOLOGIA

6.1 Histologia bàsica

Els òrgans i tumors dels ratolins s'extreuen del animal i immediatament es fixen amb paraformaldehid al 4% en PBS (pH7-7,4) durant 2 hores a 4°C. Posteriorment, depenent de la tècnica histològica que volem emprar, es poden realitzar dos protocols diferents. Per fer protocols d'Immunohistoquímica, els teixits s'inclouen en parafina i posteriorment es fan seccions de 5µm amb un micròtom per tal de fer tincions d'Hematoxilina-Eosina (H-E) a fi d'estudiar la histologia de cada teixit o tincions d'antígens específics per l'anàlisi de marcadors proteics.

6.2 Immunohistoquímica

Abans de començar el procés, els talls de 5µm de parafina es posen a assecar a una estufa de 65°C durant 1h, després es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es submergeixen els portaobjectes en un *buffer* que conté 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durant 20minuts, utilitzant un aparell de pretractament PTLINK (DAKO), per tal de recuperar els antígens emmascarats durant la preparació dels teixits per a la tinció (*epitope retrieval*). Abans de la tinció, els talls de parafina s'incuben amb 0.3% de H₂O₂ per bloquejar la peroxidasa endògena i disminuir el fons (*Background*) quan utilitzem el cromogen. Després es fan tres rentats amb PBS i

ja podem aplicar l'anticòs primari (Taula 17) durant 20-30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment a la incubació es fan tres rentats amb PBS i s'aplica l'anticòs secundari (Taula 18). Si s'utilitza directament l'anticòs secundari unit a la peroxidasa (HRP) s'incuba durant 30 minuts, en canvi si s'utilitza un sistema d'amplificació de la senyal, s'incuba primer l'anticòs unit a biotina durant 30 minuts, després es fan tres rentats amb PBS i s'incuba el teixit amb Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durant 15 minuts, tot a temperatura ambient. Finalment per tal de visualitzar la reacció s'aplica el cromogen de diaminobenzidina (DAB) i es contra tenyeix amb Hematoxilina per marcar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

| ANTIGEN | DILUCIÓ | PROVEÏDOR | Nº CATÀLEG |
|-----------|---------|-------------|------------|
| Acetyl H4 | 1/100 | Cell Signal | 2591 |
| VDR | 1/100 | ABCAM | ab3508 |
| H2AX | 1/100 | Millipore | 16-193 |
| CYP2R1 | 1/300 | ABCAM | ab137634 |
| CYP27A1 | 1/500 | ABCAM | ab64889 |
| CYP24A1 | 1/100 | SIGMA | HPA022261 |
| KI67 | RTU* | DAKO | IR626 |

Taula 17: Anticossos primaris utilitzats en assajos d'immunohistoquímica. *(RTU=Ready To Use)

| ANTIGEN | DILUCIÓ | PROVEÏDOR | Nº CATÀLEG |
|---------------------|---------|-----------|-------------|
| Sheep IgG-HRP | 1/200 | SIGMA | A3415 |
| Rabbit anti-biotina | 1/200 | Jackson | 111-065-144 |
| Rat anti-biotina | 1/200 | Jackson | 712-065-150 |
| Streptavidina-HRP | 1/400 | Jackson | 016-030-084 |

Taula 18: Anticossos secundaris utilitzats en assajos d'Immunohistoquímica.



Resultats

RESULTATS

1. L'INHIBIDOR DE LES HISTONES DEACETILASES, VORINOSTAT, REDUEIX EL CREIXEMENT DE LES CÈL·LULES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI *IN VITRO* I *IN VIVO*.

Inicialment, per tal d'estudiar els efectes del Vorinostat en les línies de CE (IK, RL.95 i HEC-1A) vam avaluar els canvis produïts en la viabilitat cel·lular, proliferació i el creixement clonogènic. Com ja s'ha comentat a l'apartat d'introducció, el Vorinostat és un inhibidor de les histones deacetilases, cosa que resulta en una hiperacetilació de proteïnes (histones o no-histones). Per tal d'assegurar-nos de que el Vorinostat era efectiu, vam analitzar els nivells de la histona H4 mitjançant immunofluorescència i Western Blot. Com s'observa a la figura 34.A, a mesura que la concentració del fàrmac augmenta s'observa més acumulació en els nivells d'acetilació de la histona H4, fet que suggereix una bona inhibició de les HDACs per part del Vorinostat.

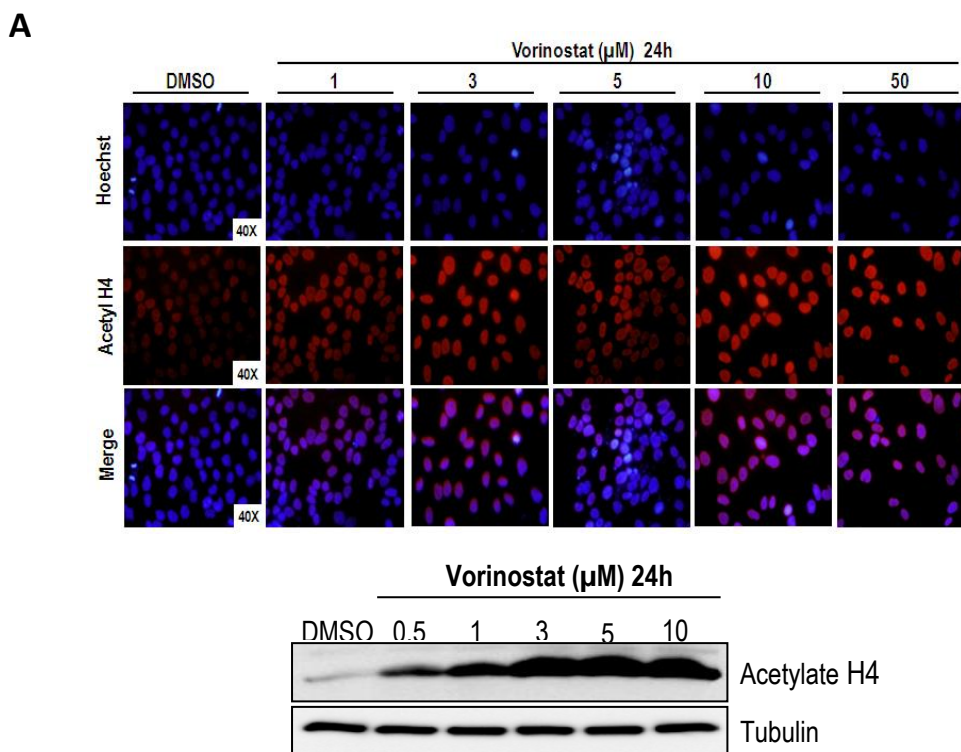


Figura 34.A. Detecció per immunofluorescència (panell superior) i per Western Blot (panell inferior) de la histona H4 acetilada després del tractament amb Vorinostat.

A continuació vam analitzar els efectes del tractament en la viabilitat cel·lular, mitjançant un assaig MTT, en la capacitat clonogènica de les cèl·lules i en la proliferació cel·lular mitjançant incorporació de BrdU. El Vorinostat va causar una disminució de la viabilitat cel·lular en les tres línies de CE analitzades, que depenia de la dosi i del temps. En la figura 34.B s'observa que la viabilitat de les tres línies de CE, a les 24 hores de tractament amb 3-5 μ M, era d'un 50%, i queia fins un 20-30% a les 48 hores, en el mateix punt. Els valors eren significatius a partir 1-3 μ M ($p < 0.05$) (depenent de la línia cel·lular) tan a les 24 com a les 48 hores de tractament.

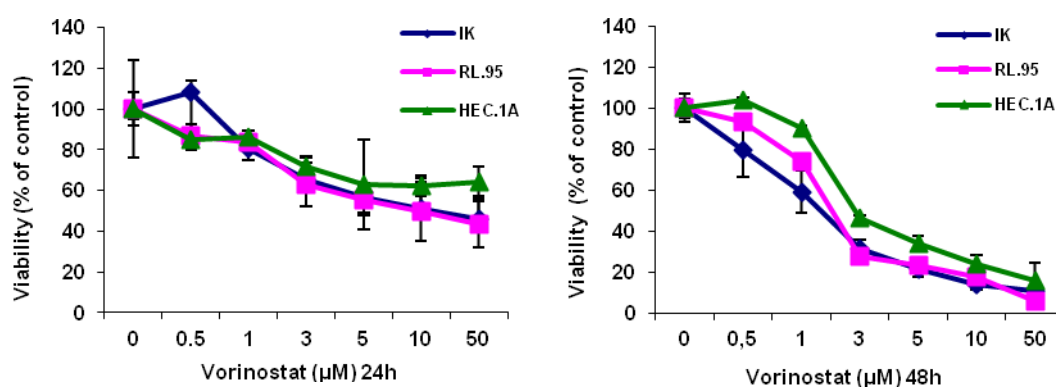
B

Figura 34.B. Determinació de la viabilitat cel·lular de les línies de carcinoma d'endometri (IK, RL.95 i HEC-1A) un cop tractades a dosis creixents de Vorinostat (0.5-50 μ M) durant 24 i 48 hores.

De la mateixa manera, el tractament amb Vorinostat redueix la capacitat clonogènica de les cèl·lules en les tres línies de CE (Figura 34.C). El gràfic mostra una disminució semblant en el nombre de colònies, tot i que la línia RL.95 sembla ser més sensible al tractament amb Vorinostat, la disminució és significativa a dosis a partir de 1 μ M ($p < 0.05$).

La capacitat de creixement cel·lular va ser analitzada mitjançant un assaig de incorporació de BrdU. En la figura 34.D s'observa que el tractament amb Vorinostat promou una disminució significativa de la proliferació, dosi-depenent a partir de 1 μ M ($p < 0.05$). Vist els resultats anteriors, vam avaluar els nivells de la ciclina D1 i vam

veure que, el Vorinostat va causar una disminució progressiva d'aquesta proteïna (Figura 34.E).

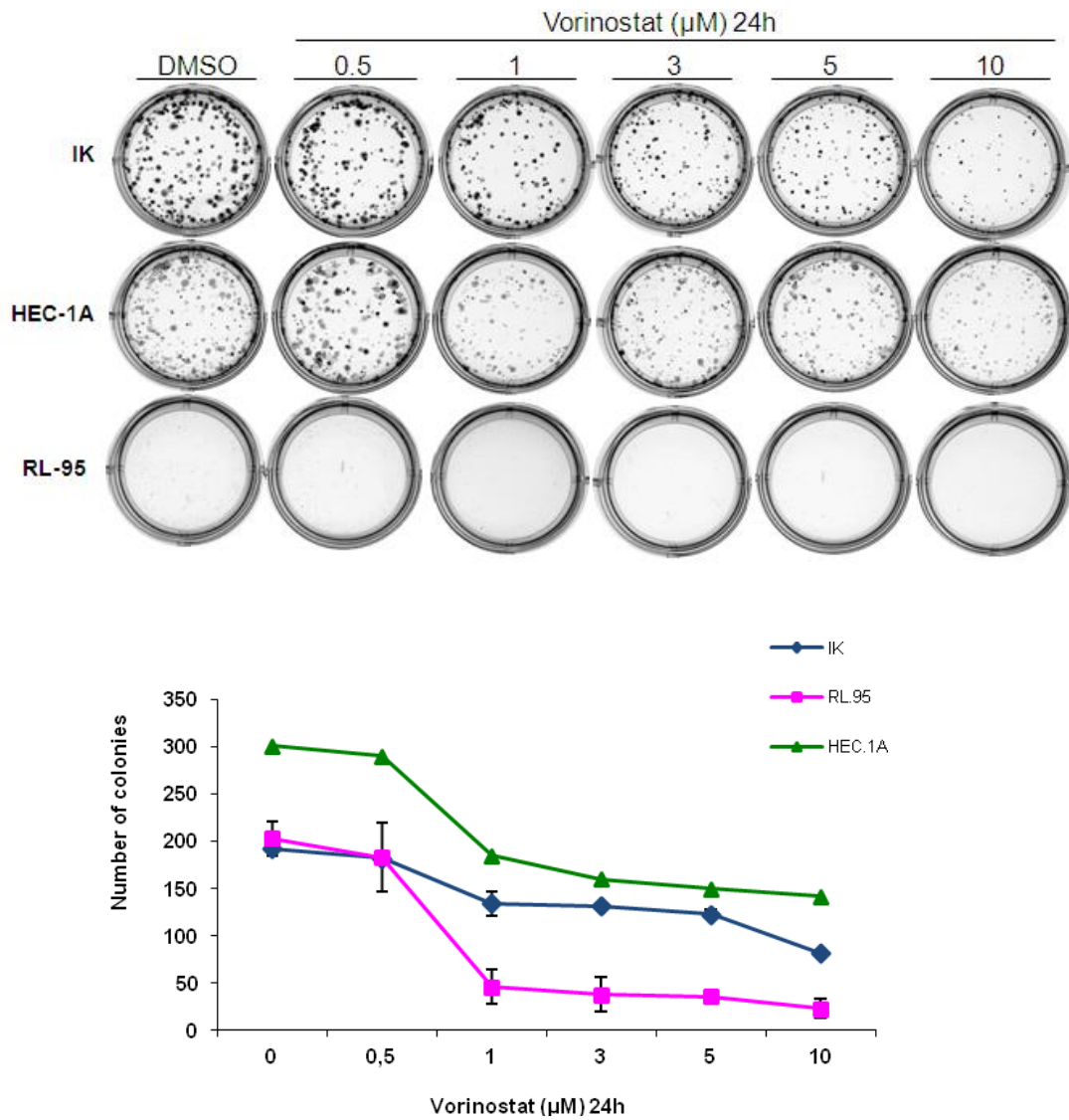
C

Figura 34.C. Assaig clonogènic de les línies de carcinoma d'endometri tractades a dosis creixents de Vorinostat (0.5-10µM) durant 24 hores.

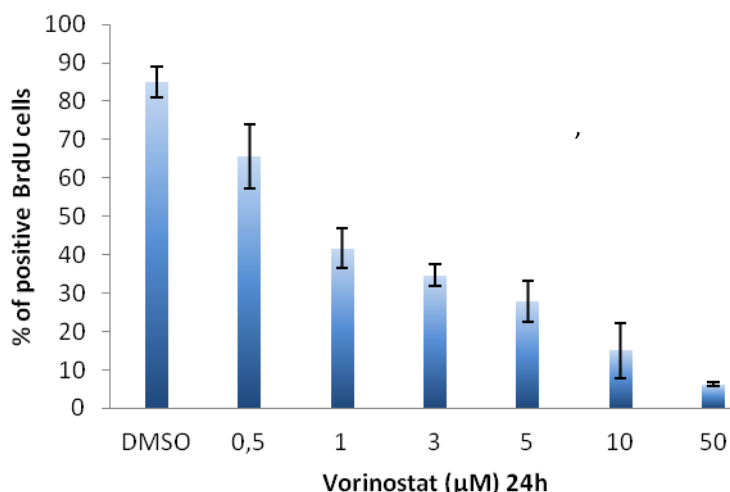
D

Figura 34.D. Assaig d'incorporació de BrdU en les IK tractades a dosis creixents de Vorinostat (0.5-50μM) durant 24 hores.

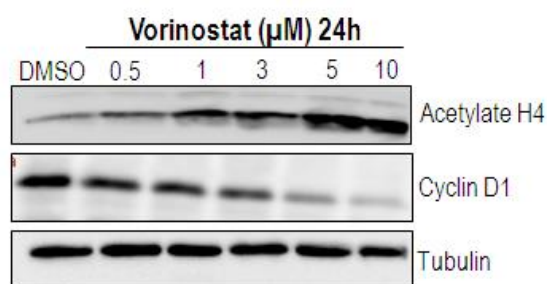
E

Figura 34.E. Western Blot mostrant la reducció en els nivells de Ciclina D1 de les IK tractades a dosis creixents de Vorinostat (0.5-10μM) durant 24

Donat que les cèl·lules de CE són capaces de desenvolupar tumors subcutanis quan s'injecten sota la pell de ratolins immunodeprimits (*SCID mice*), vam voler estudiar l'activitat antitumoral del Vorinostat *in vivo*. Així mateix, vàrem injectar subcutàniament un nombre concret de cèl·lules HEC-1A ($1 \cdot 10^6$) a l'esquena dreta de ratolins SCID. Després vam fer mesures setmanals (fins el dia 38 després d'haver injectat les cèl·lules) per analitzar el creixement tumoral dels xenografts generats. En aquest punt, es va injectar el Vorinostat intraperitoneal a una dosi de 50mg/kg 5 dies/setmana, durant dues setmanes. Com es mostra a la Figura 34.F, al finalitzar l'experiment, observem un volum tumoral menor quan el ratolí havia estat tractat amb Vorinostat, si el comparem amb els tumors desenvolupats de ratolí no tractat. Aquest fet indica que el Vorinostat produeix una disminució del volum tumoral dels xenografts de CE *in vivo*.

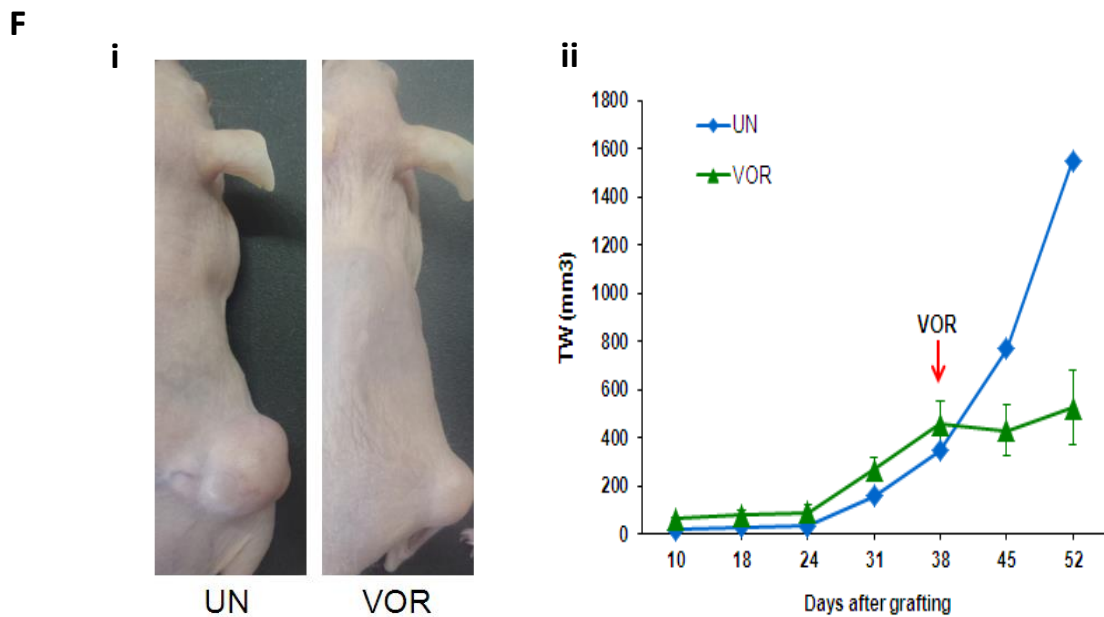


Figura 34.F. El tractament amb Vorinostat disminueix significativament el volum de creixement dels xenografts. i) Ratolins SCID amb xenografts de HEC-1A, control (UN) i tractat amb Vorinostat. ii) Gràfic mostrant el creixement dels xenografts, a partir del dia 38 es van tractar amb Vorinostat (fletxa vermella).

2. EL TRACTAMENT AMB VORINOSTAT ACTIVA TANT LA VIA EXTRÍNSECA COM INTRÍNSECA DE L'APOPTOSI, INDUINT MORT APOPTÒTICA A LES CÈL·LULES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Un cop demostrat que el Vorinostat disminuïa la viabilitat cel·lular, vam voler investigar si també era capaç d'induir mort apoptòtica en les línies de CE. En primer lloc, per detectar mort apoptòtica, vam realitzar una tinció amb *Hoechst* de les línies de CE: IK, RL.95 i HEC-1A tractades amb dosis creixents de Vorinostat. Vam observar que el Vorinostat causava un augment en el nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica de forma dosi depenent (Figura 35.A). A 3 μ M les tres línies de CE ja mostraven valors estadísticament significatius ($p < 0.01$).

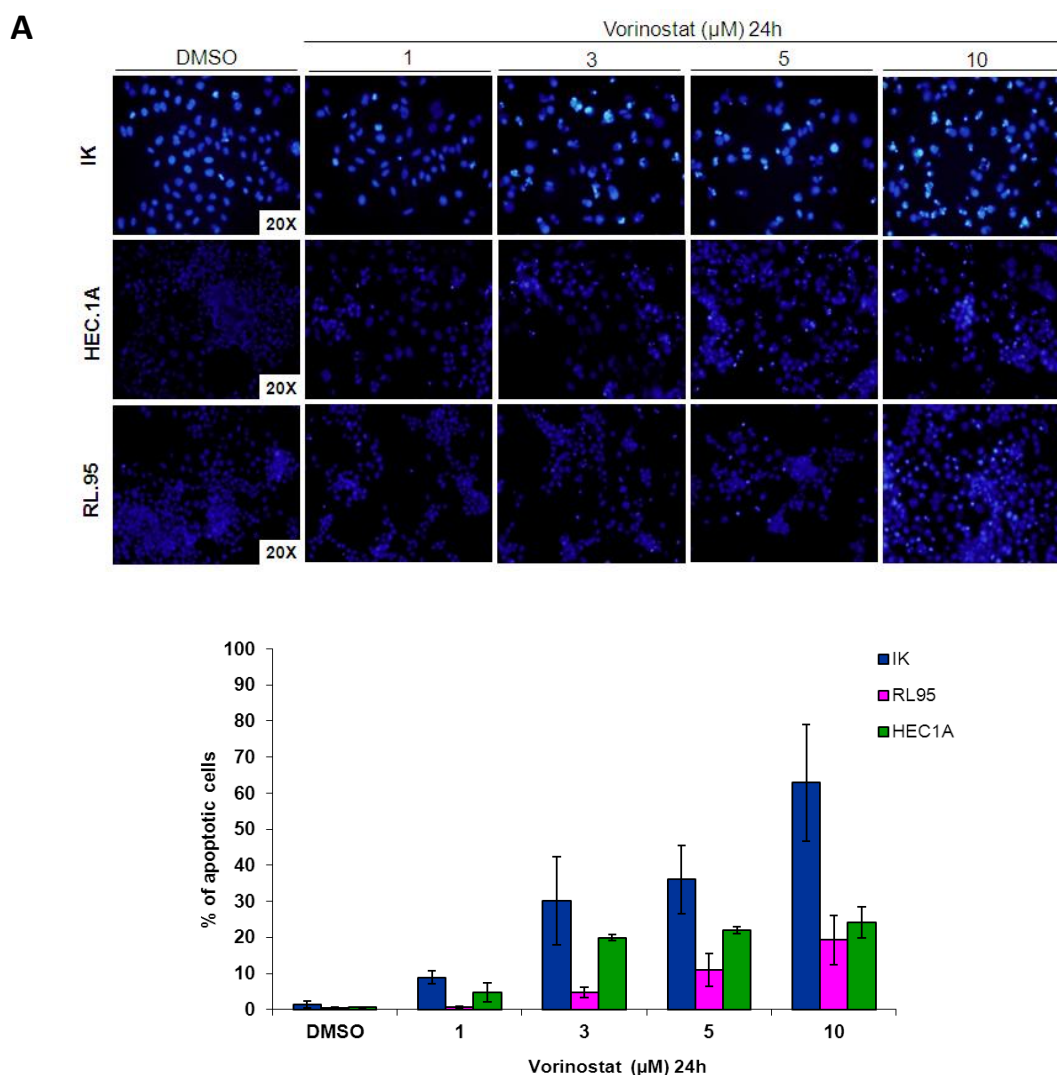


Figura 35.A. Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques després del tractament amb Vorinostat.

A continuació vam investigar el mecanisme molecular involucrat en la transducció de la mort apoptòtica. Per aquest propòsit, vam analitzar l'activació de les caspases iniciadores de la via extrínseca (caspasa-8) i de la via intrínseca (caspasa-9) mitjançant Western Blot. El tractament de les IK amb Vorinostat 5μM, va resultar en el processament de les caspases 8 i 9 (Figura 35.B), suggerint que tant la via extrínseca com intrínseca de l'apoptosi s'activaven amb el tractament de Vorinostat.

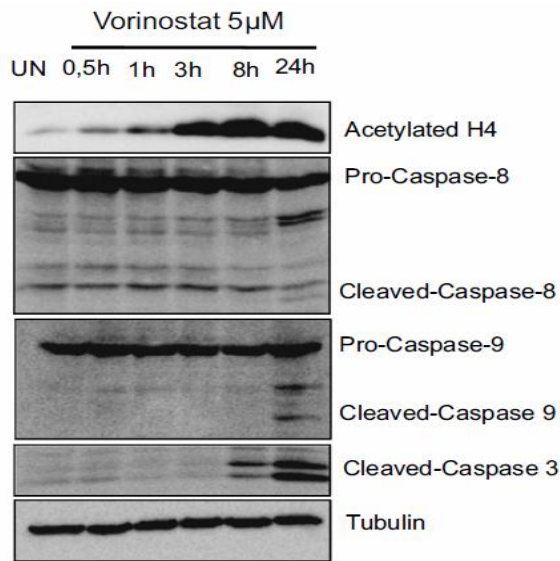
B

Figura 35.B. Western Blot mostrant el processament de les caspases iniciadores i efectores en les IK, després de ser tractades amb Vorinostat.

L'activació de la via extrínseca i intrínseca de l'apoptosi també la vàrem observar en les línies de CE, HEC-1A i RL.95 (Figura 35.C). Les dues varen ser tractades a dosis creixents de Vorinostat (0.5-10 μ M) durant 24h.

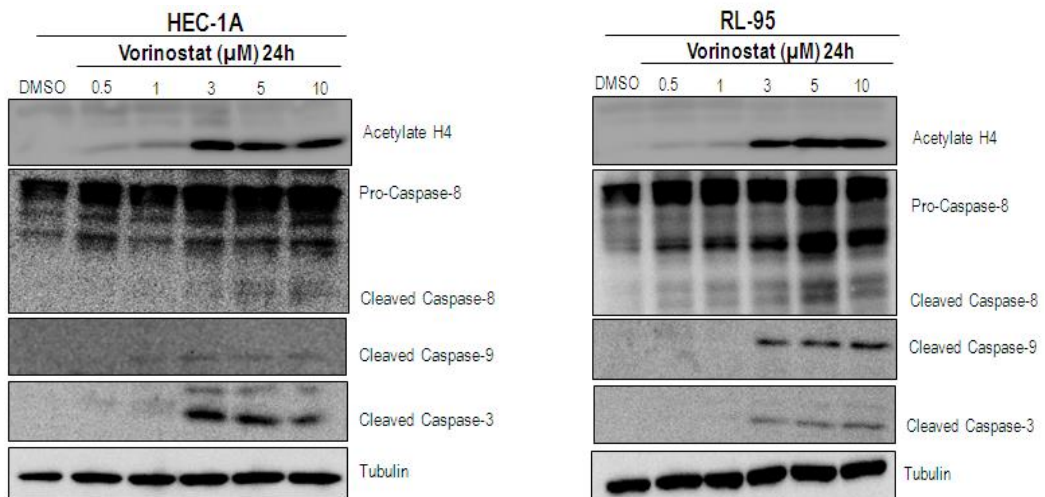
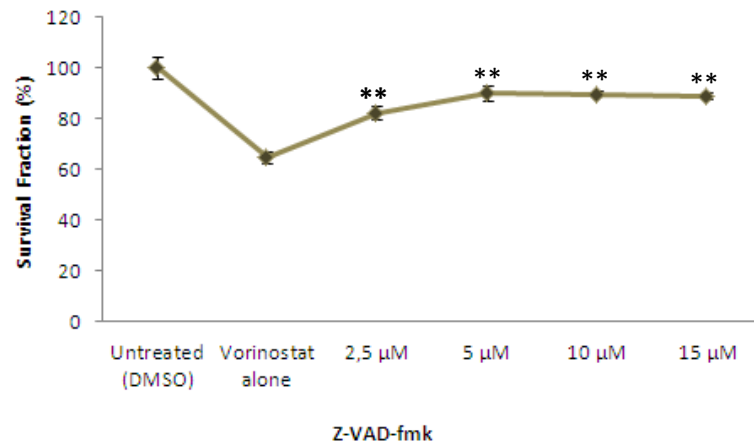
C

Figura 35.C. Western Blot mostrant el processament de les caspases iniciadores i efectores en les HEC-1A i les RL.95, després de ser tractades amb Vorinostat.

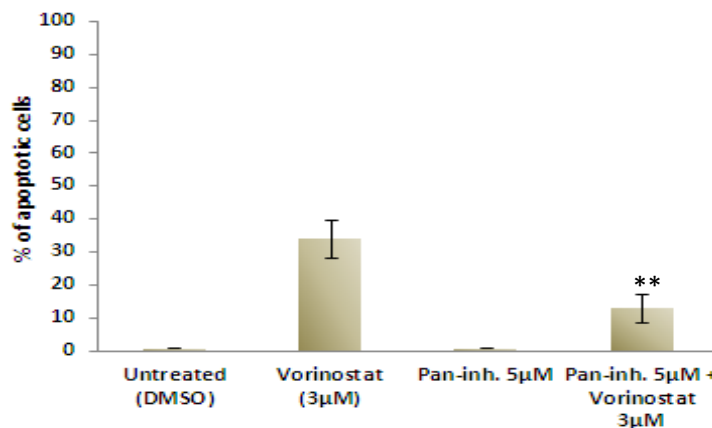
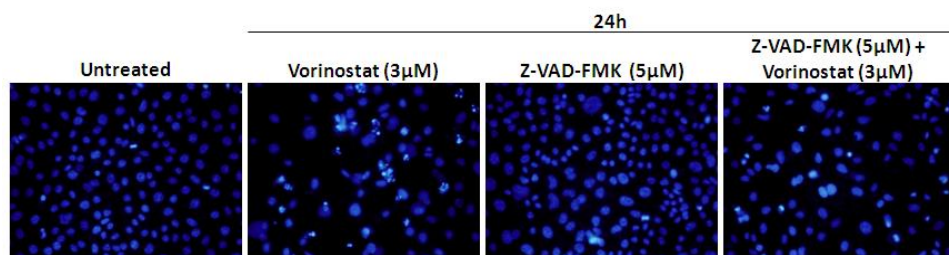
3. LA MORT APOPTÒTICA INDUÏDA PEL VORINOSTAT ES DEPENDENT DE LES CASPASES.

A continuació vam investigar la importància de l'activació de les caspases en la inducció d'apoptosi pel tractament amb Vorinostat, utilitzant un inhibidor de les caspases d'ampli espectre, z-VAD-fmk. Com s'observa a continuació, el tractament amb z-VAD-fmk rescata les cèl·lules, IK, de la mort cel·lular induïda per Vorinostat (Figura 36.A), disminueix el nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica (Figura 36.B) i augmenta significativament la capacitat clonogènica de les cèl·lules (Figura 36.C) en la línia de CE, IK. (** p <0.01)

A



B



C

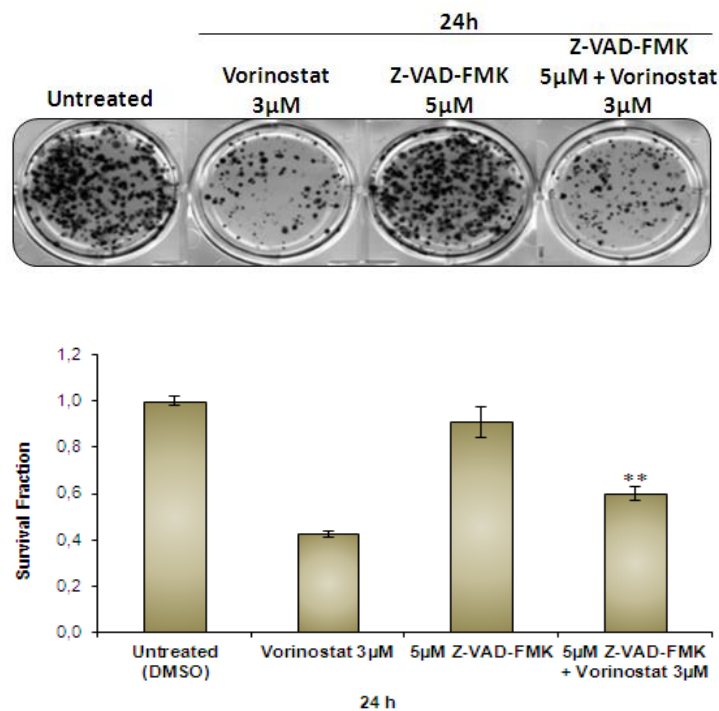


Figura 36. La inhibició del processament de les caspases rescata de la mort induïda pel Vorinostat. A) Assaig de viabilitat de les IK tractades amb Vorinostat i dosis creixents de z-VAD-fmk (2,5-15μM). B) Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques de les IK tractades amb Vorinostat i z-VAD-fmk (5μM). C) Assaig de clonogenicitat de les IK tractades amb Vorinostat i z-VAD-fmk (5μM).

Aquests resultats suggereixen que l'activació de les caspases és essencial en la inducció de mort apoptòtica pel tractament amb Vorinostat en les línies de CE.

4. LA PROTEÏNA FLIP NO ESTÀ INVOLUCRADA EN LA MORT INDUÏDA PEL TRACTAMENT AMB VORINOSTAT EN LES CÈL·LULES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Un cop demostrat que el tractament amb Vorinostat, induïa el processament de la caspasa-8, vam voler estudiar el paper que tenia la via extrínseca de l'apoptosi en la transducció d'aquesta mort cel·lular.

En treballs previs realitzats en el nostre laboratori vam demostrar que alts nivells de la proteïna Flip-L inhibien la mort apoptòtica induïda pels receptors de mort en les línies de CE^{15, 234-236}. Com s'ha explicat en la introducció, Flip-L competeix amb la caspasa-8 per unir-se a FADD en el complex DISC. Com havíem vist processament de la caspasa-8, la nostra pregunta era si el Vorinostat causava una disminució en els nivells de Flip, permetent l'activació de la caspasa-8. Els anàlisis de Western Blot van revelar que el tractament amb Vorinostat causava una disminució, de manera dosi-depenent, en els nivells de Flip-L en les línies de CE: IK, HEC-1A, AN3CA i RL.95 (Figura 37.A).

A

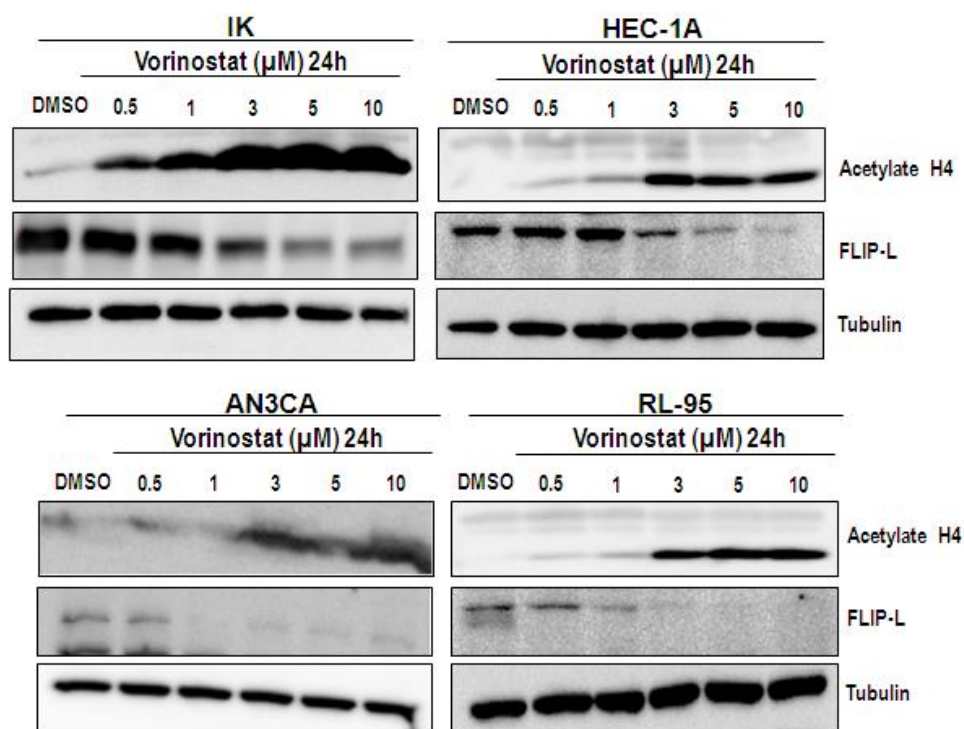


Figura 37.A. Western Blots mostrant la reducció en els nivells de Flip-L, en les línies de CE.

Aquesta reducció en els nivells de la proteïna Flip es correlacionava amb una reducció en els nivells relatius del mRNA de Flip, observat per RT-PCR en temps real utilitzant la sonda Flip/CFLAR i normalitzant els resultats amb l'expressió de GAPDH (Figura 37.B) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

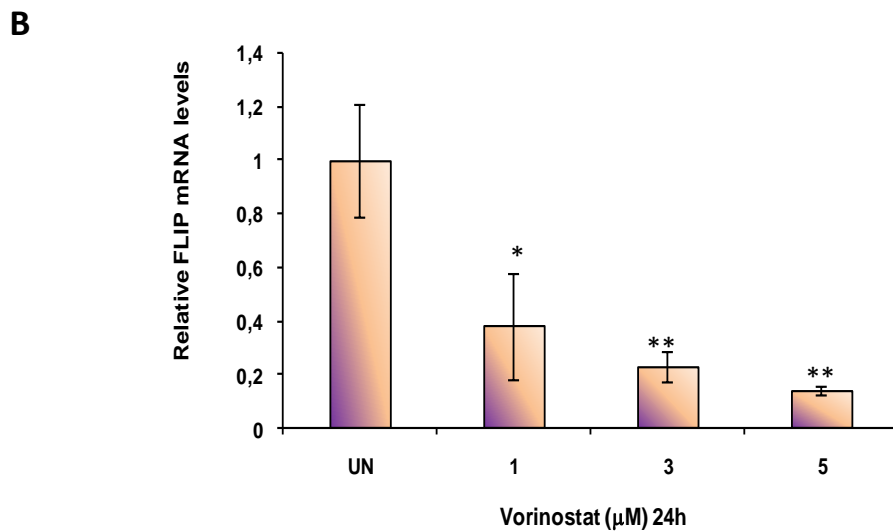


Figura 37.B. Quantificació relativa dels nivells de mRNA de Flip-L en les IK.

Entusiasmats amb aquests resultats, ens vam plantejar si aquesta important reducció en els nivells de Flip-L estava involucrada en els efectes antitumorals del Vorinostat. Per esbrinar això, vam infectar tres línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, amb lentivirus sobreexpressors de la proteïna Flip-L (pEIGW-FLIP). A més, en cada cas, com a control vàrem infectar les línies de CE esmentades, amb lentivirus que contenien el vector buit (pEIGW). Per últim, vam realitzar una quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques després del tractament amb Vorinostat (Figura 37.C)(**p 0.01).

C

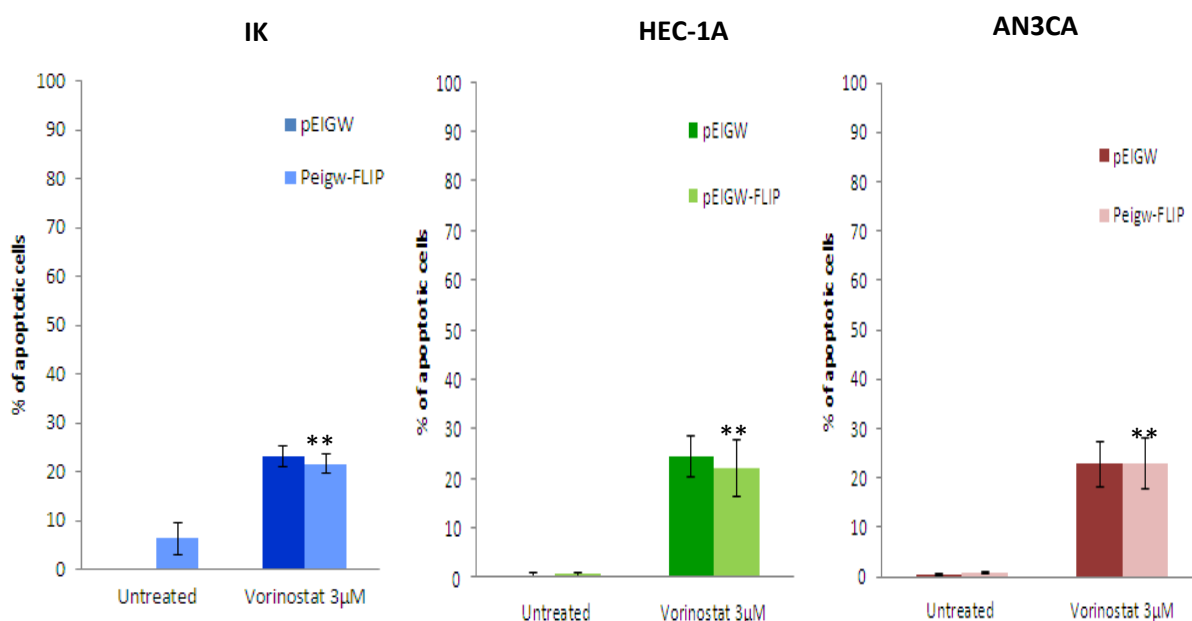


Figura 37.C. Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques, un cop infectades amb lentivirus sobreexpressant la proteïna Flip-L, les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, i tractades amb Vorinostat.

Sorprenentment, la sobreexpressió de Flip-L no inhibia l'activació de la caspasa-3 en les línies de CE (Figura 37.D). En la Figura 37.D, s'observa la correcta sobreexpressió de Flip, en la detecció de la proteïna Anti-Flag (unida a Flip-L) mitjançant Western Blot.

D

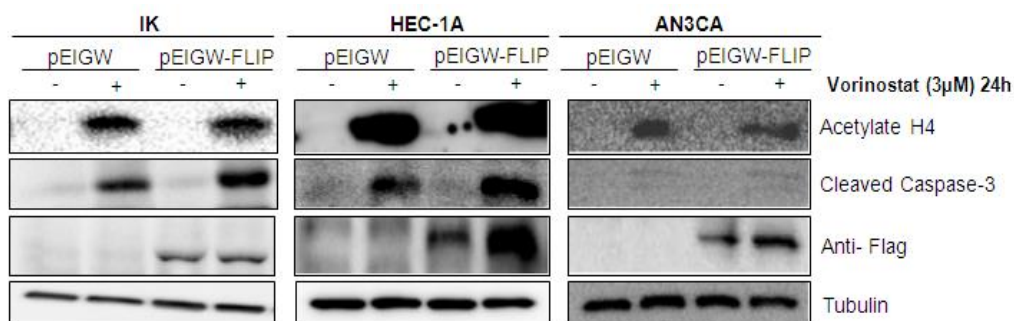


Figura 37.D. Western Blot de les línies de CE infectades amb lentivirus sobreexpressant la proteïna Flip-L i tractades amb Vorinostat, es mostra la correcta infecció amb els lentivirus (detecció de Flag) i el processament de la caspasa-3.

A més a més, la sobreexpressió de Flip-L no va ser capaç de recuperar la capacitat clonogènica de les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, després del tractament amb Vorinostat (Figura 37.E). En resum, aquests resultats, ens suggereixen que la reducció de Flip-L no està relacionada amb l'activitat antitumoral del Vorinostat (** $p < 0.01$).

E

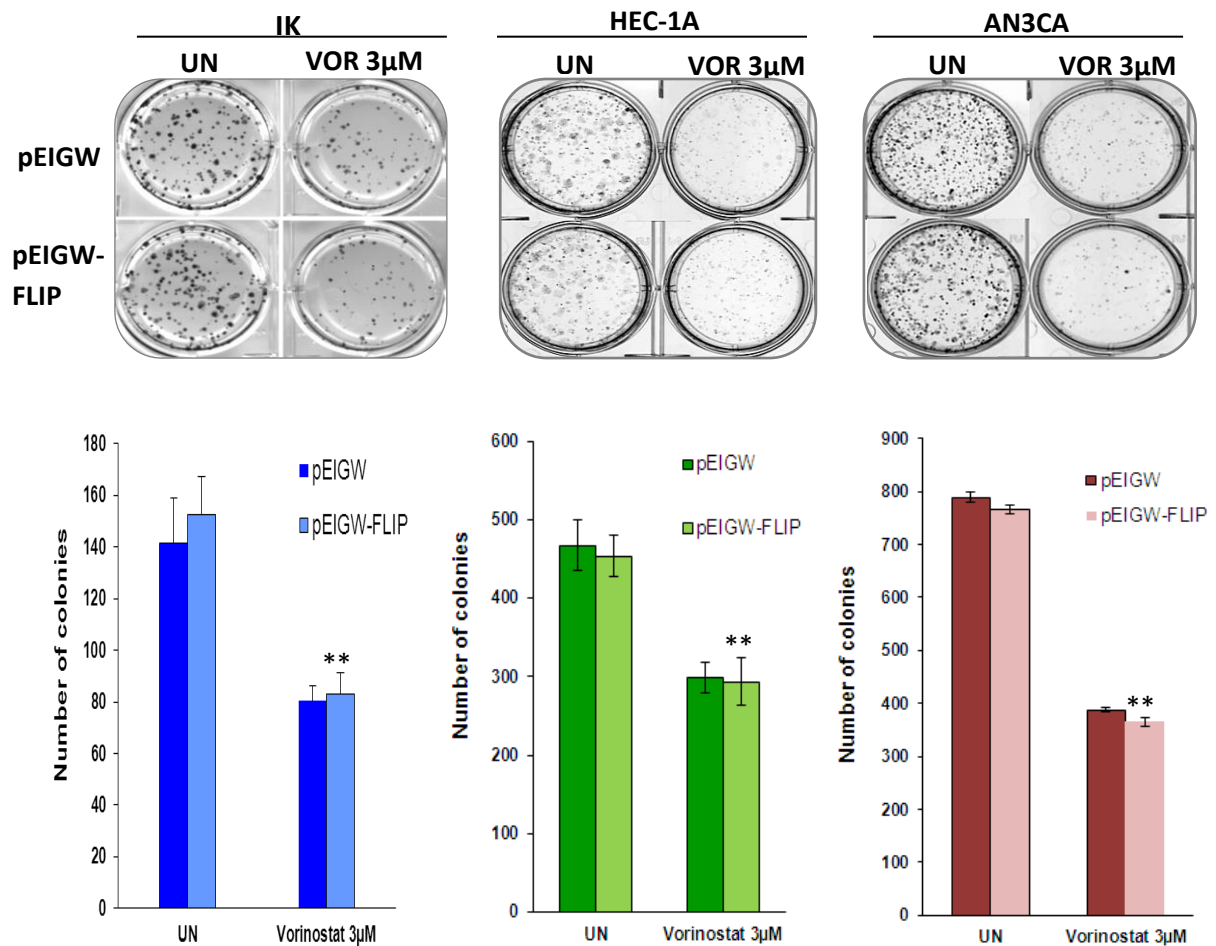


Figura 37.E. Assaig de formació de colònies de les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, un cop infectades amb el lentivirus sobreexpressor de la proteïna FLIP-L i tractades amb Vorinostat.

5. LA BAIXADA D'EXPRESSIÓ DE LA CASPASA-8 REDUEIX EL CREIXEMENT TUMORAL I AUGMENTA L'ACTIVITAT ANTINEOPLÀSICA DEL VORINOSTAT.

Com s'ha mencionat en l'apartat anterior, el processament de la caspasa-8, indicava l'activació de la via extrínseca de l'apoptosi un cop tractades les cèl·lules de CE amb Vorinostat. Estudis previs del nostre laboratori havien demostrat que la

inhibició de la caspasa-8 bloquejava la mort apoptòtica induïda per TRAIL^{235, 236}. Per tant, vam decidir estudiar si la inhibició dels nivells de la caspasa-8 resultava en un bloqueig de la mort apoptòtica induïda pel tractament amb Vorinostat. Per mitjà d'infecció amb lentivirus amb shRNA de caspasa-8, vam inhibir l'expressió de la caspasa-8 en les línies de CE: IK i HEC-1A i vam analitzar la presència de cèl·lules apoptòtiques després tractament amb Vorinostat. Sorprenentment, la reducció en els nivells de la caspasa-8 va augmentar de manera significativa la mort apoptòtica de les cèl·lules de CE després del tractament amb Vorinostat, reflectit amb la forta activació de la caspasa-3 en les línies IK i HEC-1A (Figura 38.A).

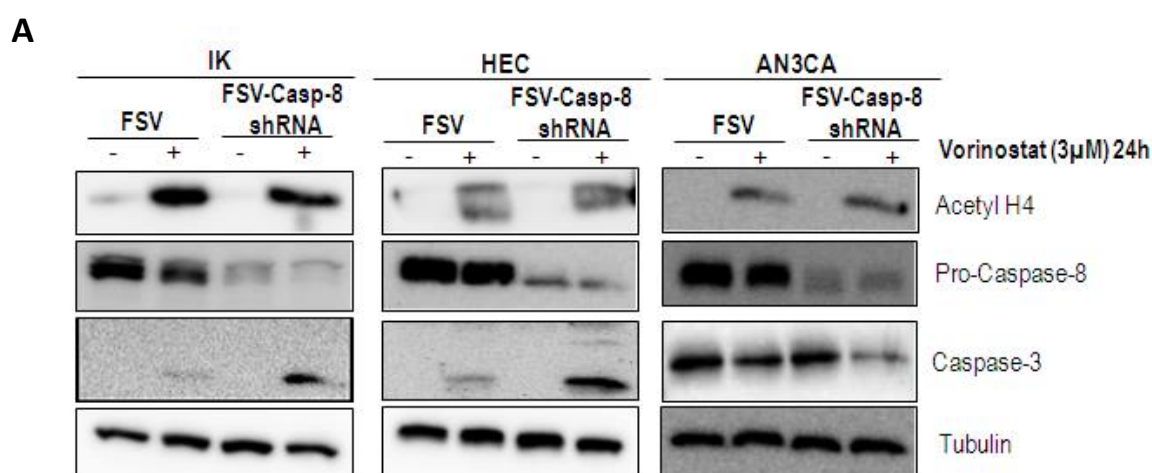


Figura 38.A. Western Blot mostrant la correcta inhibició de la caspasa-8, disminució dels seus nivells, i del processament de la caspasa-3, en les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, un cop infectades amb el lentivirus inhibidor de l'expressió de la caspasa-8 i tractades amb Vorinostat.

La capacitat clonogènica de les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA també va ser avaluada un cop els nivells de la caspasa-8 havien estat reduïts. El tractament amb Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 van resultar en gairebé la pèrdua completa de la capacitat clonogènica de les cèl·lules de CE (Figura 38.B). Val a dir, però, que la sola inhibició de la caspasa-8 ja mostrava una important reducció en la capacitat clonogènica en les línies de CE, sense la presència del Vorinostat. Aquests resultats ens van suggerir un important paper de la caspasa-8 en la regulació del creixement de les cèl·lules de CE independentment dels efectes del Vorinostat (** p<0.01).

B

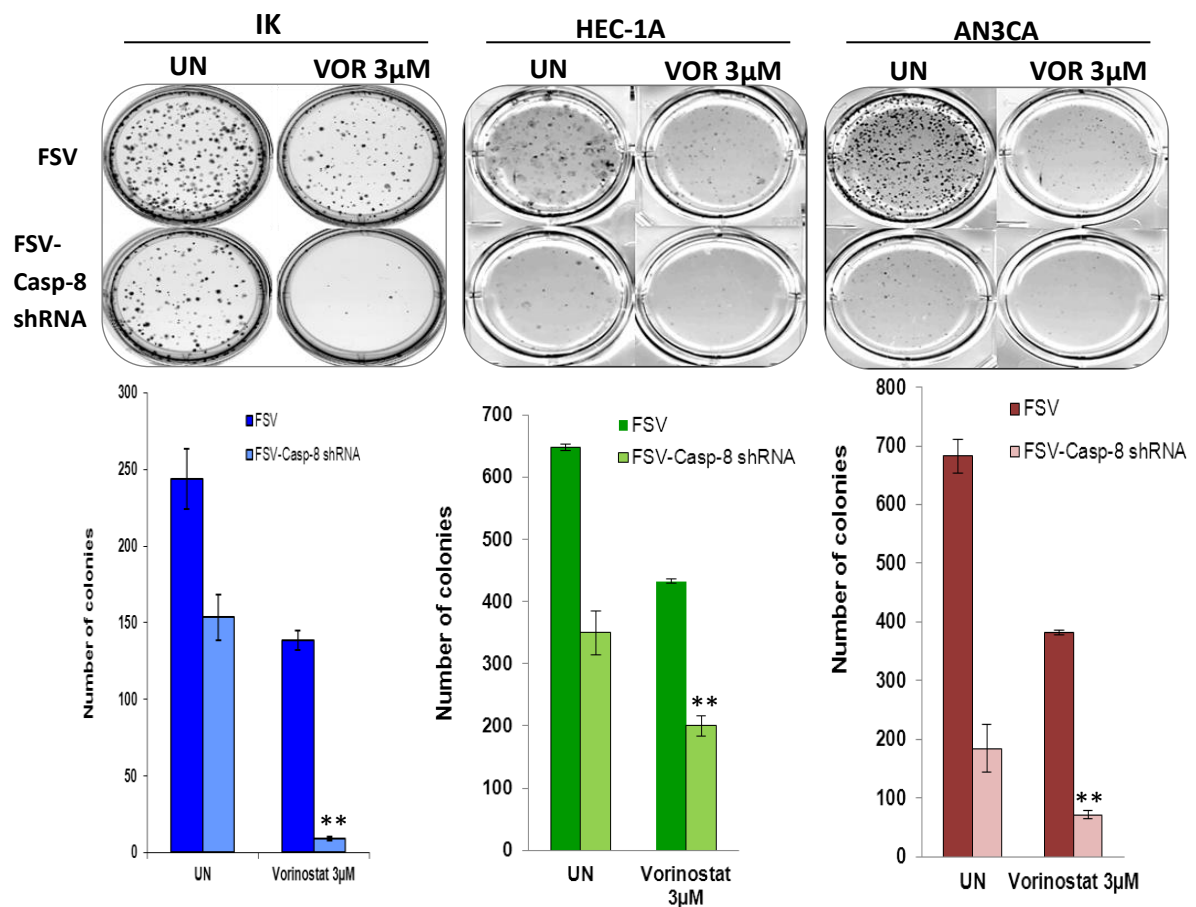


Figura 38.B. Assaig de formació de colònies de les línies de CE: IK, HEC-1A i AN3CA, un cop infectades amb el lentivirus inhibidor de l'expressió de la caspasa-8 i tractades amb Vorinostat.

Finalment, per investigar si l'apoptosi induïda pel Vorinostat estava causada per l'expressió de la caspasa-8 o per l'activitat proteolítica d'aquesta, les IK van ser tractades amb Vorinostat a més del inhibidor de l'activitat de la caspasa-8, z-IETD-fmk (IETD). L'addició del IETD amb el Vorinostat va causar una disminució significativa en la viabilitat cel·lular (Figura 38.C), suggerint que l'activitat proteolítica de la caspasa-8, induïda pel tractament amb Vorinostat, té un paper anti-apoptòtic i protector (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

C

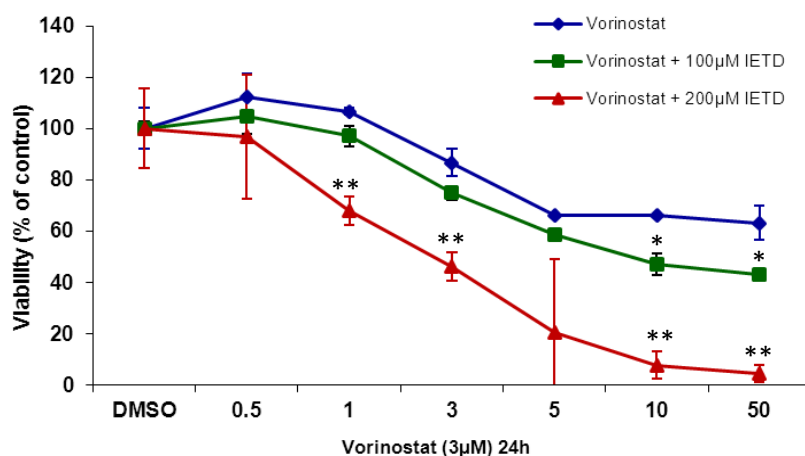


Figura 38.C. Assaig de viabilitat de les IK, pre-tractades durant dos hores amb l'inhibidor de la caspasa-8, z-IETD-fmk (100-200µM), i tractades amb vorinostat.

6. LA COMBINACIÓ DEL VORINOSTAT I LA BAIXADA D'EXPRESSIÓ DE LA CASPASA-8 SUPRIMEIX EL CREIXEMENT TUMORAL DE LES CÈL·LULES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI *IN VIVO*.

El resultat obtingut *in vitro*, ens van animar a estudiar els efectes de la inhibició de la caspasa-8 per si mateixa o en combinació amb Vorinostat en les línies de CE en un model *in vivo*, utilitzant el xenotransplantament de cèl·lules de CE en animals immunodeprimits (SCID). Per començar, vam infectar amb lentivirus les línies de CE, HEC-1A, unes amb el vector control (FSV) i altres amb el vector inhibidor de l'expressió de la caspasa-8 (FSV-Casp-8 shRNA). A continuació vam injectar subcutàniament un nombre concret de cèl·lules HEC-1A ($1 \cdot 10^6$) a l'esquena del ratolins SCID femella. A la part dreta hi vam injectar les HEC-1A expressant el vector control (FSV) i a l'esquerra les HEC-1A amb l'expressió de la caspasa-8 inhibida (FSV-Casp-8 shRNA). Després vam fer mesures cada setmana (fins el dia 38 després d'haver injectat les cèl·lules subcutàniament) per analitzar el creixement tumoral dels xenografts generats (Figura 39.A). En aquest punt, i per estudiar els efectes del Vorinostat en el creixement tumoral quan hi ha inhibició de la caspasa-8, es va injectar el Vorinostat intraperitoneal a una dosi de 50mg/kg 5

dies/setmana, durant dues setmanes. Es van fer mesures del volum del tumor setmanals, fins al sacrifici dels animals (Figura 39.B).

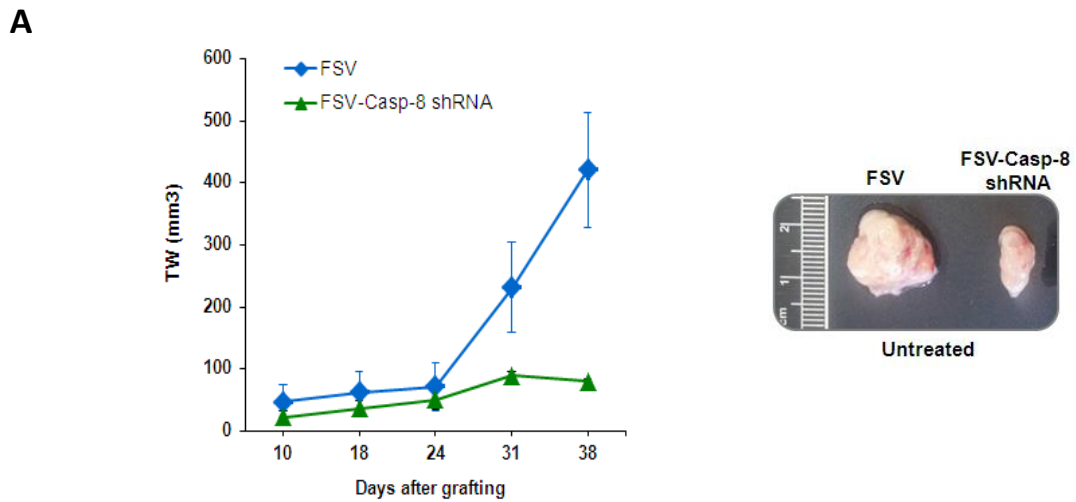


Figura 39.A. Corba de creixement de volum dels xenografts, i imatge de dos xenografts representatius de cada grup, control i amb la inhibició de la caspasa-8.

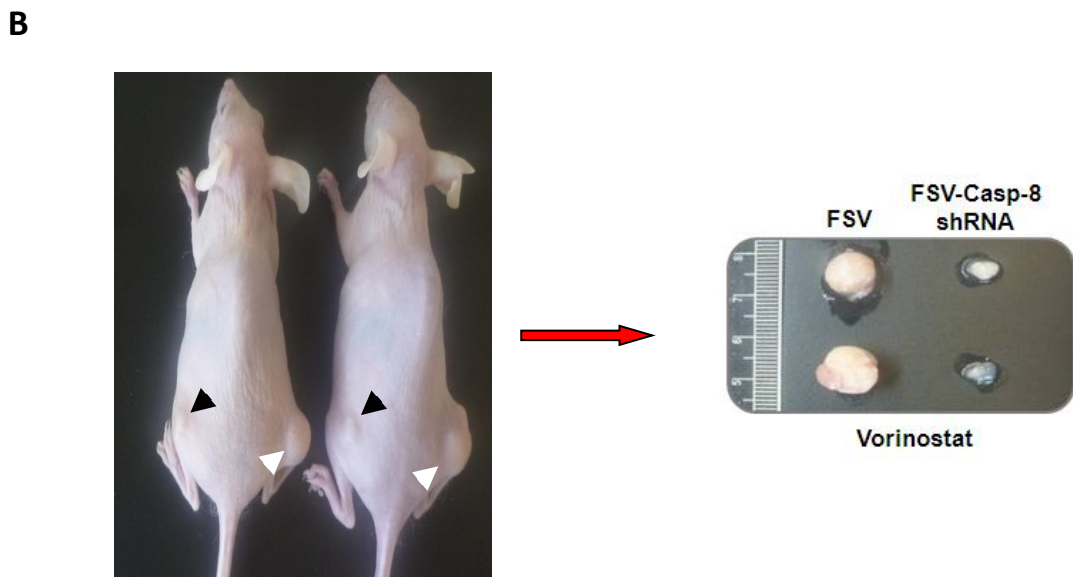


Figura 39.B. Imatge de dos ratolins SCID amb els xenografts indicats amb fletxa negra (inhibició caspasa-8) i blanca (control), a la dreta, els xenografts extrets.

Com es pot observar en el gràfic de la figura 39.C, la combinació del Vorinostat a més de la inhibició de l'expressió de la caspasa-8 produeix una reducció significativa en el volum del tumor. De fet, els tumors que presentaven la caspasa-8 inhibida, van mostrar des d'un principi un creixement tumoral molt per sota del control.

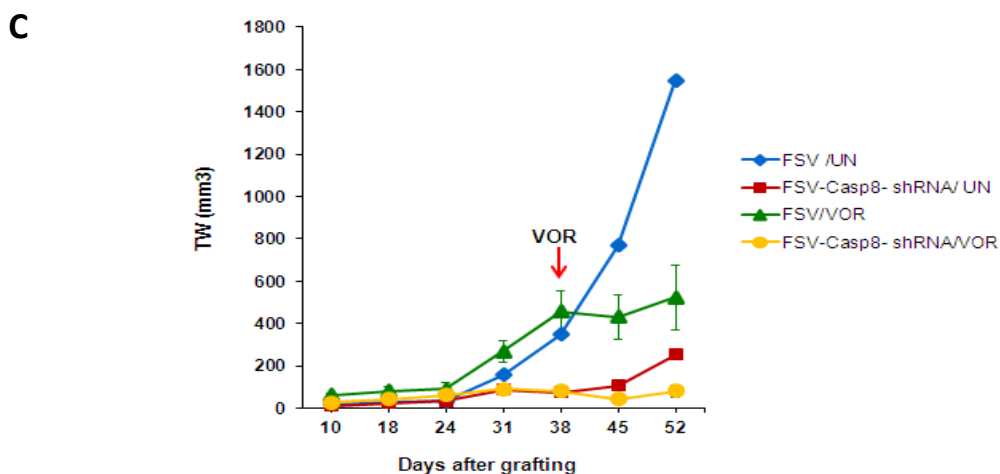


Figura 39.C. Gràfic representatiu del creixement tumoral dels xenografts. A partir del dia 38, es va començar el tractament amb Vorinostat.

Per descartar la possibilitat de que la caspasa-8 estès inhibint l'acetilació induïda pel tractament amb Vorinostat, un cop els tumors van ser extrets i processats, els nivells d'acetilació de la histona H4 van ser analitzats per immunohistoquímica. Els tumors (FSV i FSV-casp8 shRNA) procedents dels animals tractats amb Vorinostat van expressar nivells superiors de la histona H4 acetilada que els no tractats (Figura 39.D). En la Figura 39.D s'observa que la inhibició de la caspasa-8 no redueix l'acetilació induïda pel Vorinostat.

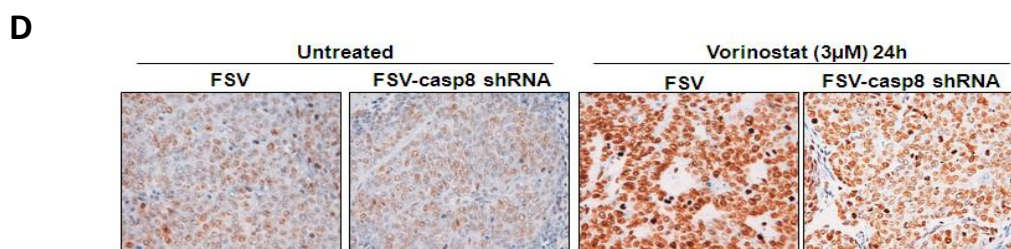


Figura 39.D. Immunohistoquímica que mostra l'acetilació de la histona H4 en els xenografts tractats amb Vorinostat.

7. LA SOBREEXPRESSION DE Bcl-XL SUPRIMEIX L'APOPTOSI INDUÏDA PER LA COMBINACIÓ DEL VORINOSTAT I LA BAIXADA DE L'EXPRESSION DE LA CASPASA-8.

Havent demostrat que el bloqueig de la caspasa-8 augmenta significativament la mort induïda pel Vorinostat; vam estudiar si aquest increment era causat per un

augment en l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi. Com hem observat en la figura 35.B, el tractament amb el Vorinostat processa la caspasa-9, suggerint l'activació de la via intrínseca. Vam analitzar la contribució de la via intrínseca en la inducció dels senyals apoptòtics després del tractament amb Vorinostat. Vam inhibir aquesta via de dos maneres: incrementant els nivells de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-XL i farmacològicament, inhibint la caspasa-9. En primer lloc i mitjançant una infecció lentiviral vam incorporar a les IK el lentivirus sobreexpressor de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-XL. La sobreexpressió de Bcl-XL va reduir dràsticament el nombre de cèl·lules apoptòtiques (Figura 40.A), depenent del temps d'exposició al tractament, acompanyada d'una inhibició en l'activació de la caspasa-3 (Figura 40.B).

A

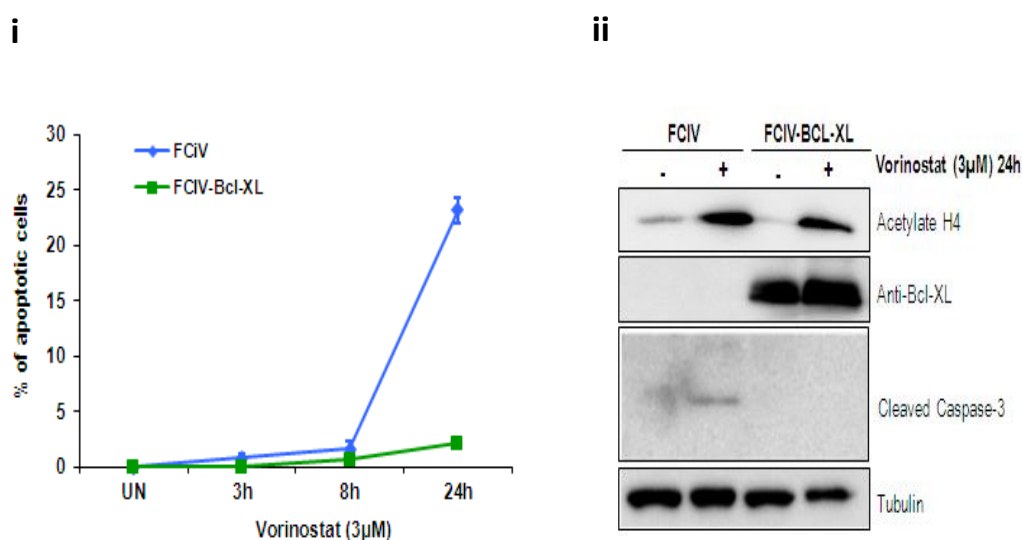


Figura 40.A. La sobreexpressió de Bcl-XL en les IK rescata la most induïda pel Vorinostat. i)

Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques i ii) Western Blot mostrant la correcta sobreexpressió de Bcl-XL, i la inhibició del processament de la caspasa-3.

Vist els resultats anteriors i com s'observa en la següent figura 40.B, era d'esperar que la sobreexpressió de Bcl-XL rescatés la capacitat clonogènica de les cèl·lules tractades amb Vorinostat.

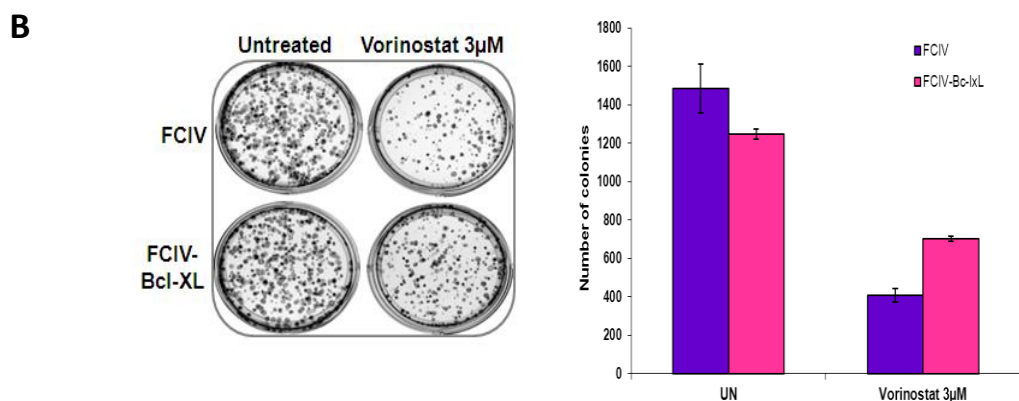


Figura 40.B. Assaig de formació de colònies de les IK un cop infectades amb el lentivirus sobreexpressor de Bcl-XL i tractades amb Vorinostat.

En segon lloc es van tractar les IK amb l'inhibidor de la caspasa-9, LEHD-fmk, com ja he comentat, per inhibir la via intrínseca. Vam realitzar un contacte de nuclis apoptòtics i de manera similar, el tractament de les IK amb Vorinostat i LEHD-fmk va inhibir la mort apoptòtica induïda pel Vorinostat (Figura 40.C) (**p<0.01).

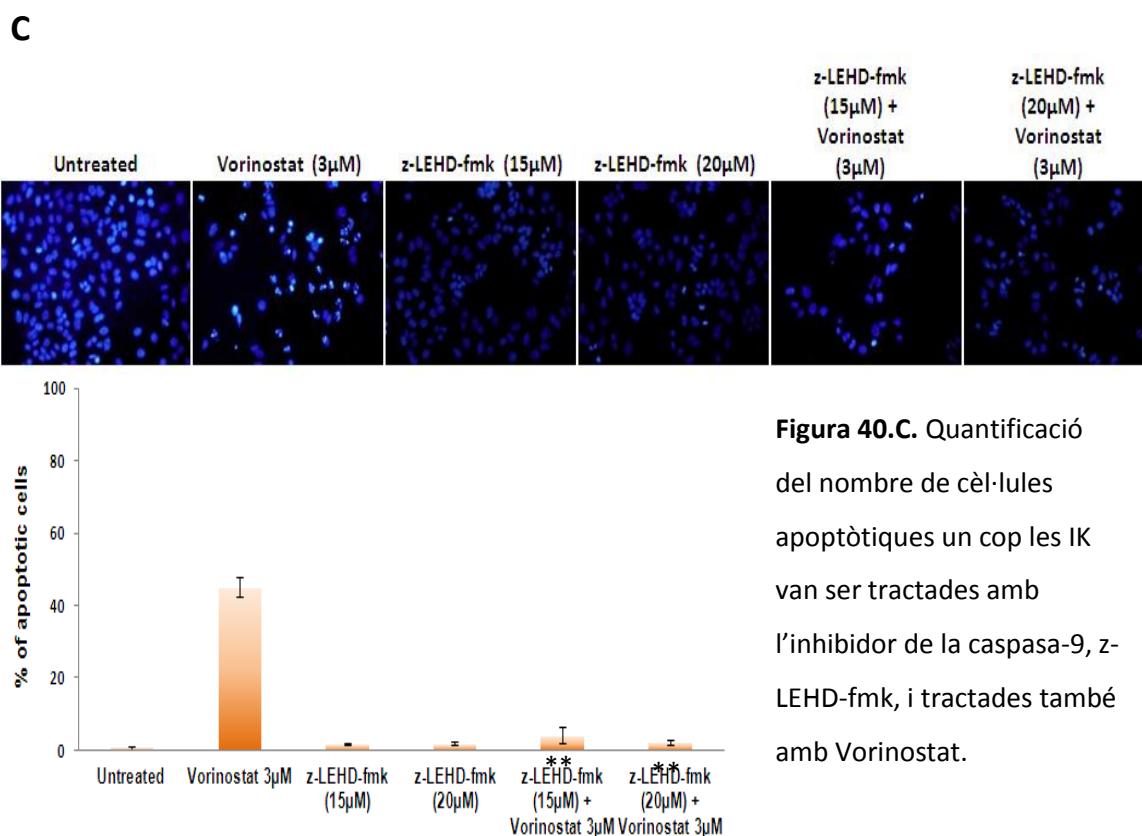


Figura 40.C. Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques un cop les IK van ser tractades amb l'inhibidor de la caspasa-9, z-LEHD-fmk, i tractades també amb Vorinostat.

Aquests resultats ens suggereixen que l'activació de la via mitocondrial, la via intrínseca de l'apoptosi, és necessària per a conduir els senyals apoptòtics del

tractament amb Vorinostat. Finalment, vam investigar el paper de la via mitocondrial en la transducció del senyal apoptòtic causat pel cotractament del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8. Per aquest propòsit, les IK van ser coinfectades amb lentivirus sobreexpressant Bcl-XL i lentivirus amb shRNA de la caspasa-8 (FSV-Casp8 shRNA). La sobreexpressió de Bcl-XL va reduir significativament el nombre de cèl·lules apoptòtiques causat pel cotractament del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 (Figura 40.D i), i conseqüentment l'activació de la caspasa-3 també va ser bloquejada (Figura 40.D ii).

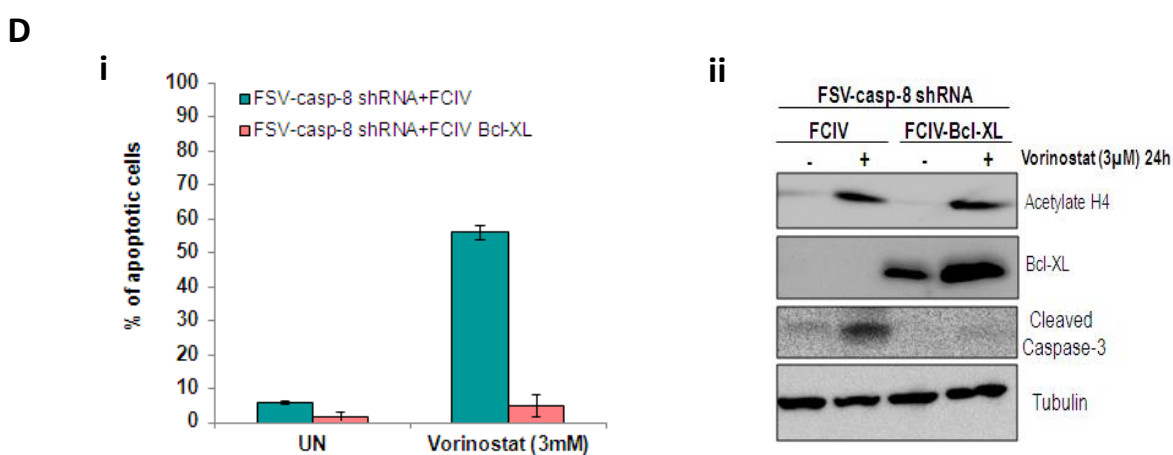


Figura 40.D. La sobreexpressió de Bcl-XL rescata la mort induïda pel tractament conjunt amb Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8. i) Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques.

ii) Western Blot mostrant el processament de la caspasa-3.

8. LA COMBINACIÓ DEL VORINOSTAT I LA BAIXADA DE L'EXPRESSIÓ DE LA CASPASA-8 ÉS INDEPENDENT DE L'ACTIVITAT NF- κ B.

Són diverses les funcions conegudes i acceptades de la caspasa-8, més enllà de la seva capacitat per induir mort apoptòtica^{237, 238}. Una d'aquestes funcions és la de promoure la supervivència cel·lular, en alguns casos, a través de l'activació de la via NF- κ B, fet que podria resultar, en principi, contradictori.

Com ja s'ha comentat en resultats previs, la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8, va reduir significativament la supervivència cel·lular, suggerint-nos que la caspasa-8 té funcions de pro-supervivència en les cèl·lules de CE. A continuació vam voler estudiar si aquesta capacitat de promoure supervivència era a través de

l'activació de la via NF- κ B. Per tant, vam realitzar un assaig d'activitat transcripcional d'NF- κ B, però no vam observar diferències en l'activitat NF- κ B; els nivells d'activitat transcripcional no variaven en cap de les condicions observades en el gràfic de la Figura 41.A. Seguit vam realitzar un assaig de formació de colònies de les IK infectades amb lentivirus sobreexpresant p65, subunitat d'NF- κ B, inhibint caspasa-8 i tractades amb Vorinostat, però tampoc es va veure restablerta la capacitat clonogènica (Figura 41.B).

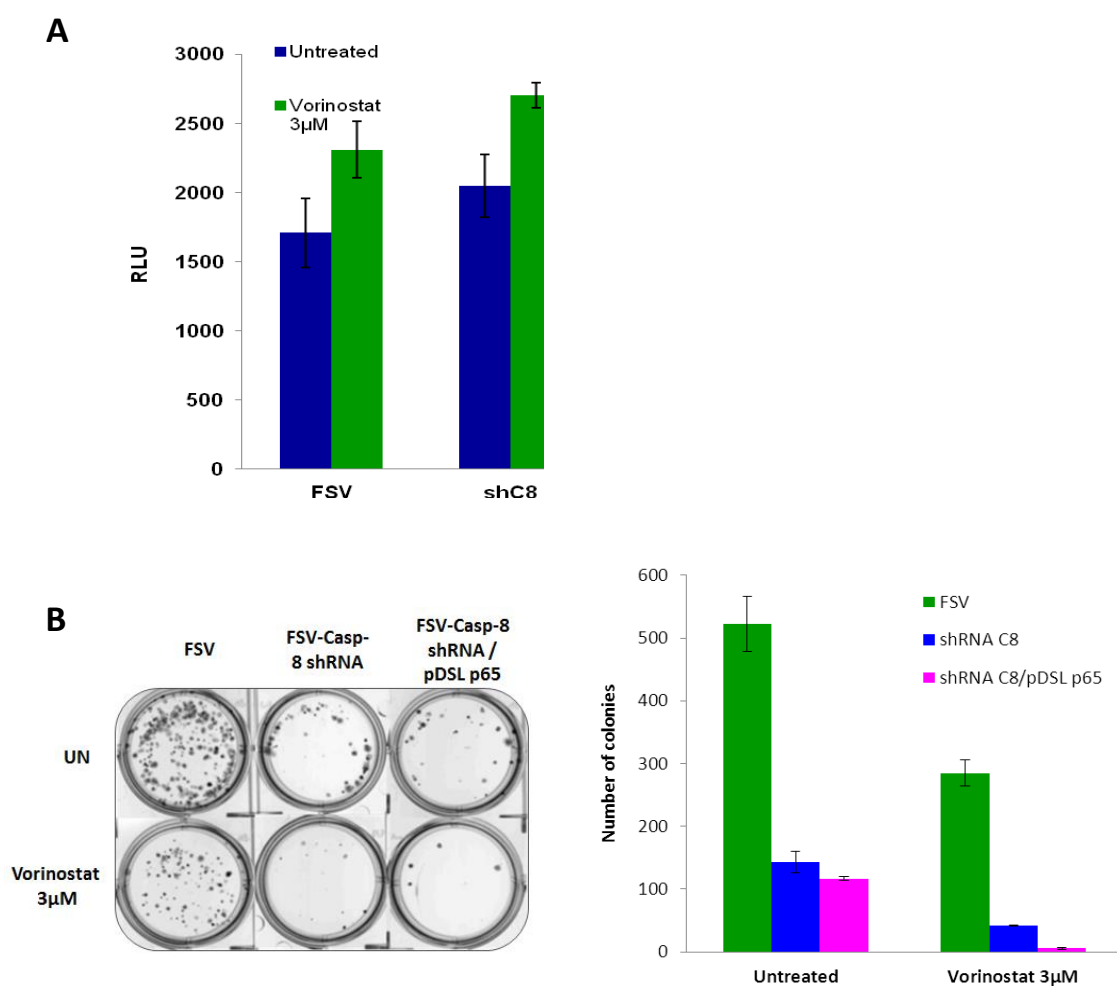


Figura 41. La caspasa-8 no promou l'activitat NF- κ B. A) Assaig d'activitat transcripcional d' NF- κ B en les IK. B) Assaig clonogènic i quantificació del nombre de colònies de les IK infectades amb la inhibició de la caspasa-8, sobreexpressió de p65 i tractades amb Vorinostat.

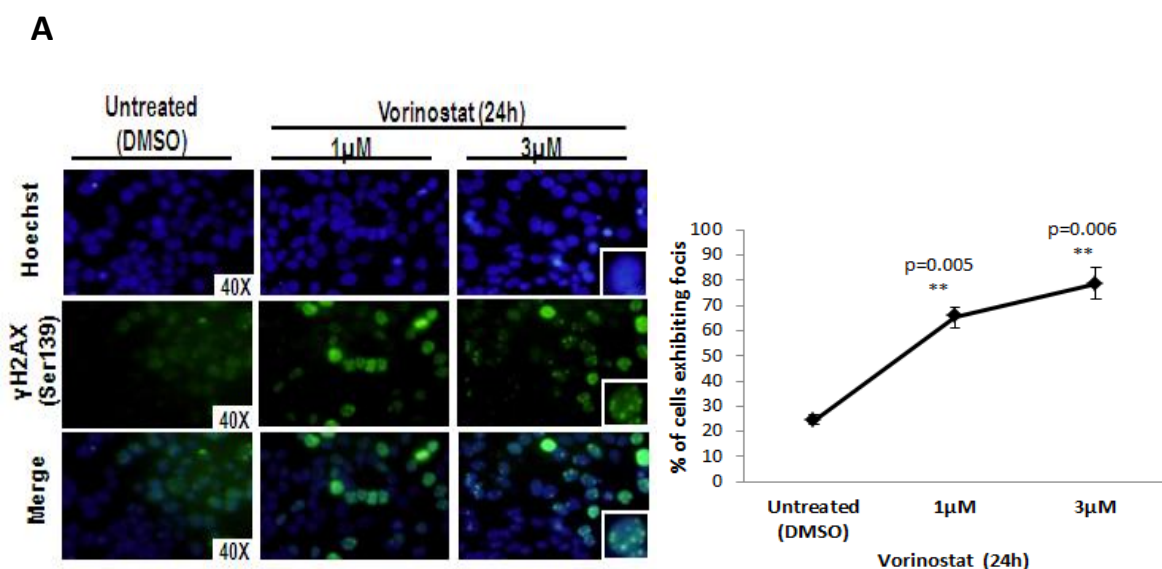
Aquests resultats suggereixen que la caspasa-8, efectivament, té funció pro-supervivència, però que aquesta activitat és independent de l'activació de la via d'NF- κ B.

El nostre següent estudi es basa en la determinació dels processos moleculars responsables dels efectes antitumorals del Vorinostat. Són varis els estudis que indiquen la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) com les responsables de la inducció de dany al DNA que condueix a una mort apoptòtica. Per investigar el paper de l'estrès oxidatiu en els efectes antineoplàsics del Vorinostat, hem avaluat l'efecte de diferents antioxidants (Bha, Nac i tiron) en la línia de CE, IK.

9. EL TRACTAMENT AMB VORINOSTAT INDUEIX DANY AL DNA I PER TANT FORMACIÓ DE FOCIS EN LA HISTONA H2AX EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Inicialment, vam estudiar l'habilitat del Vorinostat per causar dany al DNA en la línia de CE, IK. Per aquest propòsit, vam quantificar la formació de "focis" mitjançant la immunomarcació del foci variant de la histona fosforilada gamma H2AX (Figura 42.A). Els focis es produeixen quan hi ha un trencament a la doble cadena d'ADN.

El tractament amb Vorinostat augmenta significativament el nombre de focis. En la condició control el nombre de focis per cèl·lula representa un 24.5% i augmenta fins a un 80% després del tractament. Aquest augment en la fosforilació es va confirmar mitjançant Western Blot (Figura 42.B). Aquests resultats suggereixen que el tractament amb Vorinostat provoca danys i trencaments a la doble cadena d'ADN en les IK. (** $p < 0.01$)



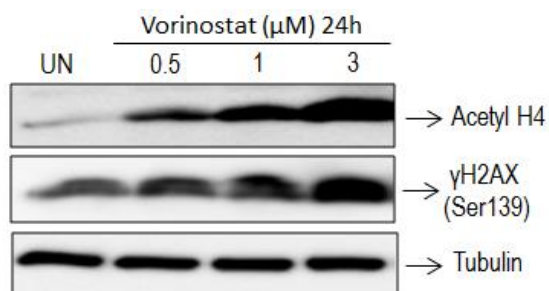


Figura 42. El Vorinostat causa dany al DNA. A) Immunodetecció de focus un cop les IK van ser tractades amb Vorinostat (panell esquerre) i recompte del nombre de focus (gràfic dret). B) Western Blot mostrant l'acumulació de la histona H2AX.

Estudis previs demostren que els efectes letals dels inhibidors de les HDAC podrien estar relacionats amb l'estrès oxidatiu²³⁹⁻²⁴². Per aquest motiu vam procedir a estudiar si la producció de ROS podia tenir un paper en els efectes antitumorals del Vorinostat en el CE. La producció de ROS en les IK va ser mesurada durant el tractament d'aquestes amb Vorinostat a diferents concentracions (Figura 42C-esquerra). La producció de ROS es va veure significativament augmentada; aquests augment es correlacionava amb una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial (MMP), mesurat amb una tinció de Rodamina 123 (Figura 42C-dreta)(** $p < 0.01$).

C

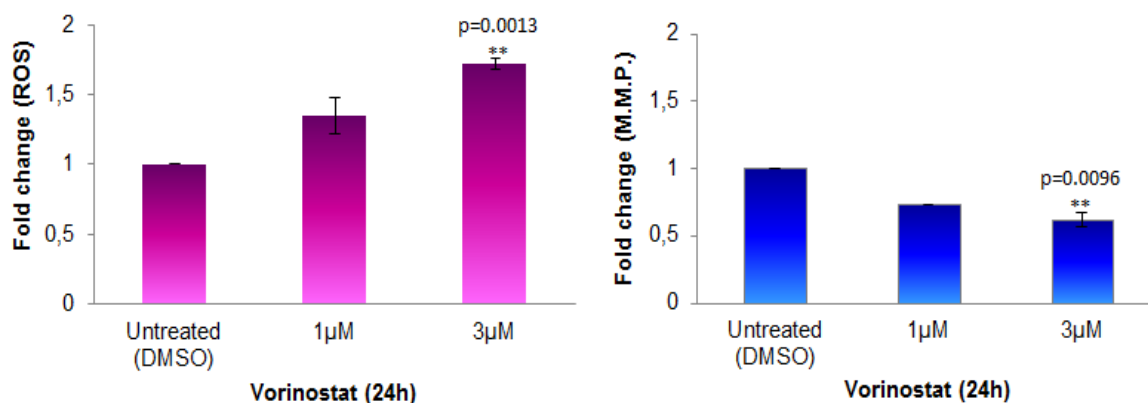


Figura 42.C. Gràfics representatius de la producció de ROS (esquerra) i la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial, MMP (dreta), en les IK un cop tractades a dosis creixents de Vorinostat.

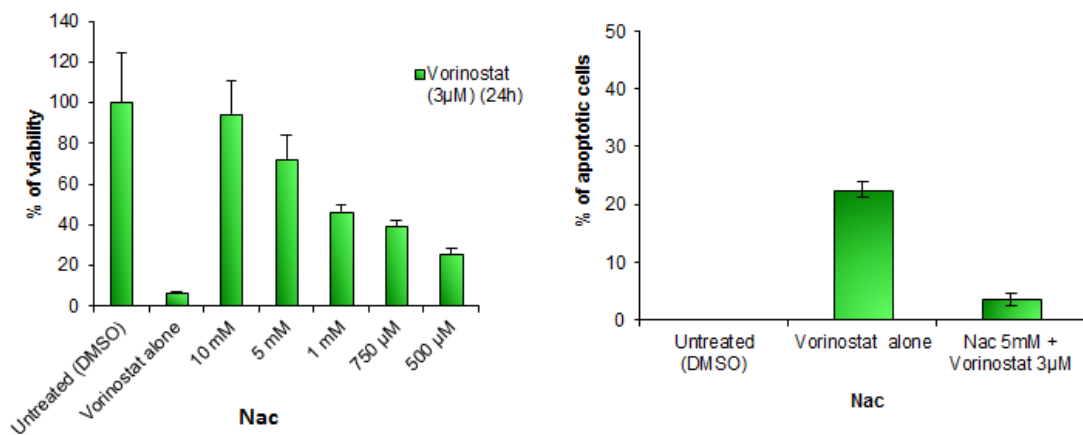
Aquests resultats indiquen que el tractament amb Vorinostat provoca un augment de l'estrès oxidatiu en les línies de CE, IK.

10. LA COMBINACIÓ D'ANTIOXIDANTS COM NAC, TIRON I BHA AMB VORINOSTAT INHIBEIX ELS EFECTES CITOTÒXICS INDUÏTS PEL VORINOSTAT EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Un cop demostrat que el Vorinostat provoca tant producció de ROS com dany al DNA en les cèl·lules de CE, IK, vam voler investigar el seu paper en l'activitat antineoplàsica del Vorinostat. En primer lloc vam testar els efectes dels diferents antioxidants (Nac, Bha i Tiron) en la disminució de la viabilitat provocada pel Vorinostat. Les IK van ser tractades amb Vorinostat (3 μ M) i dosis creixents dels antioxidants. A les 24 hores de tractament es van realitzar assajos de viabilitat amb MTT.

Els resultats ens van mostrar que el tractament amb qualsevol dels tres antioxidants causava un augment en la viabilitat cel·lular, és a dir, rescatava dels efectes citotòxics del Vorinostat (Figura 43.A). També vam voler quantificar el nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica quan eren tractades amb els antioxidants i Vorinostat. Per aquesta raó, les IK van ser tractades amb Vorinostat 3 μ M, sol o combinat amb antioxidants: Nac 5mM, Bha 300 μ M i Tiron 5mM durant 24 hores. La presència de Nac va reduir de manera significativa el nombre de cèl·lules apoptòtiques en el cultiu (Figura 43.B). Bha i Tiron també van reduir el nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica però essent menys efectius que el Nac (Figura 43.B). Com el Nac mostrava millor eficiència que els altres, vam continuar treballant solament amb aquest antioxidant. La combinació d'antioxidants i Vorinostat va mostrar valors significativament estadístics per a totes les dosis de Nac i Bha, en canvi el Tiron sols va mostrar un augment significativament estadístic per les dosis de 1 i 5 mM. (** $p < 0.01$).

A



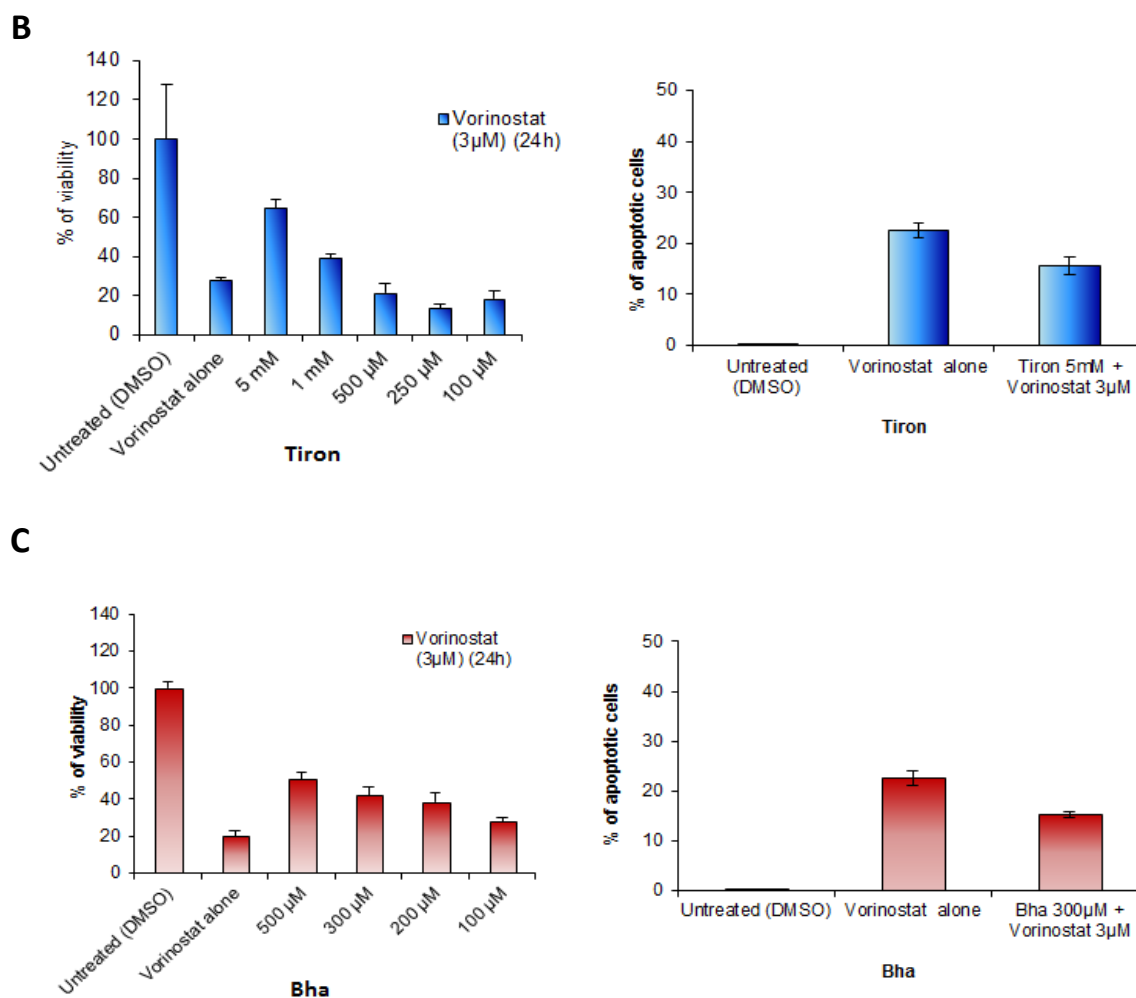


Figura 43. Efecte del tractament conjunt amb Vorinostat i antioxidants. Assajos de viabilitat cel·lular i quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques de les IK, tractades amb Vorinostat i dosis creixents de antioxidants A) Nac, B)Tiron i C) Bha.

De manera conjunta, els resultats indiquen que la producció de ROS causada pel tractament amb Vorinostat té un paper clau en l'augment de toxicitat induïda pel Vorinostat.

11. LA COMBINACIÓ DE L'ANTIOXIDANT NAC AMB VORINOSTAT REDUEIX EL DANY AL DNA AIXÍ COM LA PRODUCCIÓ DE ROS EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Per aclarir si els ROS contribuïen en la inducció de dany al DNA en les cèl·lules de CE, vam tractar les IK amb Vorinostat 3µM i Nac 5mM durant 24 hores, i van ser recollides i analitzades per a detectar producció de ROS. Per poder quantificar els ROS

vam realitzar una tinció amb CM-H₂DCFDA, per avaluar la producció intracel·lular de peròxid d'hidrogen, superòxid i altres tipus de ROS. El cotractament de les IK amb Nac va reduir lleugerament la producció de ROS induïda pel tractament amb Vorinostat, comparant amb les que van ser tractades solament amb el fàrmac (Figura 44.A). Com a control positiu es van utilitzar IK tractades 30 minuts amb H₂O₂.

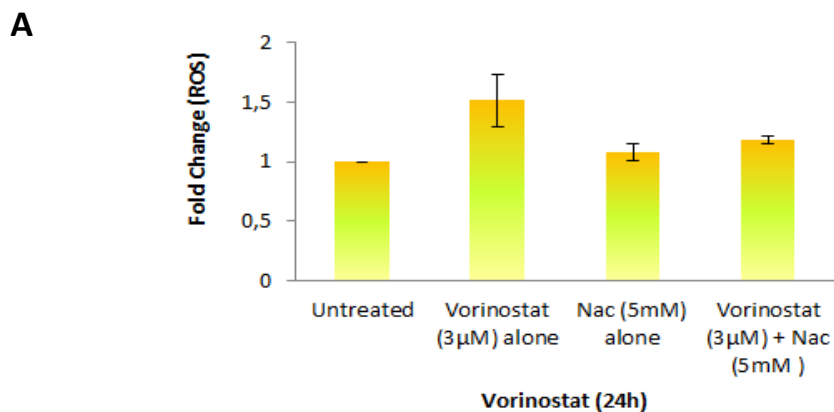
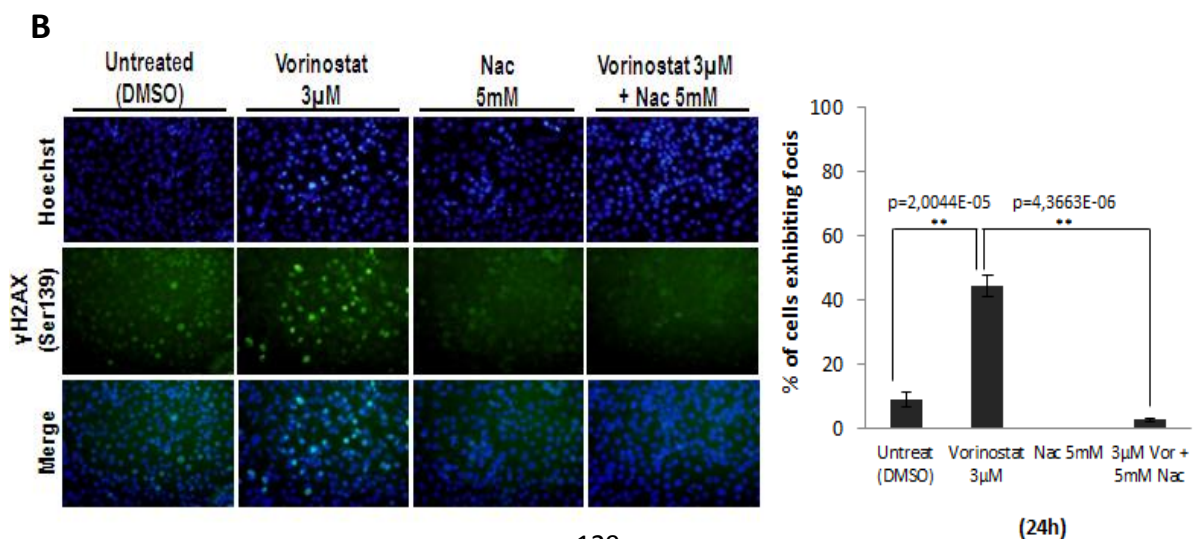


Figura 44.A. Quantificació de la producció de ROS en les IK tractades amb Vorinostat i Nac.

Per tal d'avaluar els efectes del Nac en el dany al DNA causat pel Vorinostat, en les IK, vam determinar el nombre de focis de H2AX formats després del cotractament amb Vorinostat i Nac. El nombre de focis es va veure reduït dràsticament durant el cotractament (Figura 44.B). Com s'observa en la figura 44.B, l'aparició de focis en les IK es va detectar després de 24 hores de tractament, evidenciant que el tractament amb Vorinostat induïa dany al DNA. Per contra, el cotractament de les IK reduïa els nivells de fosforilació de la histona H2AX (Ser 139) (Figura 44.C)(** $p < 0.01$).



C

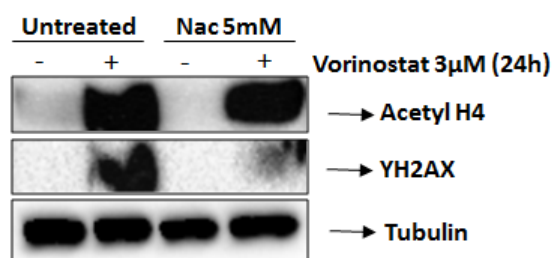


Figura 44. El cotractament de les IK amb Vorinostat i Nac disminueix el dany al DNA.

B) Immunofluorescència per detectar els focus en les IK cotractades (panell esquerra) i quantificació del nombre de focus (gràfic dreta). C) Western Blot que mostra els nivells de fosforilació de la histona H2AX.

Aquests resultats indiquen que el tractament de les IK amb Vorinostat causa un increment en la producció de ROS que és important per causar dany al DNA. En resum, els resultats suggereixen que el dany oxidatiu té un efecte funcional en la letalitat induïda pel Vorinostat en la línia de CE, IK.

12. EL TRACTAMENT AMB ANTIOXIDANTS NO INHIBEIX LA HIPERACETILACIÓ DE LA HISTONA H4 INDUÏDA PEL VORINOSTAT, EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Estudis previs del nostre grup han demostrat, que els antioxidants poden inhibir l'activitat antineoplàsica de diferents fàrmacs interferint sobre el seu mecanisme d'acció molecular²³⁵. En observar que el tractament amb antioxidants reduïa el dany al DNA i la producció de ROS, vam suposar que potser els antioxidants afectaven a l'activitat antitumoral del Vorinostat, variant els nivells d'acetilació de les histones. Per aclarir aquesta possibilitat, vam avaluar els nivells d'acetilació de la histona H4 després del cotractament de les IK amb Vorinostat i antioxidants. Per assegurar que el tractament amb Vorinostat era efectiu quan administràvem antioxidants vam examinar l'acumulació de la histona H4 mitjançant Western Blot. Vam observar una correcta hiperacetilació de la histona H4, degut a l'activitat dels HDACis. Les IK tractades amb els diferents antioxidants: Nac, Bha i Tiron juntament amb Vorinostat,

van mostrar, també, nivells semblants d'hiperacetilació de la histona H4 als observats amb el tractament de Vorinostat (Figura 45.A, B i C; línies 2 i 4).

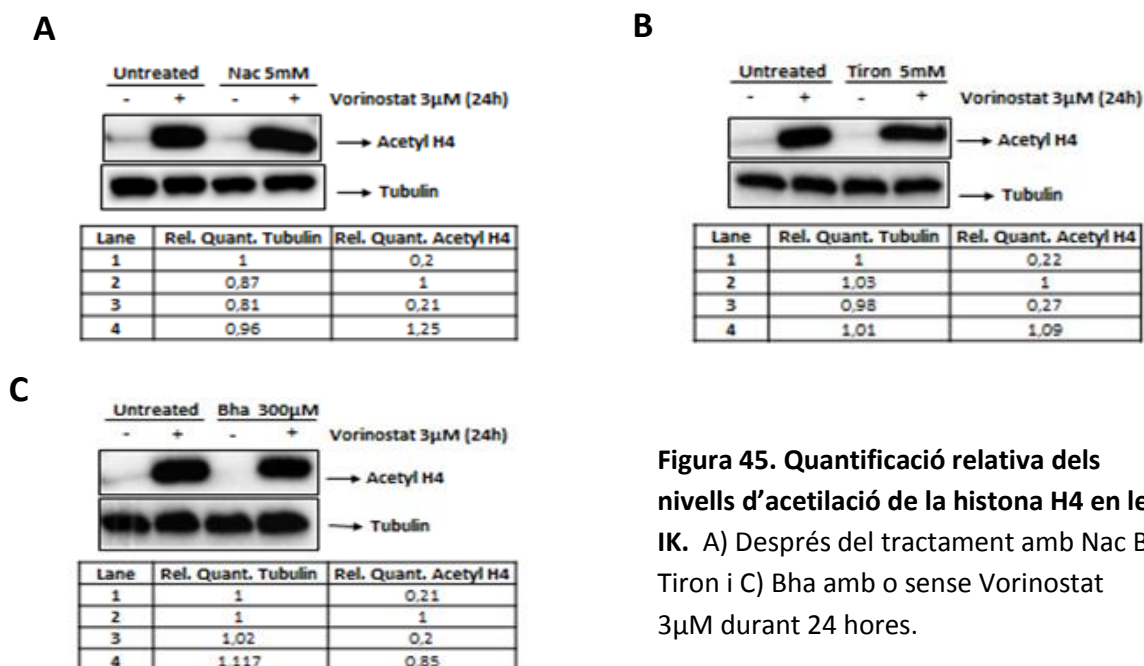


Figura 45. Quantificació relativa dels nivells d'acetilació de la histona H4 en les IK. A) Després del tractament amb Nac B) Tiron i C) Bha amb o sense Vorinostat 3µM durant 24 hores.

Aquests resultats demostren que els antioxidants no inhibeixen el mecanisme molecular d'actuació del Vorinostat.

13. LA COMBINACIÓ DE L'ANTIOXIDANT NAC AMB VORINOSTAT AUGMENTA LA CAPACITAT DE FORMACIÓ DE COLÒNIES I REDUEIX EL PROCESSAMENT DE LA CASPASA-3 EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Havent demostrat que el tractament amb antioxidants disminuïa la producció de ROS i el dany al DNA, causat pel tractament amb Vorinostat, sense interferir amb l'acetilació de les histones, és a dir, sense inhibir l'efecte del Vorinostat, vam estudiar la capacitat clonogènica i l'apoptosi de les cèl·lules IK tractades amb Vorinostat i Nac. La combinació del Vorinostat amb el Nac va resultar en un augment significatiu de la capacitat clonogènica en comparació amb les que sols havien estat tractades amb Vorinostat ($p = 3,956 \cdot 10^{-5}$)(Figura 46.A).

A

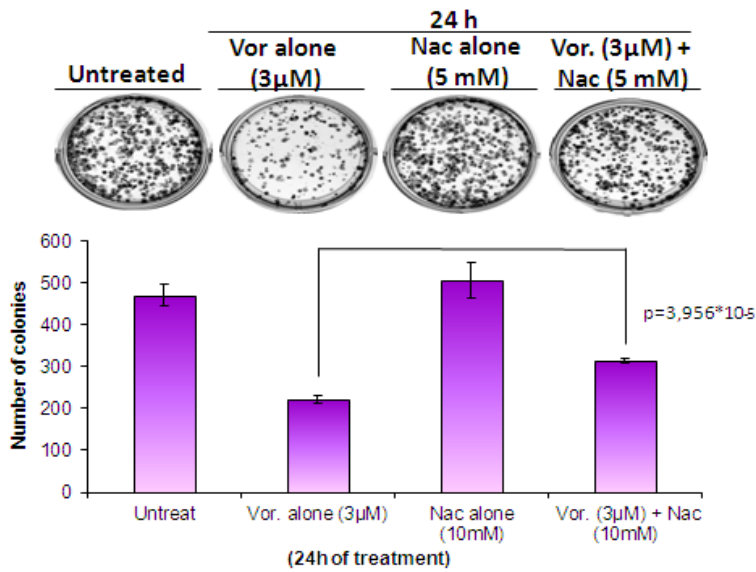


Figura 46.A. Assaig de formació de colònies (imatge superior) i quantificació del nombre de colònies en les IK, tractades amb Vorinostat, Nac i contractades amb Vorinostat i Nac (gràfic inferior).

Els anàlisis amb Western Blot (Figura 46.B) van demostrar que el cotractament amb Vorinostat i Nac reduïa el processament de la caspasa-3. Aquests resultats ens van suggerir que el cotractament esmentat redueix la mort apoptòtica induïda pel Vorinostat i per altra banda n'augmenta la capacitat clonogènica, assenyalant que la producció de ROS té un paper decisiu en l'activitat antitumoral del Vorinostat.

B

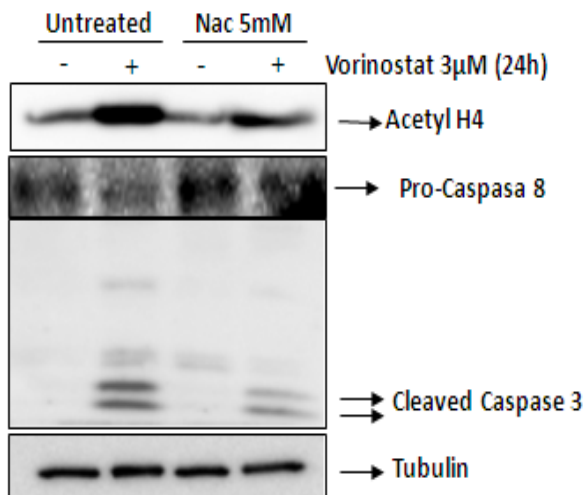


Figura 46.B. Western Blot mostrant el processament de la caspasa-8 i 3, en les IK tractades amb Vorinostat, Nac i contractades amb Nac i Vorinostat.

14. EL TRACTAMENT AMB NAC NO INHIBEIX ELS EFECTES ANTINEOPLÀSICS DEL VORINOSTAT I LA BAIXADA EN L'EXPRESSIÓ DE LA CASPASA-8 EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Com hem demostrat anteriorment (apartats 5 i 6) la reducció dels nivells de la caspasa-8 i el tractament amb Vorinostat mostra una forta activitat antitumoral en les línies de CE *in vitro* i *in vivo*. Per tant, vam voler avaluar si el tractament amb antioxidants també era capaç d'inhibir aquest efecte combinatori.

Per aquest propòsit, les IK van ser infectades mitjançant lentivirus amb la caspasa-8 inhibida i tractades amb Vorinostat 3 μ M amb o sense Nac 5mM durant 24h. Després d'aquest període de temps vam quantificar el nombre de cèl·lules mostrant morfologia apoptòtica. Va ser interessant observar que el Nac no reduïa el nombre de cèl·lules apoptòtiques quan la caspasa-8 es trobava inhibida (Figura 47.A).

A

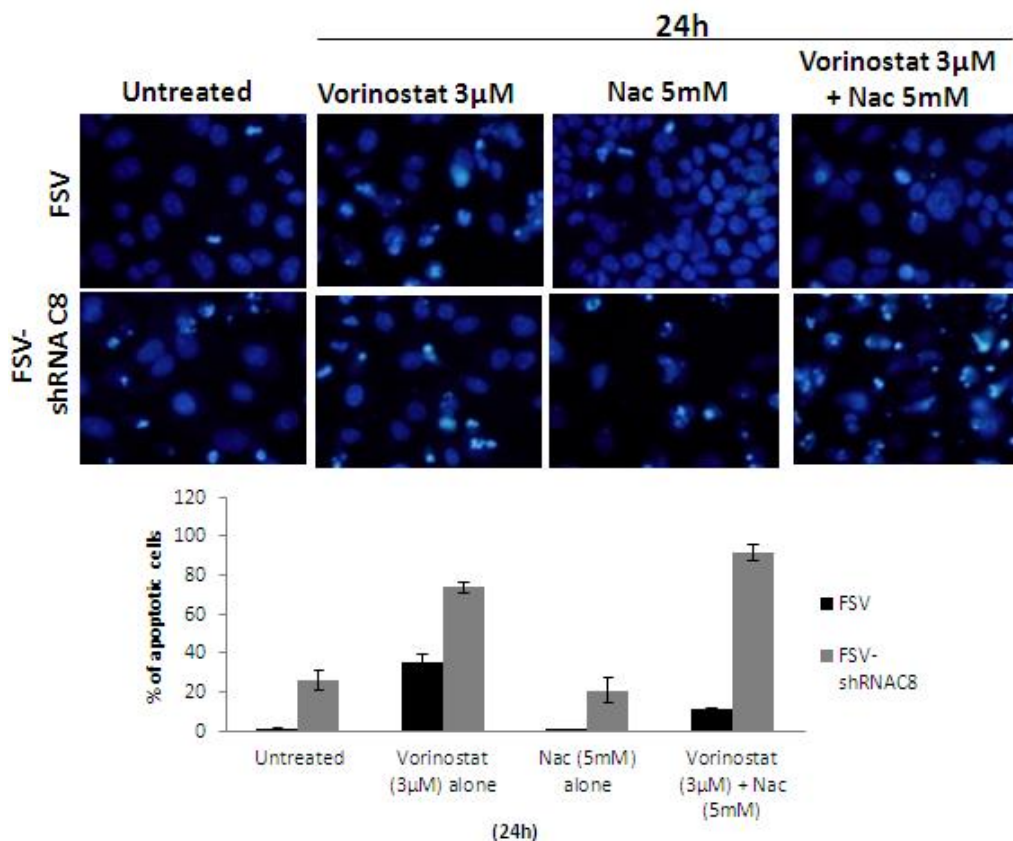
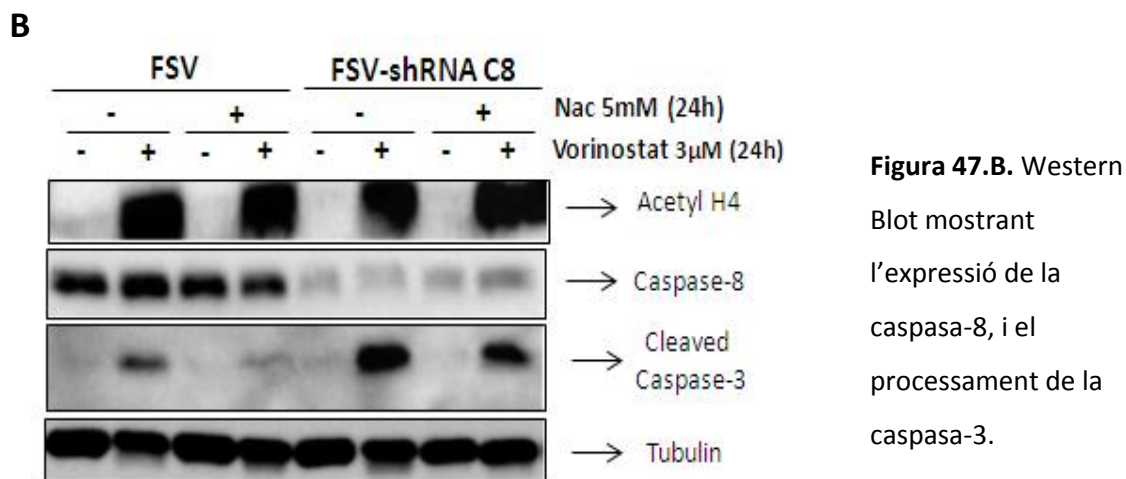


Figura 47.A. Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques en les IK tractades amb Vorinostat, Nac i contractades amb Nac i Vorinostat.

De la mateixa manera, els anàlisis de Western Blot van mostrar que el processament de la caspasa-3 no es veia reduït després del tractament amb Nac quant la caspasa-8 estava inhibida (Figura 47.B).



Els resultats indiquen, doncs, que la combinació entre Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 no és sensible al tractament amb antioxidants com el Nac.

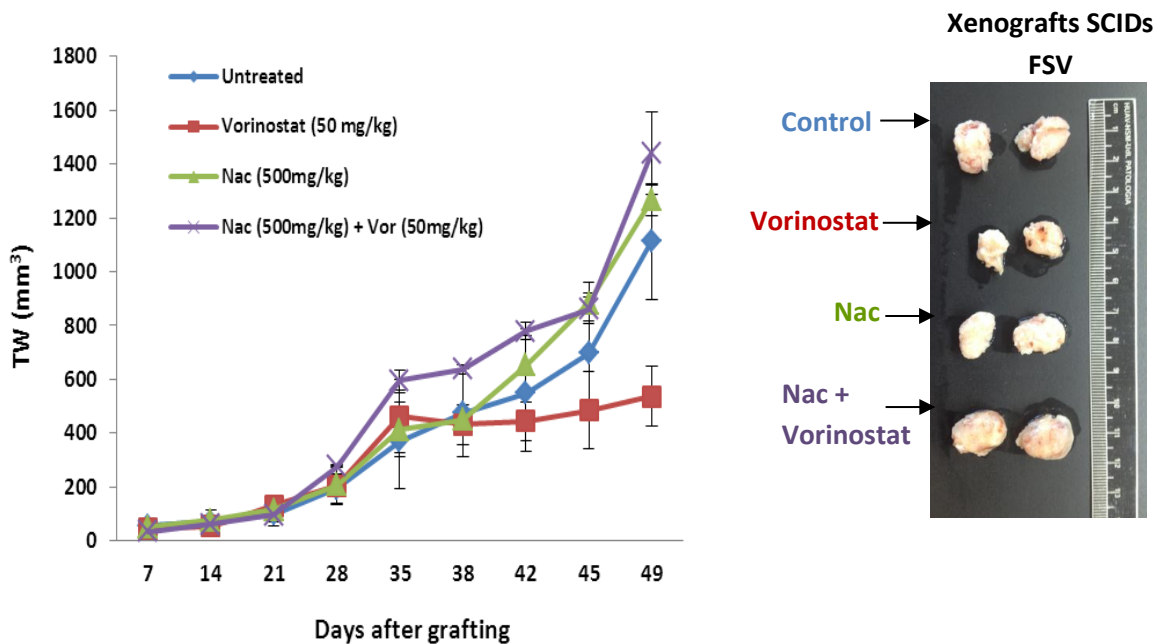
15. EL TRACTAMENT AMB NAC RESCATA ELS EFECTES ANTITUMORALS DEL VORINOSTAT, PERÓ NO TÉ CAP EFECTE EN LA COMBINACIÓ DEL VORINOSTAT I LA INHIBICIÓ DE LA CASPASA-8 *IN VIVO*.

Finalment, vam avaluar els efectes dels antioxidants sobre l'efecte terapèutic de la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 *in vivo*. Per aquest propòsit, vam infectar amb lentivirals la línia de CE, IK, unes amb el vector control (FSV) i altres amb el vector inhibidor de l'expressió de la caspasa-8 (FSV-Casp-8 shRNA). A continuació vam injectar subcutàniament un nombre concret de cèl·lules IK a l'esquena del ratolins SCID femella. A la part esquerra hi vam injectar les IK expressant el vector control (FSV) i a la dreta les IK amb l'expressió de la caspasa-8 inhibida (FSV-Casp-8 shRNA). Després vam fer mesures cada setmana (fins el dia 42 després d'haver injectat les cèl·lules subcutàniament) per analitzar el creixement tumoral dels xenografts generats (Figura 48.A). En aquest punt, es van fer 4 grups: el primer grup no es va tractar (control), el segon grup es va tractar amb Nac (500 mg/kg), el tercer grup

es va tractar amb Vorinostat (50 mg/kg) i el quart grup amb Nac i una hora més tard amb Vorinostat. Aquest tractament es va realitzar durant dues setmanes, 5 dies/setmana. El pes dels animals i les mesures dels volums dels tumors és van fer setmanals fins al final de l'experiment.

Com s'observa en la figura 48.A, l'administració del Vorinostat i el Nac va permetre el desenvolupament dels tumors amb mesures semblants al control. Aquests resultats indiquen que, tal i com vam observar *in vitro*, el tractament amb antioxidants també inhibeix els efectes antitumorals del Vorinostat *in vivo*. Per contra, en el mateix experiment realitzat amb les IK infectades amb lentivirus que inhibien l'expressió de la caspasa-8 els resultats van ser diferents. En aquest cas, els tumors del grup 3 o 4, on s'havien tractat els animals amb Vorinostat o Nac i Vorinostat, respectivament, el volum era semblant al grup control, és a dir als no tractats (Figura 48.B), indicant que els antioxidants no són capaços d'inhibir els efectes de la combinació del Vorinostat amb la caspasa-8 en les cèl·lules de CE (Figura 48.B).

A



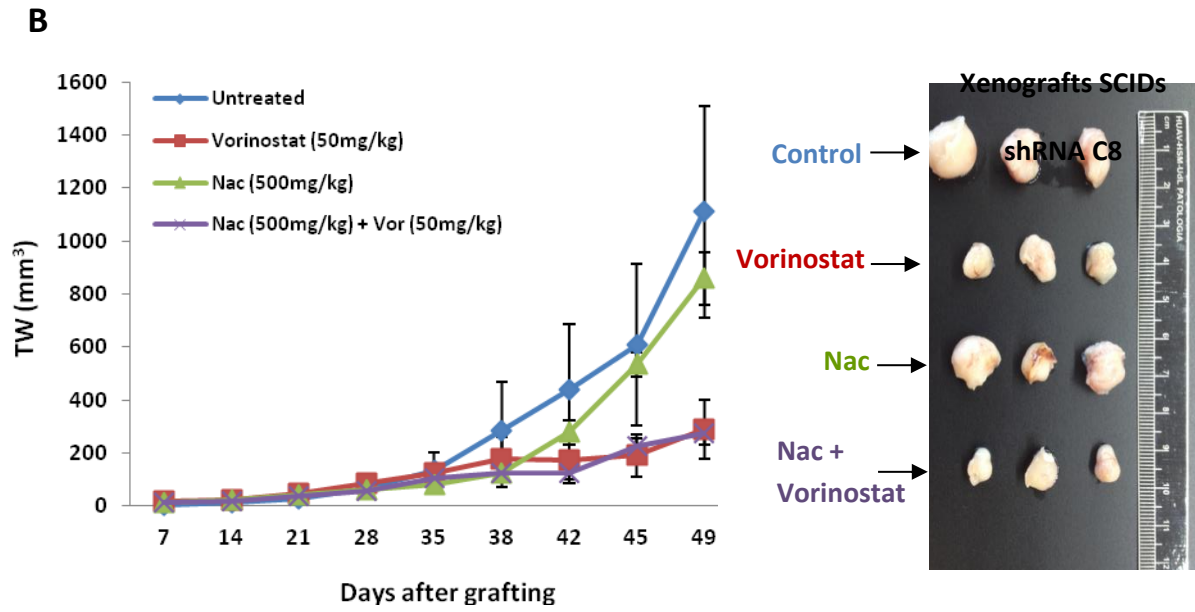


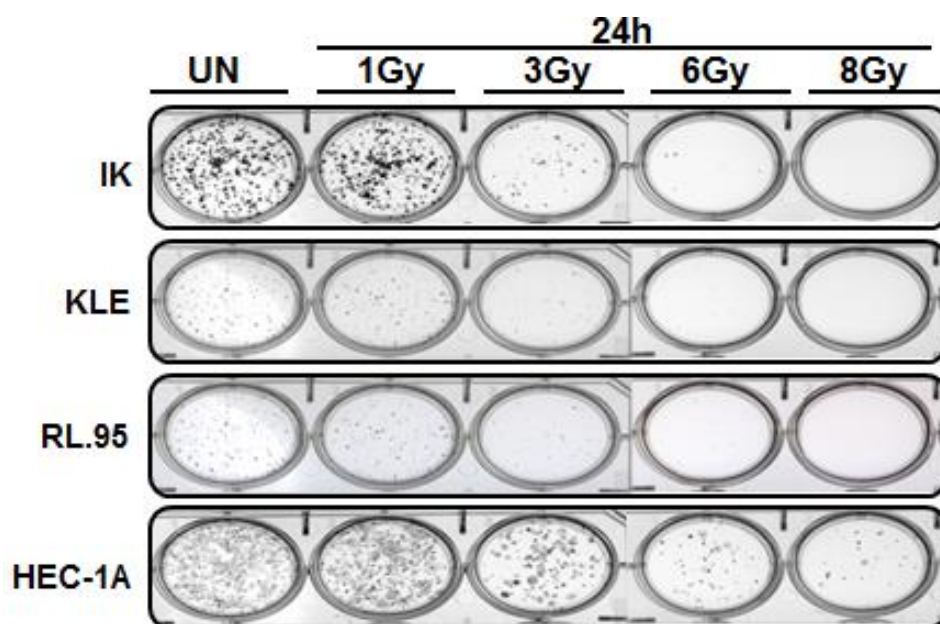
Figura 48. Xenografts tractats amb Vorinostat, Nac i la seva combinació. El tractament amb Nac rescata la mort induïda pel Vorinostat A), però no quant s'inhibeix la caspasa-8 B).

Com ja s'ha comentat en la introducció, el tractament del CE es basa en la cirurgia, la quimioteràpia i la radioteràpia. El tractament radioterapèutic està indicat en les pacients amb CE amb risc intermedi o alt de reaparició. Però, el principal problema d'aquest és l'aparició de radioresistència al tractament fet que comportaria la reaparició del tumor de manera local o també en forma de metàstasis. En aquesta part de l'estudi vam voler investigar els efectes de la radioteràpia en el CE així com una possible combinació de tractaments per tal d'aconseguir un efecte sinèrgic i augmentar els efectes antitumorals per bloquejar el creixement tumoral de les línies de CE.

16. LES LÍNIES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI (HEC-1A, IK, RL.95 I KLE) EXPRESSEN DIFERENTS GRAUS DE RADIOSENSIBILITAT UN COP EXPOSADES A DOSIS CREIXENTS DE RADIACIÓ IONITZANT.

Per tal d'avaluar els efectes de la IR en les mostres de CE, aquestes van ser irradiades al Servei de Radioteràpia Oncològica de l'HUAV, amb l'accelerador lineal Clinac 2100C (Varian), tal i com s'explica a l'apartat 1.6 de Materials i Mètodes. En la figura 49 s'observa que el tractament a dosis creixents de IR (1, 3, 6 i 8 Gy) promou la disminució de la capacitat clonogènica de les línies de CE.

A



B

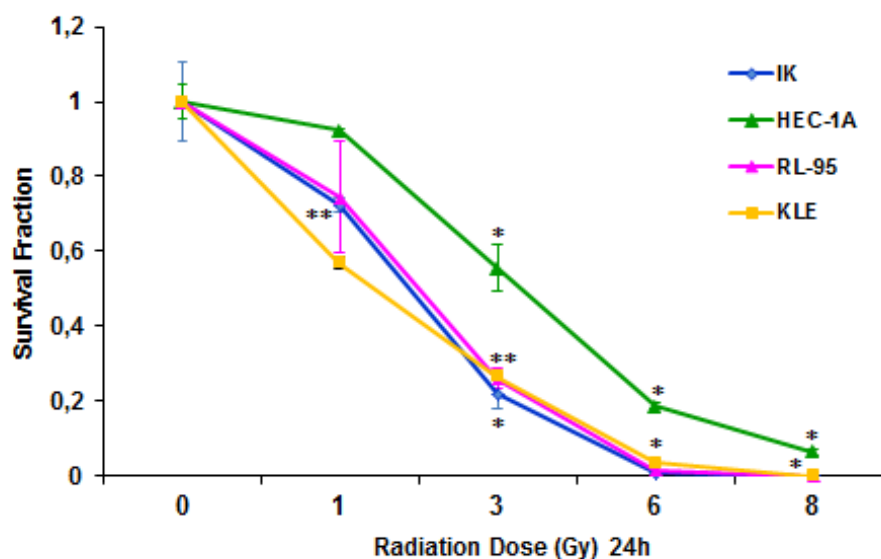


Figura 49. A) Assaig clonogènic i B) gràfic amb les corbes de supervivència de les línies de CE (IK, HEC-1A, RL.95 i KLE) després de ser irradiades a dosis de 1, 3, 6 i 8 Gy.

En el gràfic de la figura 49 es mostren les corbes de supervivència de les línies de CE un cop irradiades; aquestes presenten diferents graus de radiosensibilitat: les KLE van ser classificades com les més radiosensibles, mentre que les HEC-1A van ser classificades, relativament, com les més radio-resistents. Com les IK es trobaven en una posició intermitja, van ser les escollides per a continuar els nostres experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

17. EL TRACTAMENT AMB RADIOTERÀPIA INDUEIX MORT APOPTÒTICA A TEMPS LLARGS EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

A continuació vam voler estudiar si la IR era capaç també d'induir mort apoptòtica en les línies de CE. Per aquest motiu vam quantificar el nombre de cèl·lules apoptòtiques mitjançant citometria de flux, prèvia tinció amb Annexina V-FITC i iodur de propidi (IP). Tal i com s'observa en la figura 50.A ni als 30 minuts ni a les 24 hores després del tractament amb IR s'observava presència de cèl·lules apoptòtiques en cap de les tres dosis emprades. Els percentatges de cèl·lules apoptòtiques després del

tractament van ser de 0.8 en el control; 2.2 en 1 Gy; 1 en 3 Gy i 1 en 8 Gy i després de 24h van ser de 1; 1.8, 1.1 i 4.3 respectivament.

A

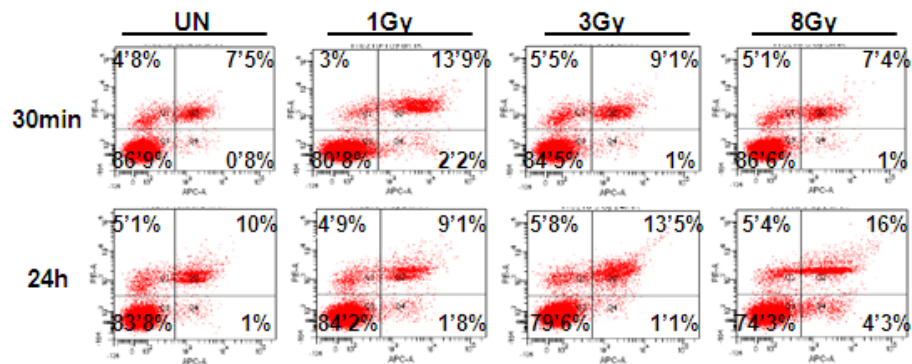


Figura 50.A. Anàlisi representatiu de la citometria de flux de l'apoptosi induïda després del tractament amb IR.

Resultats similars vam obtenir després de tenyir amb *Hoechst* les IK exposades a dosis creixents de IR (0, 1, 3 i 8 Gy) (Figura 50.B).

B

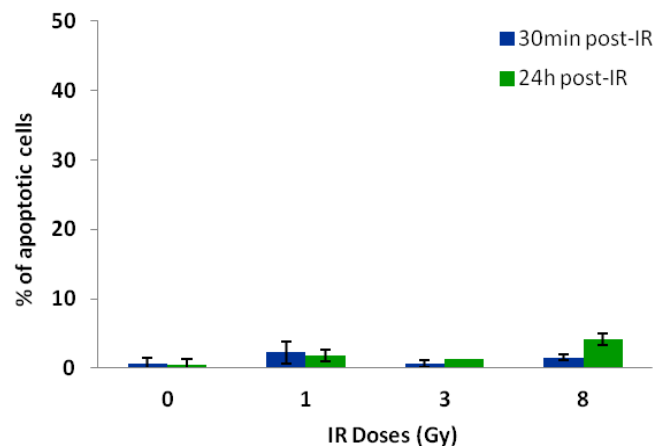


Figura 50.B. Recompte del nombre de cèl·lules apoptòtiques 30 minuts i 24 hores després del tractament amb IR.

En aquest punt vam pensar que la IR potser induïa mort apoptòtica a temps més llargs. Per aquest motiu les IK van ser irradiades a 3 Gy i juntament amb el seu control

(0 Gy) van ser tenyides amb *Hoechst* als 30 minuts, 24, 48 i 72 hores després del tractament. En la figura 50.C el gràfic mostra un augment significatiu del nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica a les 48 i 72 hores després de ser tractades amb IR ($p_{48h}=0.0363$, $p_{72h}=0.0045$).

C

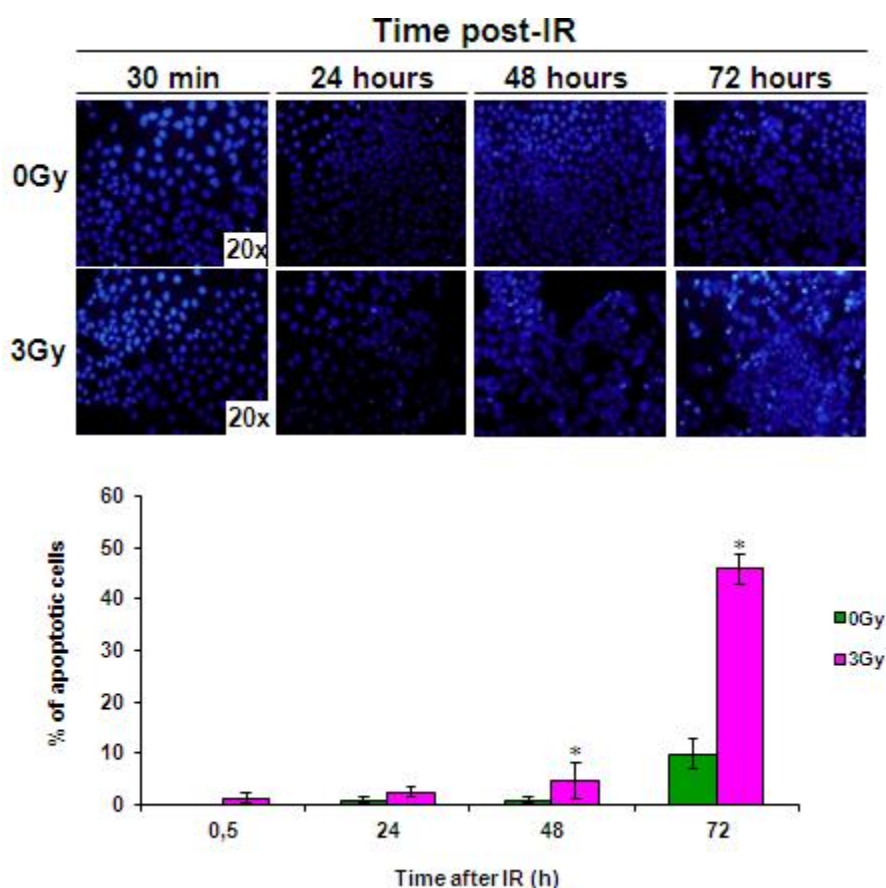


Figura 50.C. Recompte del nombre de cèl·lules apoptòtiques 30 minuts, 24, 48 i 72 hores després del tractament amb IR.

18. LA RADIOTERÀPIA PRODUEIX UNA ATURADA DEL CICLE CEL·LULAR EN LA FASE G2/M I UNA REDUCCIÓ DEL NOMBRE DE CÈL·LULES EN FASE S.

A continuació vam estudiar la capacitat de la IR en inhibir la progressió del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux. Les IK van ser recollides 30 minuts i 24 hores després de ser irradiades (0, 1, 3 i 8 Gy). Com s'observa en la figura 51.A, la IR va causar una disminució significativa en la fase S1 (16,78% (control) vs. 5,7% (3 Gy) i

6,04% (8 Gy)), acompanyat per un simultani augment de la fase G₂/M (19,53% (control) vs. 66,57% (3 Gy) i 75,91% (8 Gy)).

A

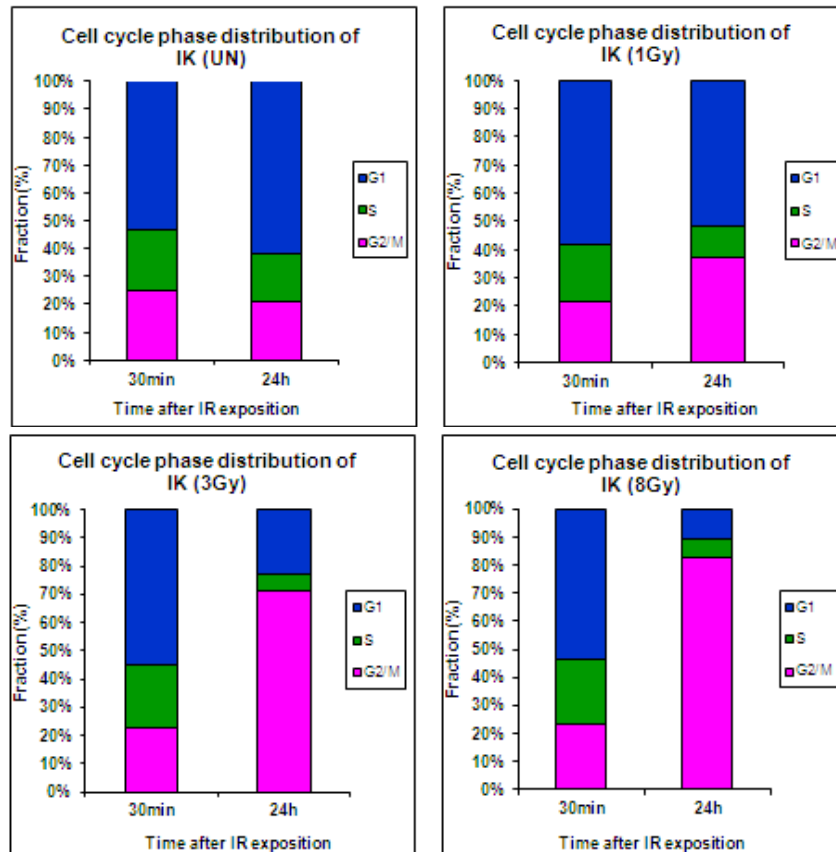


Figura 51.A. Distribució de les diferents fases del cicle cel·lular de les IK després del tractament (30 minuts i 24 hores) amb IR a dosis de 1, 3 i 8 Gy.

19. EL TRACTAMENT AMB RADIACIÓ IONITZANT INDUEIX DANY AL DNA I AUGMENTA LA PRODUCCIÓ DE ROS DEPENDENT DE LA DOSI DE RADIACIÓ.

Havent observat que la IR provocava una aturada en la fase G₂/M, vam pensar si també induïa dany al DNA. La fosforilació de la histona H2AX (γ-H2AX), la qual té lloc als voltants del trencament de la doble cadena de ADN, els anomenats DSB (*Double Strand Breaks*), pot proporcionar una mesura del nombre i la ubicació dels DSBs dins el nucli i per tant pot ser utilitzat com un indicador de dany al DNA induït per la IR. Aquestes fosforilacions que “marquen” els llocs de trencament de la doble cadena es coneixen com focis. Per aquest motiu vam quantificar, mitjançant

immunofluorescència marcant la histona H2AX fosforilada, el nombre de focis formats després del tractament de les IK amb IR (Figura 52.A). Les IK van ser IR a 3 Gy, recollides i fixades als temps indicats (30 minuts, 3, 6, 12 i 24 hores). Els focis van ser presents als 30 minuts després del tractament i el percentatge de nuclis amb focis augmentava significativament al llarg del temps. Els percentatges de cèl·lules exhibint focis era del 35,82% als 30 minuts de tractament, 64,38% a les 3 hores, 67,17% a les 6 hores, 72,63% a les 12 hores i 82,12% a les 24 hores (** p <0.001). Aquestes troballes són consistents amb l'evidència bioquímica que la IR indueix focis i indiquen també que els DSBs persisteix en les cèl·lules transformades.

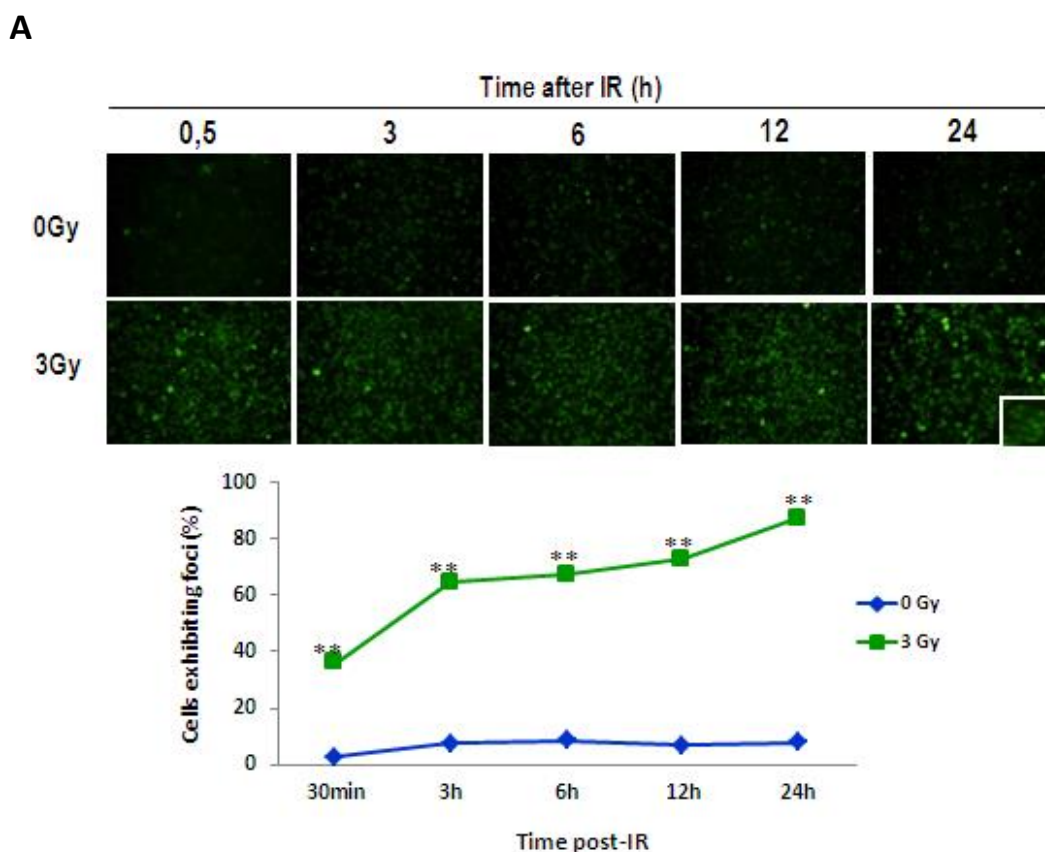


Figura 52.A. Immunofluorescència pel marcatge de la histona H2AX després del tractament amb IR. El nombre de focis va augmentar significativament després del tractament.

Per comprovar els nivells γ -H2AX després del tractament vam realitzar un Western Blot, i vam observar que els nivells augmentaven considerablement al llarg del temps (Figura 52.B).

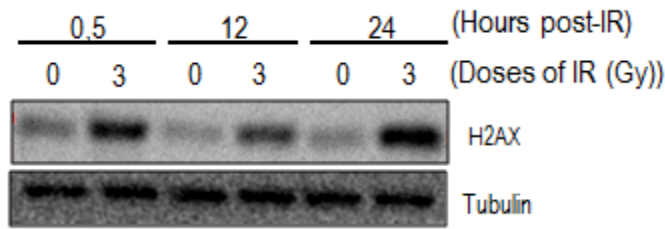
B

Figura 52.B. Western Blot mostrant els nivells de γ -H2AX després de la irradiació de les IK.

La relació entre el dany al DNA i la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) està àmpliament descrita²⁴³. A continuació vam analitzar la producció de ROS en les IK després de ser irradiades a dosis de 1 i 3 Gy. Coincidint amb els resultats anteriors les IK van mostrar un fenotip relativament sensible al tractament amb IR. La producció de ROS va augmentar significativament en les dos condicions ($p < 0.05$) (Figura 52.C).

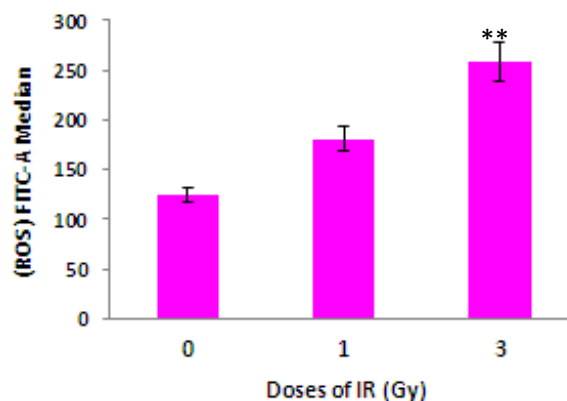
C

Figura 52.C. Producció de ROS en les IK després del tractament amb IR.

20. LA COMBINACIÓ DE RADIOTERÀPIA I VORINOSTAT AUGMENTA ELS EFECTES CITOTÒXICS D'AQUEST, REFLEXANT-SE AMB UNA BAIXADA EN LA CAPACITAT CLONOGÈNICA DE LES CÈL·LULES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Alguns estudis en diferents tipus de càncers afirmen que els HDACis són potents radiosensibilitzadors^{244, 245}. A continuació vam voler estudiar si l'HDACi, Vorinostat utilitzat al llarg d'aquesta tesi, tenia efectes radiosensibilitzadors en les IK. Les IK van ser tractades i IR tal i com s'explica en l'apartat 1.6 de Materials i Mètodes. Hem ajustat els valors, obtinguts dels replicats, en models lineals i models lineals mixtes

(tenint en compte la variabilitat introduïda per les mesures repetides). Els resultats obtinguts indiquen que tant l'efecte de la dosi, com de la irradiació tenen un efecte estadísticament significatiu ($p < 0.0001$) i també la seva interacció ($p < 0.0001$) (Taula 19, 20). D'aquesta manera es pot constatar que a major dosi de Vorinostat menor proporció de colònies, si bé, aquesta disminució és molt major quan s'irradien les cèl·lules (Figura 53). Les taules de sota mostren el resultat dels models ajustats.

| Effect | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | p-value |
|--------------------------------|----|--------|---------|---------|---------|
| Dose | 5 | 2,08 | 0,41 | 535,68 | <0.0001 |
| Radio | 1 | 0,50 | 0,50 | 651,35 | <0.0001 |
| Interaccion Dose with Radio | 5 | 0,19 | 0,04 | 49,67 | <0.0001 |
| Residuals | 12 | 0,01 | 0,0007 | | |

Taula 19. Taula d'anàlisi de la variància amb els resultats del model lineal que avaluen els efectes de la dosi, la radiació i la seva interacció en la proporció del nombre de colònies.

```
> anova(dades.lme)
```

| | numDF | denDF | F-value | p-value |
|-------------|-------|-------|----------|---------|
| (Intercept) | 1 | 11 | 7216.847 | <.0001 |
| Dose | 5 | 11 | 535.681 | <.0001 |
| Radio | 1 | 11 | 651.352 | <.0001 |
| Dose:Radio | 5 | 11 | 49.672 | <.0001 |

Taula 20. Taula d'anàlisi de la variància amb els resultats del model lineal mixt que avaluen els efectes de la dosi, la radiació i la seva interacció en la proporció del nombre de colònies.

En la taula 21 observem els intervals de confiança per a les proporcions estimades pels models, on es pot evidenciar que, per exemple a dosi 500nM de Vorinostat la proporció de colònies és del 97% (IC 93%-100%) sense irradiar, mentre que amb irradiació la proporció disminueix fins al 44% (I.C. 40-48%).

> taula

| | Dose | Radio | fit | lwr | upr |
|------|--------|-------|------|-------|------|
| 0 Gy | (DMSO) | 0Gy | 1.00 | 0.96 | 1.04 |
| | 500nM | 0Gy | 0.97 | 0.93 | 1.01 |
| | 1µM | 0Gy | 0.70 | 0.66 | 0.75 |
| | 3µM | 0Gy | 0.56 | 0.52 | 0.60 |
| | 5µM | 0Gy | 0.28 | 0.23 | 0.32 |
| | 10µM | 0Gy | 0.27 | 0.22 | 0.31 |
| 3 Gy | (DMSO) | 3Gy | 1.00 | 0.96 | 1.04 |
| | 500nM | 3Gy | 0.44 | 0.40 | 0.48 |
| | 1µM | 3Gy | 0.26 | 0.22 | 0.30 |
| | 3µM | 3Gy | 0.18 | 0.14 | 0.23 |
| | 5µM | 3Gy | 0.12 | 0.08 | 0.17 |
| | 10µM | 3Gy | 0.02 | -0.02 | 0.07 |

Taula 21. Taula d'anàlisi amb les proporcions estimades, segons el previst model, amb els intervals de confiança del 95%. Els resultats constaten la marcada diferència en la proporció observada amb la radiació respecte a la no-radiació.

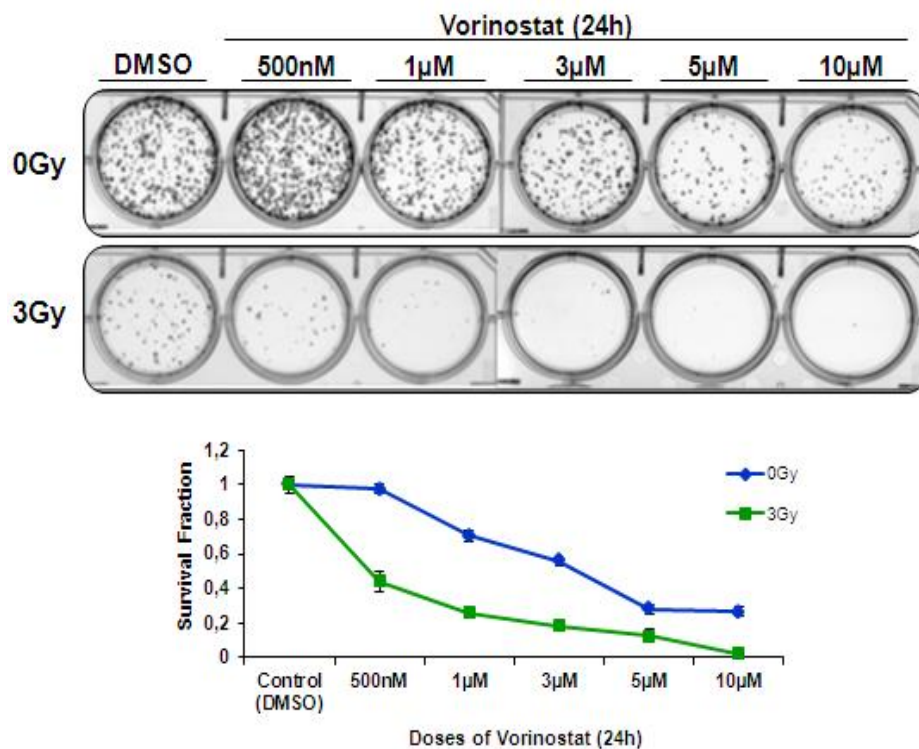


Figura 53. Assaig de formació de colònies i gràfic mostrant les proporcions de dosificació i l'exposició a la radiació ionitzant.

Finalment, l'última part del nostre estudi es basa en la possible administració de VD per al tractament del CE. La VD₃ inactiva sofreix una sèrie d'hidroxilacions fins a convertir-se en 1,25D (hormona activa circulant), tal i com s'explica en la introducció, i s'uneix al receptor de VD, VDR. Aquest receptor pot actuar com activador/repressor transcripcional de més de 200 gens reguladors del creixement, diferenciació i apoptosi en les cèl·lules normals i tumorals. L'endometri és un teixit diana on la 1,25D promou efectes antitumorals.

21. L'ENDOMETRI CANCERÓS PRESENTA NIVELLS INFERIORS DE VDR EN COMPARACIÓ AMB LES DOS FASES (PROLIFERATIVA I SECRETORA) DE L'ENDOMETRI NORMAL.

Per a que hi hagi un correcte efecte antiproliferatiu i antitumoral degut a la unió de 1,25D-VDR, és necessària una correcta translocació del VDR citosòlic al nucli. Tal i com s'ha explicat en la introducció l'VDR és un factor de transcripció que per a regular els efectes antitumorals s'ha de transposar al nucli, també són necessaris uns nivells adequats de VDR, un cop aquest s'ha unit al seu lligand. Per aquest motiu, l'expressió de VDR va ser avaluada, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, en les diferents fases del cicle menstrual (secretora i proliferativa) de l'EN i també en el CE.

En l'EN, els nivells de VDR eren heterogenis i significativament reduïts en la fase proliferativa en comparació amb la secretora ($p=0.000004$ i $p=0.00000005$, respectivament)(valors en **blau**)(Taula 22)(Figura 54.A i 54.B).

Les mostres de CE mostraven uns nivells significativament inferiors de VDR nuclear, en comparació amb les mostres de NE ($p=0.0002$)(valors en **verd**) (Taula 22)(Figura 54.C). L'VDR va ser observat també, en el citoplasma de les cèl·lules de CE de manera heterogènia.

| | | n | min | Max | Mean | SD | Fold-change | p-value |
|------------------------------------|--------------------------------|-----|-------------|--------------|--------------|------|-------------|----------------|
| Normal samples | All | 56 | 0.0 | 290.0 | 142.5 | 90.9 | | |
| | Proliferative Secretory | 14 | 0.0 | 135.0 | 54.3 | 46.2 | 1.00 | |
| | | 41 | 10.0 | 290.0 | 171.9 | 82.9 | 3.17 | 0.00002 |
| Normal versus tumor samples | All | 137 | 0.0 | 290.0 | 105.7 | 77.2 | | |
| | Normal | 56 | 0.0 | 290.0 | 142.5 | 90.9 | 1.00 | |
| | Tumor | 137 | 0.0 | 270.0 | 90.7 | 65.5 | 0.64 | 0.0003 |

Taula 22. Anàlisi estadístic dels nivells de VDR en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; *P-values* de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global *p-value*) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

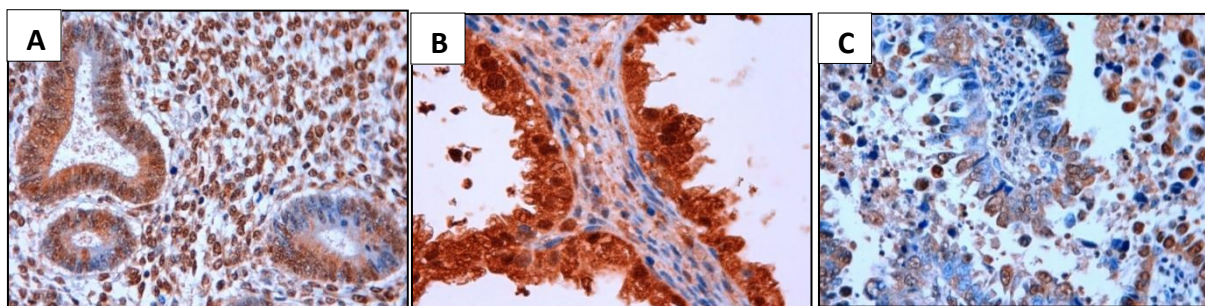


Figura 54. Anàlisi per immunohistoquímica de l'expressió de VDR en l'EN i l'EC. A) Expressió del VDR en l'EN, fase proliferativa: majoritàriament localitzat en el nucli de les glàndules endometrials amb poca tinció citoplasmàtica, i tinció moderada en l'estroma endometrial; B) Expressió del VDR augmentada en l'EN, fase secretora. C) Expressió lleugera del VDR en el citoplasma de l'estroma i heterogènia en el nucli de les cèl·lules de CE.

Les mostres de EEC presentaven nivells més baixos de VDR nuclear en comparació amb les mostres de NEEC (valors en **taronja**)(Taula 23). Finalment, no vam observar diferències significatives en l'expressió del VDR nuclear entre graus histològics o patològics (valors **violeta** i **rosa**)(Taula 23).

| | | N | min | Max | Mean | SD | Fold-change | p-value |
|----------------------|------------------|-----|------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|-------------|
| Tumor samples | All | 137 | 0.0 | 270.0 | 90.7 | 65.5 | | |
| | NEEC | 22 | 30.0 | 250.0 | 131.8 | 71.8 | 1.00 | |
| | EEC | 114 | 0 | 270 | 82.4 | 61.7 | 1.60 | 0.002 |
| | Grade 1 | 39 | 15 | 250 | 87.6 | 57.0 | 1.0 | |
| | Grade 2 | 52 | 0 | 250 | 91.2 | 62.1 | 1.0 | |
| | Grade 3 | 46 | 0 | 270 | 92.8 | 76.5 | 1.0 | |
| | | | | | | | increasing trend | 0.71 |
| | | | | | | | p-value | |
| | | | | | | | global p-value | 0.93 |
| | | | | | | | | |
| | Stage I | 77 | 0 | 270 | 81.49 | 60.7 | 1.0 | |
| | Stage II | 23 | 0 | 250.0 | 77.61 | 57.1 | 1.0 | |
| | Stage III | 15 | 0 | 210.0 | 92.53 | 60.2 | 1.2 | |
| Stage IV | 1 | 20 | 20.0 | 20.00 | | 0.2 | | |
| | | | | | | trend p-value | 0.91 | |
| | | | | | | global p-value | 0.64 | |

Taula 23. Anàlisi estadístic dels nivells de VDR en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; *P-values* de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (*global p-value*) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

Per a que la VD sigui biològicament activa, ha de sofrir una sèrie de modificacions/hidroxilacions. Aquesta transformació es porta a terme en diferents passos i amb l'ajuda de diferents enzims, els anomenats metabòlits de la VD, que hem explicat a la introducció.

22. L'ENDOMETRI CANCERÓS PRESENTA NIVELLS MOLT SUPERIORS DE L'ENZIM CYP27A1 EN COMPARACIÓ AMB L'ENDOMETRI NORMAL.

La primera hidroxilació de la VD, en el seu camí per a convertir-se en una forma activa, és la hidroxilació per l'enzim mitocondrial CYP27A1 o 25-hidroxilasa en el fetge. Per aquesta raó vam voler avaluar l'expressió d'aquest enzim, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, en l'EN i en l'EC. En l'EN, l'expressió de CYP27A1 es localitzava

majoritàriament al citoplasma, però també, l'epiteli glandular presentava en algun cas una tinció nuclear lleu. L'EN en fase proliferativa va mostrar una lleu o gairebé absent tinció citoplasmàtica (valors en **blau**)(Taula 24), aquests nivells s'observaven doblats en la fase secretora. No obstant, aquestes diferències no eren significatives ($p=0.06245$)(Taula 24)(Figura 55.A). En l'EC, els nivells de CYP27A1 eren 11 cops superiors que en l'EN ($p=0.0000$)(valors en **verd**)(Taula 24)(Figura 55.B). Cal esmentar, en aquest apartat, que tot i ser un enzim mitocondrial, nosaltres l'hem observat, tot i que lleugerament, al nucli, segurament per algun problema en la tinció.

| | | n | min | Max | mean | SD | Fold-change | p-value |
|------------------------------------|---------------|-----|-------------|---------------|-------------|------|-------------|--------------------|
| Normal samples | All | 52 | 0.00 | 40.00 | 6.9 | 11.3 | | |
| | Proliferative | 13 | 0.00 | 40.00 | 3.9 | 11.2 | 1.0 | |
| | Secretory | 39 | 0.00 | 40.00 | 8.0 | 11.2 | 2.1 | 0.06 |
| Normal versus tumor samples | All | 185 | 0.00 | 190.00 | 56.7 | 51.2 | | |
| | Normal | 52 | 0.00 | 40.00 | 6.9 | 11.3 | 1.0 | |
| | Tumor | 133 | 0.00 | 190.00 | 76.1 | 47.5 | 11.0 | <0.00001 |

Taula 24. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP27A1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; P-values de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global p-value) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

L'EEC presentava un 30% més d'expressió, d'aquest enzim, si es comparava amb l'NEEC (valors en **taronja**)(Taula 25), però sense diferències significatives ($p=0.08$). De la mateixa manera, tampoc era significativa l'expressió dels nivells de CYP27A1 en l'EC quan es comparaven els diferents graus histològics (FIGO), la tinció era lleu, i els tumors de grau 3 van presentar els nivells més reduïts ($p=0.072$)(valors en **violeta**)(Taula 25).

Tampoc, hi va haver diferències significatives en la reducció dels nivells de CYP27A1, en els diferents estadis patològics, tot i això, val a dir, en l'estadi III del CE,

els nivells de CYP27A1 sí eren significativament inferiors ($p=0.003$)(valors en rosa)(Taula 25).

Cal remarcar, que en les mostres de CE l'expressió del VDR nuclear estava, significativament, correlacionada amb l'expressió de CYP27A1 ($p=0.0031$).

| <i>Tumor samples</i> | | n | min | Max | mean | SD | Fold-change | <i>p-value</i> |
|----------------------|--|-----|------|--------|-------|-------|-----------------------|----------------|
| All | | 133 | 0.00 | 190.00 | 76.1 | 47.5 | | |
| NEEC | | 21 | 0 | 160 | 59.3 | 47.7 | 1.0 | |
| EEC | | 111 | 0.00 | 190.00 | 79.7 | 46.9 | 1.3 | 0.08 |
| Grade 1 | | 36 | 0 | 190 | 84 | 53.1 | 1.0 | |
| Grade 2 | | 52 | 0 | 155 | 81 | 46.1 | 1.0 | 0.81 |
| Grade 3 | | 44 | 0 | 160 | 65 | 43.0 | 0.8 | 0.1 |
| | | | | | | | decreasing trend | 0.07 |
| | | | | | | | <i>p-value</i> | |
| Stage I | | 75 | 0 | 190 | 76.4 | 49.63 | 1.0 | |
| Stage II | | 23 | 5 | 170.00 | 89.3 | 45.50 | 1.2 | 0.27 |
| Stage III | | 13 | 5 | 103.00 | 39.5 | 35.67 | 0.4 | 0.03 |
| Stage IV | | 1 | 110 | 110.00 | 110.0 | - | 2.8 | - |
| | | | | | | | Trend | 0.19 |
| | | | | | | | <i>p-value</i> | |
| | | | | | | | global <i>p-value</i> | 0.02 |

Taula 25. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP27A1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; *P-values* de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global *p-value*) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

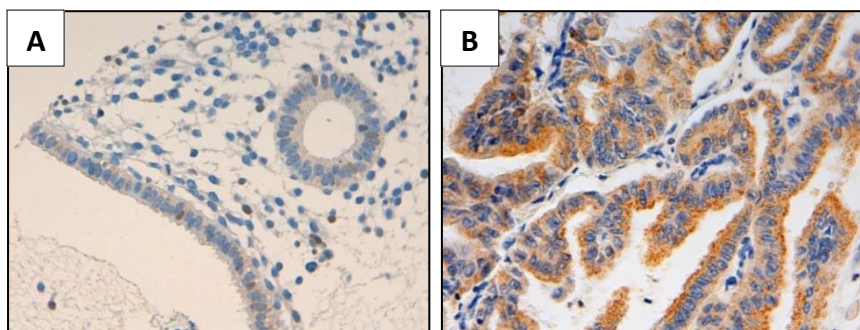


Figura 55. Anàlisi per immunohistoquímica de l'expressió de CYP27A1 en l'EN i l'EC. A) Expressió de CYP27A1 en l'EN en fase proliferativa amb tinció positiva als nuclis de l'estroma i a l'epiteli. B) Expressió citoplasmàtica i granular de CYP27A1 molt superior en l'EC.

23. L'ENDOMETRI CANCERÓS PRESENTA NIVELLS SUPERIORS DE L'ENZIM CYP2R1 EN COMPARACIÓ AMB L'ENDOMETRI NORMAL.

Apart del CYP27A1, l'enzim CYP2R1 també es responsable de la primera hidroxilació de la VD, són moltes les característiques que assenyalen la important funció d'aquest enzim mitocondrial en la hidroxilació de la VD. Per aquesta raó vam decidir estudiar l'expressió d'aquest enzim, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, en l'EN i en l'EC. En les glàndules de l'EN en fase proliferativa, l'expressió de CYP2R1 era citosòlica i reduïda sense tinció en l'estroma (valors en **blau**)(Taula 26), i es veia augmentada 4.3 vegades en les glàndules de l'endometri secretor, amb una tinció lleu en l'estroma ($p=0.001$)(valors en **blau**)(Taula 26).

Per contra, l'EC va mostrar una tinció de CYP2R1, citoplasmàtica, heterogènia i 1.29 vegades superior que en l'EN en qualsevol de les fases del cicle menstrual ($p=0.005$)(valors en **verd**)(Taula 26).

| | | n | min | Max | mean | SD | Fold-change | p-value |
|------------------------------------|-------------------------|-----|-----------|------------|--------------|------|-------------|--------------|
| Normal samples | All | 27 | 5 | 180 | 113.5 | 44.1 | | |
| | Proliferative Secretory | 4 | 5 | 60 | 30.0 | 23.5 | 1 | |
| | | 23 | 80 | 180 | 128.0 | 17.1 | 4.3 | 0.001 |
| Normal versus tumor samples | All | | 5 | 240 | 141.0 | 52.5 | | |
| | Normal | 27 | 5 | 180 | 113.5 | 44.1 | 1 | |
| | Tumor | 129 | 20 | 240 | 146.8 | 52.4 | 1.3 | 0.005 |

Taula 26. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP2R1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; P-values de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global p-value) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

Els anàlisis d'immunohistoquímica no van mostrar diferències estadísticament significatives en el contingut de CYP2R1 en l'EC, en relació amb el tipus histològic, grau FIGO o estadi patològic (valors en **violeta** i **rosa**)(Taula 27). La figura 56 mostra una distribució heterogènia de CYP2R1, amb una forta tinció d'aquest enzim en algunes

poques mostres de CEE (Figura 56.A) en comparació amb la poca tinció d'aquest mateix enzim en algunes mostres de NEEC (Figura 56.B).

Cal remarcar que vam observar una correlació positiva entre l'expressió de CYP2R1 i el VDR nuclear en l'EN ($p=0.004$), i en l'EC ($p=0.04$).

| Tumor samples | | n | min | Max | mean | SD | Fold-change | p-value |
|---------------|--|-----|-----|-------|--------|-------|------------------|---------|
| All | | 129 | 20 | 240 | 146.8 | 52.4 | | |
| NEEC | | 21 | 50 | 240 | 158.4 | 55.3 | 1 | |
| EEC | | 107 | 20 | 230 | 144.0 | 51.7 | 0.9 | 0.24 |
| Grade 1 | | 36 | 30 | 220 | 134.47 | 49.5 | 1 | |
| Grade 2 | | 48 | 20 | 220 | 147.06 | 53.6 | 1.1 | 0.22 |
| Grade 3 | | 44 | 50 | 240 | 155.26 | 52.5 | 1.2 | 0.08 |
| | | | | | | | Increasing trend | |
| | | | | | | | p-value | |
| | | | | | | | global p-value | 0.20 |
| Stage I | | 71 | 20 | 230 | 149.2 | 52.14 | 1 | |
| Stage II | | 23 | 30 | 207.5 | 130.4 | 51.40 | 0.9 | 0.10 |
| Stage III | | 13 | 50 | 240 | 144.6 | 63.52 | 1.0 | 0.89 |
| Stage IV | | 1 | 110 | 100 | 110 | - | - | |
| | | | | | | | trend p-value | 0.31 |
| | | | | | | | global p-value | 0.46 |

Taula 27. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP2R1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; P-values de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global p-value) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

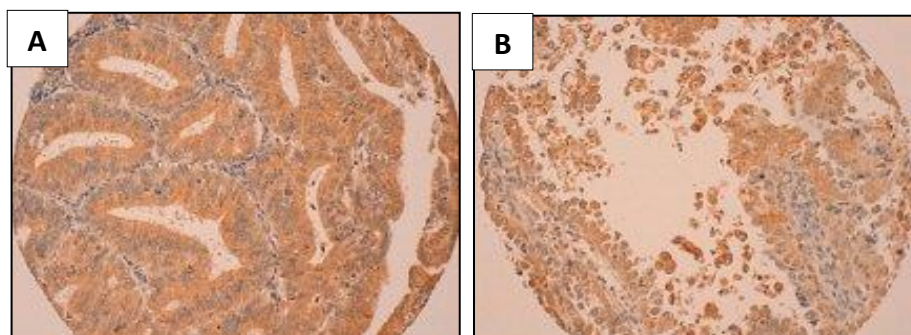


Figura 56. Anàlisi per immunohistoquímica de l'expressió de CYP2R1 en l'EN i l'EC. A) Expressió de CYP2R1 heterogènia i alta en l'EEC; B) Expressió de CYP2R1 heterogènia i baixa en NEEC.

24. L'ENDOMETRI CANCERÓS PRESENTA NIVELLS INFERIORS DE L'ENZIM CYP24A1 EN COMPARACIÓ AMB L'ENDOMETRI NORMAL.

Com ja hem explicat en la introducció, el balanç correcte de VD activa es regula tant a nivell de síntesi com de degradació. L'enzim responsable d'aquesta degradació és el CYP24A1. En condicions fisiològiques normals, el complex 1,25D-VDR indueix l'expressió de CYP24A1 per evitar la toxicitat de la VD a través de la degradació de la 1,25D circulant o el seu precursor 25(OH)D, quan els seus nivells superen els normals. Per aquesta raó vam decidir estudiar l'expressió d'aquest enzim, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, en l'EN i en l'EC.

D'acord amb aquests fets, vam poder observar que alts nivells de VDR, en les cèl·lules epitelials, de l'EN en fase secretora van coincidir amb alts nivells de CYP24A1 citosòlics (valors en **blau**)(Taula 28), comparats amb l'EN proliferatiu amb nivells reduïts d'VDR ($p=0.000063$)(Taula 28)(Figura 57.A). A més a més, en les mostres d'EN, l'expressió de CYP24A1 estava fortament relacionada amb l'expressió nuclear de VDR ($p=0.000000$), i sorprenentment, també amb nivells citosòlics de CYP27A1 ($p=0.006$) i CYP2R1 ($p=0.0005$). Aquestes associacions suggereixen un possible paper d'aquests enzims, CYP27A1 i CYP2R1, en l'activació del complex 1,25D/VDR de l'expressió del CYP4A1.

En l'EC, malgrat els augments significatius dels enzims productors de 25(OH)D, CYP27A1 i CYP2R1, l'expressió de CYP24A1 va ser significativament inferior comparat amb el NE ($p=0.01$)(valors en **verd**)(Taula 28). Com a enzim mitocondrial que és, CYP24A1 s'expressava en el citoplasma de les cèl·lules de CE, i el seu patró d'expressió era granular i heterogeni (Figura 57.B).

| | | n | min | max | mean | SD | Fold-change | p-value |
|------------------------------------|--------------------------------|-----|-----------|------------|--------------|------|-------------|----------------|
| Normal samples | All | 53 | 15 | 295 | 131.6 | 84.3 | | |
| | Proliferative Secretory | 14 | 15 | 220 | 64.3 | 49.3 | 1.00 | |
| | | 39 | 30 | 295 | 155.8 | 81.4 | 2.42 | 0.00006 |
| Normal versus tumor samples | All | 178 | 10 | 295 | 101.8 | 62.6 | | |
| | Normal | 53 | 15 | 295 | 131.6 | 84.3 | 1.00 | |
| | Tumor | 125 | 10 | 210 | 89.2 | 45.6 | 0.68 | 0.01 |

Taula 28. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP24A1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; *P-values* de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global *p-value*) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

L'augment de la CYP24A1 té un paper important en la progressió del tumor, no ho hem observat en els nostres casos, però en altres tipus de càncers és la causa de la iniciació i la proliferació tumoral. Sorprenentment, l'expressió de CYP24A1 era més alta, 1,4 cops més, en l'NEEC que en EEC ($p=0.008$)(valors en **taronja**)(Taula 29). L'anàlisi de l'expressió de CYP24A1 en els diferents graus FIGO, mostrava que els de grau 3 eren els que presentaven nivells més alts d'aquest enzim, comparat amb els de grau 2 i 1 ($p=0.0594$)(valors en **violeta**) (Taula 29). Finalment l'expressió de CYP24A1 no va mostrar diferències entre els graus histològics, però un altre cop, els estadis III i IV van mostrar nivells superiors de CYP24A1 (valors en **rosa**)(Taula 29). Cal remarcar, que a diferència dels resultats observats en l'EN, en aquest cas no vam trobar correlació entre CYP24A1 i VDR nuclear, o amb CYP24A1 i CYP27A1 o CYP2R1 en les mostres de CE, malgrat els nivells significativament elevats dels enzims productius de 25(OH)D.

| <i>Tumor samples</i> | | n | min | max | mean | SD | Fold-change | p-value |
|---------------------------------|--|-----|------------|------------|---------------|------|-------------|--------------|
| All | | 124 | 10 | 210 | 89.2 | 45.6 | | |
| NEEC | | 19 | 25 | 190 | 114.2 | 44.8 | 1.00 | |
| EEC | | 105 | 10 | 210 | 84.2 | 44.3 | 0.74 | 0.008 |
| Grade 1 | | 36 | 10 | 200 | 86.4 | 39.1 | 1.0 | |
| Grade 2 | | 47 | 15 | 180 | 80.0 | 45.7 | 0.9 | 0.42 |
| Grade 3 | | 41 | 10 | 210 | 101.0 | 48.8 | 1.3 | 0.059 |
| Increasing trend p-value | | | | | | | | 0.14 |
| Stage I | | 67 | 10 | 210 | 92.04 | 46.7 | 1.0 | |
| Stage II | | 22 | 15 | 170 | 79.77 | 41.5 | 0.9 | 0.25 |
| Stage III | | 14 | 25 | 190 | 105.00 | 50.5 | 0.7 | 0.17 |
| Stage IV | | 1 | 120 | 120 | 120.00 | | | |
| Increasing trend p-value | | | | | | | | 0.56 |

Taula 29. Anàlisi estadístic dels nivells de CYP24A1 en EN i CE. (n)=Nombre de pacients; min i max= Indiquen el valors mínims i màxims; SD= Desviació estàndard; Fold-change= Denota el canvi en l'expressió del biomarcador en relació amb el valor mitjà de la primera categoria; *P-values* de Mann-Whitney, Kruskal Wallis (global *p-value*) o proves de tendència. Els valors ressaltats són els estadísticament significatius.

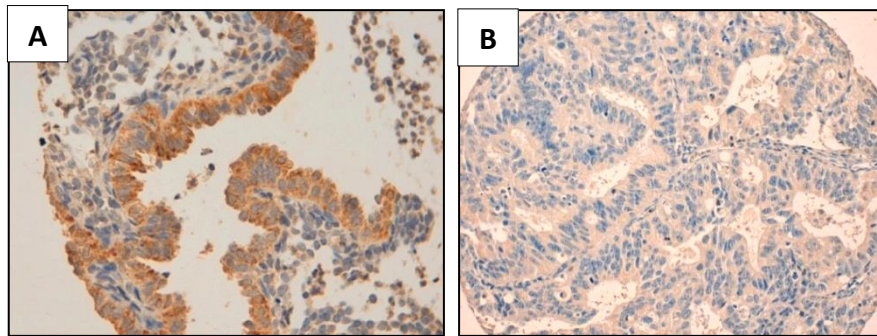


Figura 57. Anàlisi per immunohistoquímica de l'expressió de CYP24A1 en l'EN i l'EC. A) Forta expressió citoplasmàtica de CYP24A1 en l'EN en fase secretora. B) Baixa expressió citosòlica de CYP24A1 en l'EEC.

Val a dir, que en aquest punt estaríem demostrant, per primera vegada, que l'endometri es comporta de manera similar als altres teixits, essent capaç de metabolitzar la VD des del principi.

25. EL CARCINOMA D'ENDOMETRI PRESENTA NIVELLS SUPERIOR DE Ki67 EN COMPARACIÓ AMB L'ENDOMETRI NORMAL. RELACIÓ AMB ELS METABOLITS DE LA VITAMINA D.

La proliferació cel·lular, mesurada per la tinció nuclear del marcador de proliferació Ki67, era superior en les mostres de CE que en les d'NE ($p=0.0005$). Cal remarcar que en l'EN, els nivells de VDR estaven inversament relacionats amb els de Ki67 ($p=0.0001$). En l'EC, malgrat l'augment significatiu del 30% en l'expressió de CYP2R1, no vam observar correlació inversa amb Ki67, però, CYP27A1 sí que estava inversament relacionat amb Ki67 ($p=0.02$).

26. EL TRACTAMENT AMB VITAMINA D DISMINUEIX LA PROLIFERACIÓ DE LES LÍNIES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI (IK, HEC-1A I RL.95).

A continuació és va analitzar el paper de l'augment dels enzims CYP27A1 i CYP2R1, en les accions antiproliferatives de VDR, per la producció local de 25(OH)D, en les línies de CE. Estudis a diferents dosis i diferents temps de les línies de CE: IK, HEC-1A i RL.95/2 tractades amb VD₃ (cholecalciferol) es van realitzar per tal d'examinar els efectes antiproliferatius de la bioactivació local de la VD₃ a 25(OH)D. Les cèl·lules van ser tractades amb concentracions de VD₃ (0-10 µmol/L) durant 24, 48 o 72 hores (Figura 58.A). Els resultats dels anàlisis de les MTT realitzades van mostrar que les tres línies de CE reduïen la viabilitat en resposta al tractament amb VD₃, depenent de la dosi i del temps. La reducció màxima de la viabilitat és va observar a les 72 hores de tractament, i en la concentració de 10 µM de VD₃, la viabilitat de les línies de CE va ser de: 62% en les IK, 52% en les RL.95/2 i 55% en les HEC-1A. La manca d'una reducció significativa en les cèl·lules viables després d'una exposició de 24 hores a 10 µM de VD₃, descarta que la toxicitat de la VD és la responsable de la baixada en la viabilitat cel·lular de les línies de CE. Els valors significativament estadístics són (* p<0.05; ** p<0.01).

A

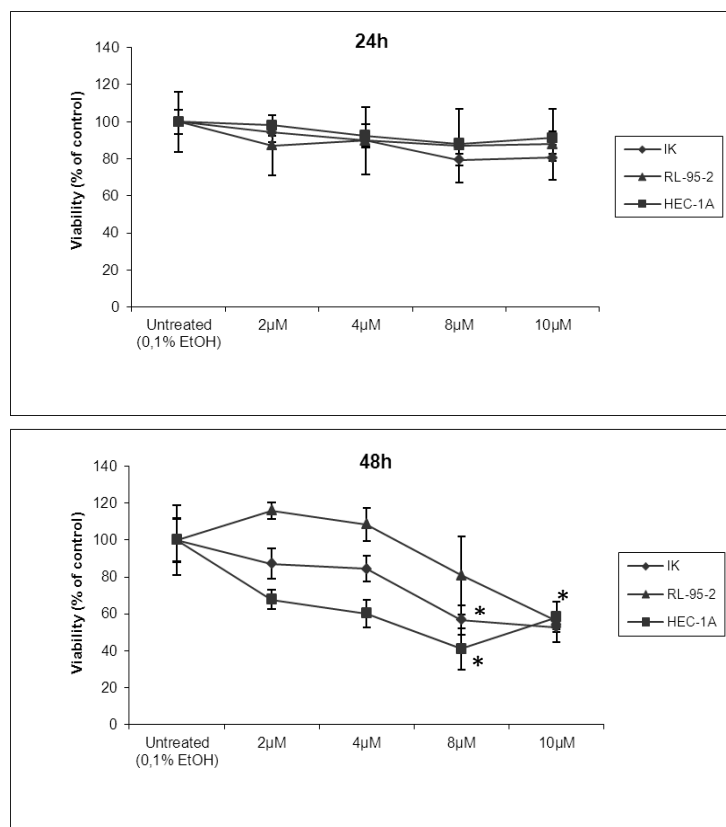
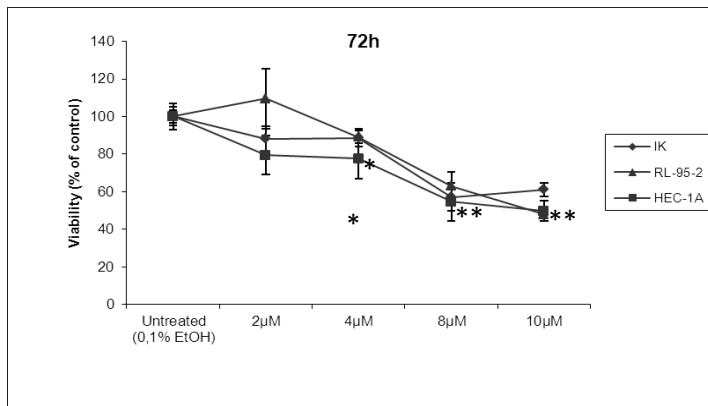


Figura 58.A.

Tractament amb vitamina D de les línies de CE. Les línies de CE es van tractades a dosis creixents de VD₃ (0-10 µmol/L) a diferents temps 24, 48 i 72 hores, i es van realitzar assajos d'MTT.



En la figura 58.B, observem que el tractament amb VD_3 (0-10 $\mu\text{mol/L}$) durant 48 hores va causar una disminució de manera dosi-depenent en la capacitat de formació de colònies en les línies de CE, les tres línies de CE van mostrar valors significativament estadístics a dosis de 2-10 μM (* $p < 0.05$). Les IK van ser les que van mostrar millor resposta al tractament amb 10 μM de VD_3 .

B

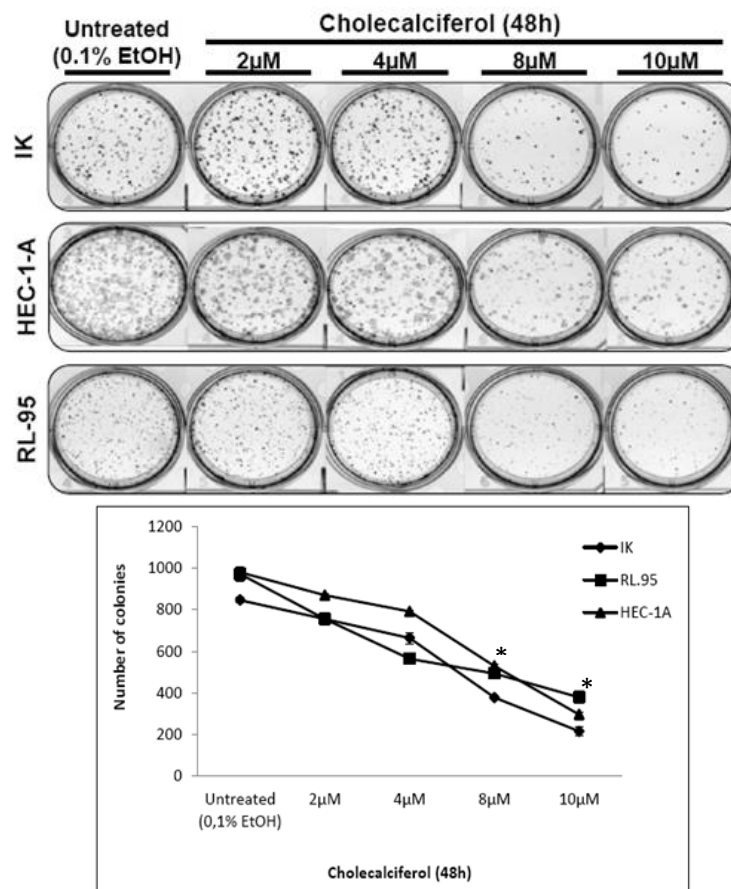


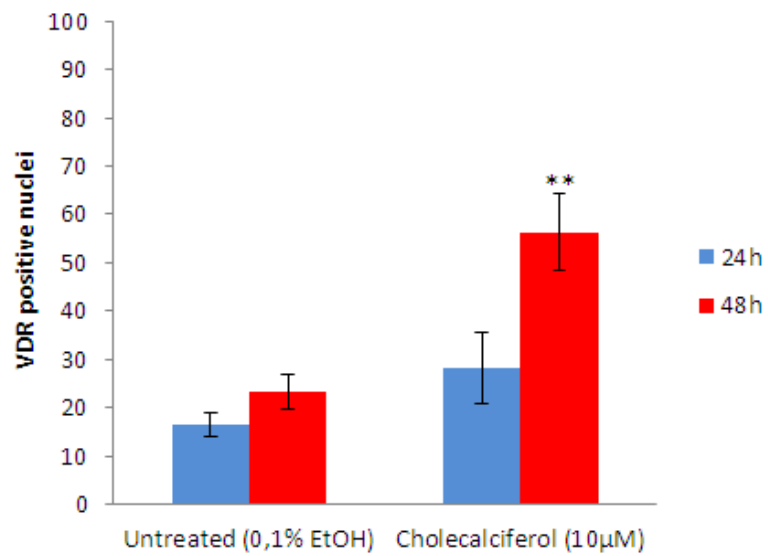
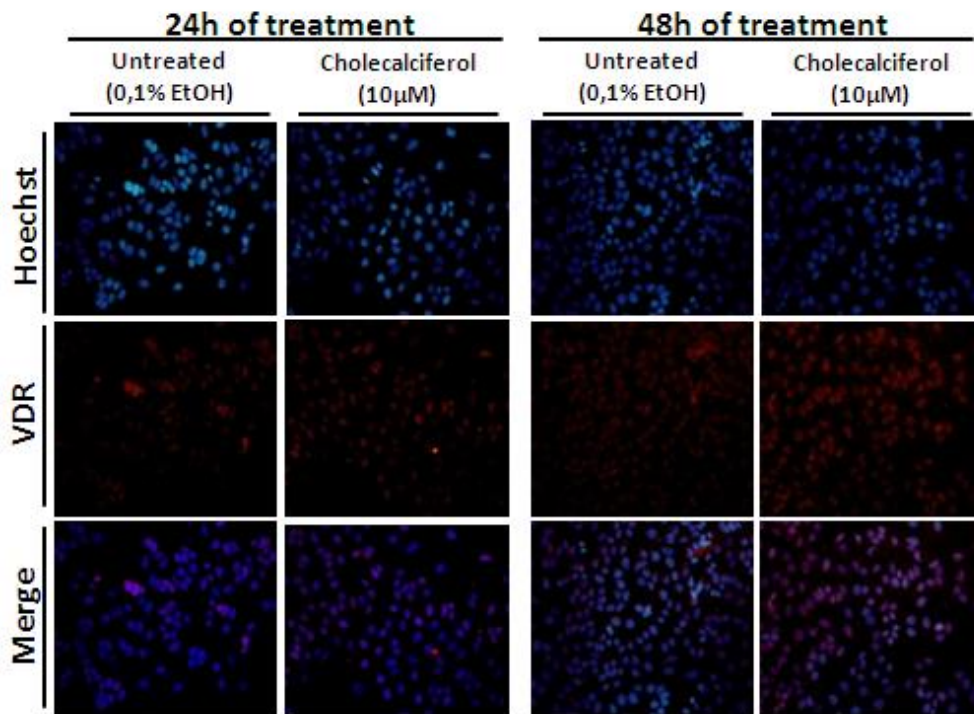
Figura 58.B. Tractament amb vitamina D de les línies de CE. Assaig clonogènic de les línies de CE tractades amb a dosis creixents de VD_3 (2-10 μM) durant 48 hores, i recompte del nombre de colònies.

La demostració de l'existència de diferents variants del gen CYP27B1, per *splicing*, en les cèl·lules IK ²⁴⁶ que poden posar en perill la producció de 1,25D a partir de 25(OH)D a través de l'enzim CYP27B1, ens va portar a seleccionar les IK per examinar directament si la conversió de VD a 25(OH)D es produeix i si, per tant, contribueix en la translocació al nucli de VDR. Per tant, vam utilitzar les IK per examinar directament si la conversió de la VD₃ a 25(OH)D₃ contribuïa a l'efecte antitumoral de la VD₃, provocant tant la supressió del creixement com la reducció de la capacitat clonogènica a través de l'activació del VDR. En primer lloc, vam mesurar la producció de 25(OH)D per els enzims CYP27A1 i/o CYP2R1, en les IK, a les 0, 12, 24 i 48 hores després de ser tractades amb VD₃ 10µM. Mentre que no vam poder detectar producció de 25(OH)D₃ ni a les 12 ni a les 24 hores després del tractament, una mitja de 1.24 ng de 25(OH)D va ser sintetitzat a partir de 30 µg de VD₃ per 7 milions de cèl·lules (IK) en 48 hores. Encara que les IK van mostrar taxes de conversió de V a 25(OH)D molt baixes, semblava que era suficient per la translocació del VDR al nucli, un procés que requereix l'activació de VDR ja sigui unint-se al seu lligant o bé al 25(OH)D directament o prèvia la seva conversió a 1,25D.

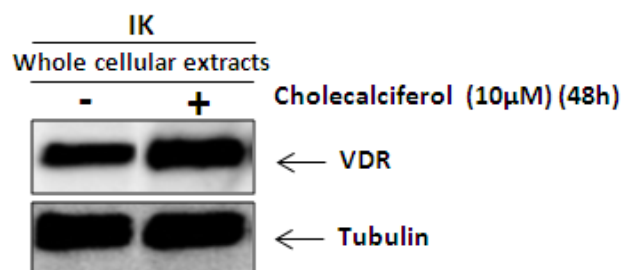
27. ACTIVACIÓ DE VDR PER LA PRODUCCIÓ LOCAL DE 25(OH)D EN LA LÍNIA CEL·LULAR DE CARCINOMA D'ENDOMETRI (IK).

Per tal de detectar l'activació de VDR com a conseqüència de la producció local de 25(OH)D, en les cèl·lules tractades amb VD₃ vam realitzar una immunofluorescència un cop acabat el tractament. La figura 59.A mostra un augment significatiu en el nombre de nuclis positius per VDR en les IK, exposades a VD₃ durant 24 i 48 hores (p=0.0002). L'augment dels nivells de VDR després del tractament amb 10 µM VD₃ va ser corroborat mitjançant un Western Blot (Figura 59.B), on s'observa nivells superiors de VDR en els extractes totals. La translocació al nucli del VDR va ser confirmada per l'anàlisi del contingut nuclear i citosòlic a través d'un Western Blot (Figura 59.C). Aquest temps necessari per la màxima translocació del VDR al nucli, coincidia amb la detecció de 25(OH)D solament després de 48 hores de tractament amb VD₃.

A



B



C

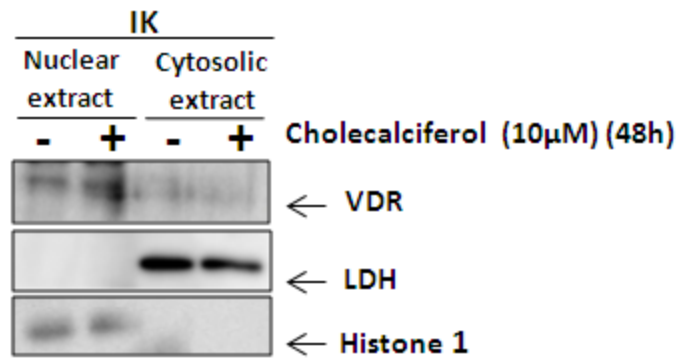


Figura 59. Detecció del VDR després del tractament amb VD₃. A) Immunofluorescència marcant VDR després del tractament amb VD₃ durant 24 i 48 hores (20X). I quantificació del nombre de cèl·lules positives pel marcatge amb VDR. B) Anàlisi Western Blot de lisats totals de proteïna per detectar VDR en les IK. C) Anàlisi Western Blot de lisats citosòlics i nuclears de proteïna per detectar la translocació de VDR en les IK.



Discussió

DISCUSSIÓ

1. LA COMBINACIÓ DE VORINOSTAT AMB LA INHIBICIÓ DE LA CASPASA 8 INDUEIX UN FORT EFECTE ANTITUMORAL EN LES LÍNIES DE CARCINOMA D'ENDOMETRI.

A la primera part d'aquest treball de tesis doctoral ens hem centrat amb l'estudi del paper de l'HDACi, Vorinostat, en el CE. L'ús d' HDACis com a agents antitumorals s'ha estudiat en nombrosos càncers ^{244, 247-251}, partint de la hipòtesis de que podia frenar el creixement tumoral. Els HDACis estan relacionats amb rutes de regulació epigenètica, és a dir modulen l'expressió de proteïnes histones i no-histones ^{155, 252}, alterant d'aquesta manera l'expressió d'una gran quantitat de gens relacionats amb la proliferació cel·lular, diferenciació, apoptosi (activació de la via extrínseca i intrínseca), aturada de cicle de la cèl·lula o directament alterant el microambient del tumor ^{253, 254}. En aquest estudi ens hem centrat amb l' HDACi, Vorinostat. Aquest es va començar a utilitzar en càncers hematològics, de fet, la "Food and Drug Administration (FDA)" va concedir la primera aprovació per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T (Octubre, 2010), actualment les investigacions es realitzen tant amb tumors sòlids com hematològics.

El nostre estudi demostra que el tractament amb Vorinostat induïx mort apoptòtica, disminució del creixement i reducció de la capacitat clonogènica, en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri, aquests fets estan d'acord amb altres treballs que indiquen que el tractament amb Vorinostat o altres inhibidors de les histones deacetilases provoquen la parada de cicle cel·lular ²⁵⁵, apoptosi ^{250, 256} o inhibició de la invasió i migració ²⁵⁷. Apart dels resultats esmentats anteriorment, i de forma interessant, cal afegir que el nostre treball també demostra una important reducció del creixement tumoral en xenografts de cèl·lules de CE.

A partir d'aquí vam voler continuar i centrar l'estudi en poder determinar els mecanismes moleculars involucrats en la inducció de mort apoptòtica provocada pel tractament amb Vorinostat. Després de diferents experiments vam poder afirmar que el Vorinostat causava l'activació tant de la via extrínseca com de la intrínseca de l'apoptosi, permetent, per tant, el processament de les caspases-3, -8, -9. L'activació de la via intrínseca de l'apoptosi era d'esperar, doncs són molts els estudis que

assenyalen el Vorinostat com a responsable directe de la inducció de dany al DNA ²⁵⁸⁻²⁶⁰. És àmpliament conegut que el dany al DNA es responsable de l'activació de la via intrínseca a través del processament de la caspasa-9 ²⁶¹, no de la 8 ²⁶². Per altra banda, l'activació de la via extrínseca de l'apoptosi i el seu paper en la mort cel·lular induïda pel Vorinostat en les nostres línies de carcinoma d'endometri, no estava tant clara, tot i que alguns estudis en altres tipus de càncers també l'assenyalen com a via inductora de mort apoptòtica ^{253, 263}.

Pel que fa als efectes del Vorinostat sobre la via extrínseca cal esmentar que el tractament amb Vorinostat causava una important reducció de la proteïna FLIP, competidor amb caspasa-8 per la seva unió a FADD. Aquest fet ens va suggerir que l'activació de la caspasa-8 observada era gràcies a la baixada dels nivells de FLIP. Aquest fet no era d'estranyar, doncs, el nostre resultat es corrobora amb altres estudis que indiquen la necessitat de la reducció en l'expressió dels nivells de FLIP per tal que la caspasa-8 es processa fins la seva forma activa ^{256, 264}. Com per exemple, el treball de Dolcet X. i col·laboradors ²³⁴ que va suggerir per primer cop el paper important de Flip en la regulació de l'apoptosi induïda per una citoquina pro-apoptòtica anomenada TRAIL (que quan s'uneix a uns certs receptors de mort causa apoptosi). L'estudi mostra que les línies de CE, KLE i IK, no entren en apoptosi després de ser tractades amb TRAIL, però, quan es tracten amb Actinomycin D (inhibidor de la transcripció), s'observa una important reducció en la viabilitat cel·lular, acompanyada d'una activació de la caspasa-8; a més a més aquests fets coincideixen amb una baixada en els nivells de Flip. Per altra banda, diversos estudis assenyalen que la reducció de FLIP causada pel tractament amb Vorinostat sol o amb combinació amb altres fàrmacs sensibilitza les cèl·lules tumorals a la inducció d'apoptosi per TRAIL ²⁶⁴⁻²⁶⁸. Més endavant, en un estudi del mateix grup, Llobet D. ²⁶⁹ va demostrar que la cinasa CK2 (Casein Kinase 2) era la responsable de la modulació/control de Flip, ja que la seva inhibició sensibilitzava les cèl·lules de CE a l'apoptosi induïda per TRAIL a través de la reducció dels nivells de Flip.

Sorprenentment, i havent observat que la pro-forma L de FLIP està reduïda després del tractament amb Vorinostat, la sobreexpressió de FLIP-L no va desencadenar en la inhibició de l'apoptosi, tal i com seria d'esperar. Aquest resultat ens va portar a la conclusió de que la via extrínseca de l'apoptosi no era la responsable

de la mort de les línies de carcinoma d'endometri un cop eren tractades amb Vorinostat.

Però, per poder demostrar que l'activació d'aquesta via era prescindible en la inducció de mort apoptòtica, vam decidir inhibir l'expressió de la caspasa-8. Estudis previs del nostre grup^{236, 269} han demostrat que la reducció en els nivells de la caspasa-8 inhibia la mort apoptòtica causada per receptors de mort en les línies de carcinoma d'endometri. Per tant vam pensar que si l'apoptosi observada pel tractament amb Vorinostat estava regulada solament per l'activació de la via extrínseca, la disminució en els nivells de les proteïnes d'aquesta via, com la caspasa-8 bloquejaria la mort. Per sorpresa nostra, la inhibició de l'expressió de la caspasa-8 va augmentar de manera significativa la mort induïda pel Vorinostat. Aquests resultats suggereixen que la caspasa-8 té un paper protector en la mort causada pel tractament amb Vorinostat. Clàssicament, les alteracions que condueixen a la pèrdua de l'activitat de la caspasa-8 han estat considerats com un mecanisme de resistència a l'apoptosi als fàrmacs quimioterapèutics^{270, 271}.

No obstant això, els nostres estudis demostren que la caspasa-8 pot ser una arma de doble tall. D'una banda, la inhibició de la caspasa-8 deteriora la senyalització d'apoptosi a través de la via extrínseca. Aquests bloqueig en la seva expressió resulta en una resistència a l'apoptosi, induïda per receptors de mort, una característica de malignitat. D'altra banda, la inhibició de la caspasa-8 augmenta l'apoptosi induïda pel Vorinostat, el que indica que la inhibició de la caspasa-8 pot ser eficaç en combinació amb Vorinostat. Els nostres resultats recolzen el paper protector de la caspasa-8 en l'apoptosi desencadenada pel tractament amb Vorinostat. Aquesta funció de protecció ha estat demostrada en evidències *in vitro* i *in vivo*^{272, 273}. Ratolins *knock-out* per proteïnes relacionades amb l'apoptosi, com caspasa-9, els provoca efectes relacionats amb un excés de cèl·lules^{274, 275}. Per contra, els ratolins *knock-out* per caspasa-8 són letals embrionaris per una fallada de la vascularització del sac vitel·lí i d'hematopoesis²⁷⁶. Aquest fenotip ens condueix a la hipòtesis de que aquestes proteïnes tenen papers en les funcions cel·lulars més enllà de l'apoptosi.

Són molts els estudis que han demostrat altres funcions cel·lulars de la caspasa-8, aquests inclouen; la regulació del cicle cel·lular²⁷⁷, activació d'NF- κ B²⁷⁸, la migració

cel·lular i la metàstasi ^{279, 280}. A això, vam observar que la inhibició de la caspasa-8 promogué una reducció significativa de la capacitat clonogènica *in vitro* i del creixement dels xenografts *in vivo*, inclús en absència de Vorinostat. Aquests resultats reforcen la hipòtesis que la caspasa-8 té funcions de pro-supervivència en les cèl·lules de CE. També vam demostrar que l'apoptosi induïda pel Vorinostat o la combinació de Vorinostat i inhibició de la caspasa-8 es veia afectada per la sobreexpressió de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-XL. Aquests resultats indiquen que aquest increment en la mort apoptòtica és, en última instància, promoguda per la via intrínseca o mitocondrial de l'apoptosi.

Cal esmentar que en altres tipus cel·lulars, com els limfòcits, una de les vies de senyalització regulada per la caspasa-8 és la via d'NF- κ B. Degut a la importància de la via de senyalització NF- κ B en la regulació de la proliferació del cicle cel·lular i la supervivència es va avaluar l'activitat d'NF- κ B en les línies cel·lulars de CE en les que s'havia inhibit la caspasa-8. No obstant això, la inhibició de la caspasa-8 no afectava l'activitat d'NF- κ B. A més a més, la sobreexpressió de la subunitat d'NF- κ B, p65, no va poder restablir la capacitat clonogènica de les línies de CE. Aquests resultats suggereixen que la reducció de la viabilitat cel·lular de les línies de CE amb l'expressió de la caspasa-8 inhibida era independent de l'activitat d'NF- κ B.

Finalment, la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 va causar una reducció significativa del volum del xenografts. Val la pena esmentar que, la combinació d'aquests dos tractaments gairebé va provocar una completa inhibició del creixement dels tumors de les línies de CE *in vivo*. Per tant, creiem que la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 podria ser una nova estratègia terapèutica per al tractament del càncer d'endometri.

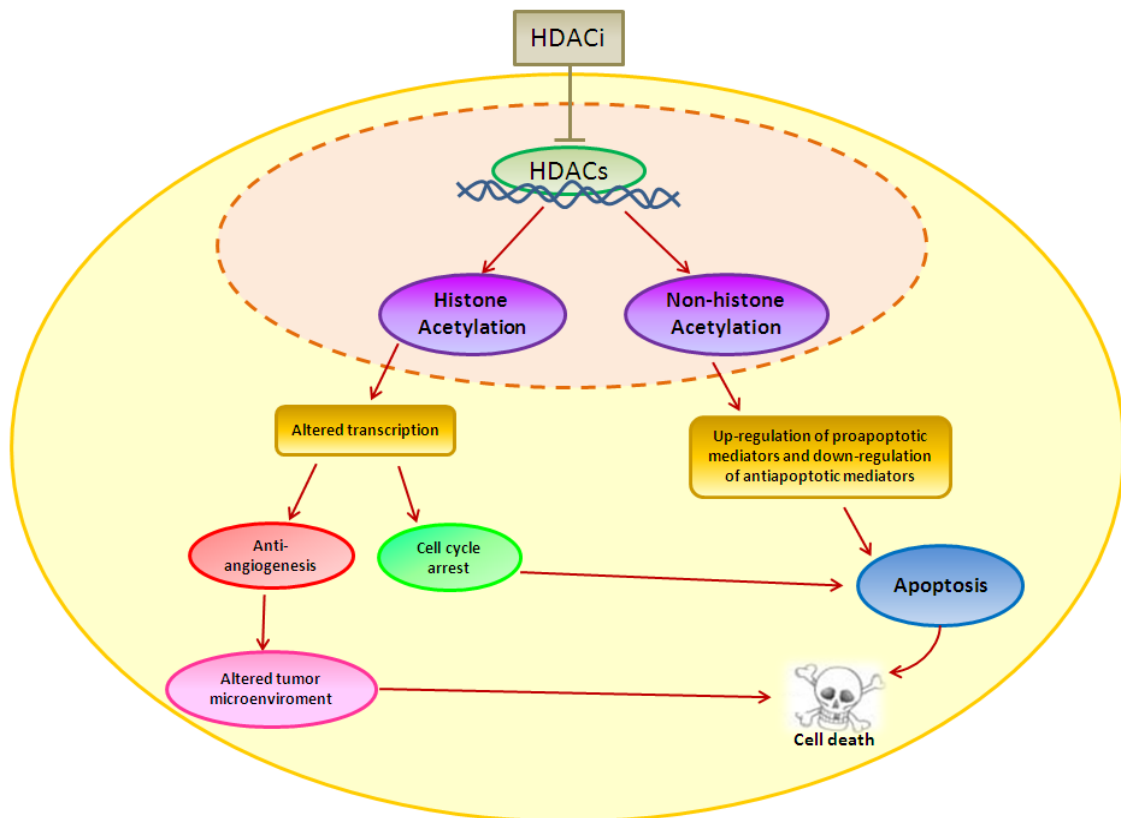


Figura 60. Esquema resum dels efectes dels HDACis, com el Vorinostat, en les cèl·lules de CE.

2. ELS ANTIOXIDANTS BLOQUEGEN ELS EFECTES ANTITUMORALS DEL VORINOSTAT, PERÒ NO ELS EFECTES ANTINEOPLÀSICS DEGUTS A LA COMBINACIÓ DE VORINOSTAT I LA INHIBICIÓ DE LA CASPASA-8, EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

A continuació, en la segona part d'aquest treball vam seguir investigant el mecanisme molecular subjacent a l'activitat antitumoral dels HDACis, com el Vorinostat, en el CE. Com ja hem comentat a la introducció, anomalies en la regulació genètica dictada per certes modificacions epigenètiques estan considerades, actualment, com a promotores del càncer ^{281, 282}. Anys enrere, la principal raó d'emprar els inhibidors de les HDACs com a agents quimioterapèutics, es basava en l'observació de que molts tipus de càncers humans presentaven problemes de regulació de mecanismes epigenètics. En general, aquest balanç en l'acetilació de les histones condueix a canvis en l'estructura de la cromatina i per tant a una desregulació de gens involucrats en el control de la proliferació, progressió del cicle cel·lular, diferenciació i apoptosi.

No obstant això, està àmpliament descrit que les HDACs no regulen solament l'acetilació de les proteïnes histones, sinó que, també regula l'acetilació d'altres proteïnes citosòliques o nuclears, no-histones, que a la vegada regulen nombrosos processos cel·lulars ²⁸³; com per exemple proteïnes involucrades en la reparació de l'ADN (Ku70, Ku86, Rad50); l'hiperacetilació d'aquestes proteïnes impedeix la seva unió als llocs de doble trencament de la cadena d'ADN i per tant la seva reparació a través del NHEJ (**N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining) o de HR (**H**omologous **R**ecombination) ²⁸⁴.

Durant els últims anys, molts estudis remarquen que l'activitat antitumoral dels HDACis va més enllà de la regulació epigenètica. Són molts els mecanismes moleculars proposats com a mediadors dels efectes antitumorals dels HDACis, alguns són la producció de ROS i el dany al DNA ²⁴³. Malgrat l'origen dels ROS està encara per aclarir, els processos inflamatoris i alteracions en la senyalització d'antioxidants semblen ser, de moment l'explicació més lògica. Tot i això, la generació de ROS és una explicació, almeny en part, per la font de dany a l'ADN observat amb el tractament amb HDACi.

L'augment de la mort apoptòtica depenent de caspases, la producció de ROS i el dany mitocondrial són fets que s'observen conjuntament en cèl·lules tractades amb agents antitumorals. L'estudi de Ling Y.²⁸⁵ indica que la producció de ROS, com a resultat d'un procés d'estrès oxidatiu cel·lular, és el punt crític en la iniciació de l'apoptosi induïda per Bortezomib (inhibidor del proteasoma) a través de la disrupció de la membrana mitocondrial i la sortida del citocrom C del mitocondri, també assenjala que aquesta sortida de citocrom C es veu inhibida amb la sobreexpressió de la proteïna pro-apoptòtica Bcl-2, però, per contra la sobreexpressió de Bax (també pro-apoptòtica) facilita la sortida del citocrom C promovent la generació de ROS. Els estudis de²⁸⁵⁻²⁸⁷ assenyalen que l'acumulació de ROS dins la cèl·lula normalment promou la mort per apoptosi. Els nostres resultats demostren que les línies de CE mostren un augment significatiu de la producció de ROS degut al tractament amb Vorinostat.

Els antioxidants com ara N-acetilcisteïna (Nac) s'han utilitzat com a eines per a investigar el paper dels ROS en nombrosos processos biològics i patològics. Nac inhibeix l'activació de c-jun, p38 MAP (són proteïnes que s'activen per mitògens i que induïrien mort en situació d'estrès oxidatiu). Nac també pot prevenir l'apoptosi, promoure la supervivència cel·lular i modificar directament l'activitat de diferents proteïnes per la reducció de la seva activitat. Malgrat la seva manca d'especificitat, la capacitat de modificar l'ADN i múltiples maneres d'acció molecular, Nac té valor terapèutic per a la reducció de la inflamació, fibrosi i invasió,²⁸⁸.

Malgrat s'ha assumit que els HDACis indueixen la producció de ROS en diferents tipus cel·lulars, els efectes deguts a l'addició d'antioxidants encara estan per aclarir. Alguns estudis com el de Yu H. i col·laboradors²⁸⁹ assenyalen que la inhibició de la resposta dels antioxidants sensibilitza una línia resistent de leucèmia, als inhibidors de les HDACs. A més a més, altres estudis demostren que els antioxidants deterioren els efectes citotòxics dels HDACis en les cèl·lules de leucèmia mieloide aguda^{290, 291}, o de còlon²⁹². Per contra el grup de Basu H.S.²⁹³ demostra que l'addició d'antioxidants augmenta els efectes antitumorals dels HDACis en les cèl·lules de càncer de pròstata i el grup de Nihal M²⁹⁴ ho assenjala en melanoma. En tot això, val a dir que, el paper dels antioxidants en la prevenció del càncer i el tractament del càncer segueix sent objecte de debat. La bibliografia mostra doncs, per una banda nombroses evidències

que els antioxidants tenen un paper protector envers el càncer, i, per altra banda que els antioxidants poden modificar, inclús deteriorar els efectes dels agents quimioterapèutics emprats per el tractament d'algun tipus de càncers.

Els nostres resultats *in vitro* i *in vivo* demostren que la reducció en els nivells de ROS per l'efecte dels antioxidants esta associada en una reducció de l'activitat antitumoral del Vorinostat, això recolza el paper important de la producció de ROS en la inducció dels efectes citotòxics del Vorinostat en les cèl·lules de CE.

En el nostre estudi hem demostrat que la producció de ROS està relacionada amb un augment en la fosforilació de la histona H2AX. Aquesta histona es fosforila a la serina 139 per la proteïna quinasa ATM en resposta a dany al DNA induint trencaments en la doble cadena d'ADN, aquest fet és un dels esdeveniments més primerencs en la senyalització del dany i la reparació del ADN ²⁹⁵. El dany del DNA induït pel tractament amb Vorinostat pot provenir de dues fonts; per una banda pot ser causada per la producció intracel·lular de ROS o, per altra banda, causat de forma independent mitjançant la modificació de l'activitat de reparació de l'ADN i factors de remodelació de la cromatina ²⁴³; en l'estudi de Rosato R. ²⁸⁴ assenyala que el tractament amb LAQ-824, un HDACis, indueix una ràpida producció de ROS a les 3h de tractament, acompanyat d'una fosforilació de la H2AX que persisteix a les 48h de tractament, ja que en aquest moment es produeix una inhibició de les proteïnes de reparació del ADN, com Ku86 i Rad50, una acetilació de Ku70, disminueix l'activitat d'unió al DNA de Ku70 i Ku86 i també s'observa una disminució dels gens de reparació del ADN, *BRCA1* i *RAD51*.

Com en l'estudi realitzat en el nostre grup hem observat que la fosforilació de la histona H2AX causada pel tractament amb Vorinostat es redueix pel tractament amb antioxidants, és probable que la fosforilació sigui, almenys en part, causada pel dany al DNA degut a la producció de ROS induït pel tractament amb Vorinostat.

Com hem esmentat anteriorment, els nostres resultats previs van demostrar que la teràpia combinatòria amb Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 va tenir efectes additius antitumorals en les línies de CE *in vitro* i *in vivo*. Per tant, vam voler estudiar el paper de ROS en tal efecte. Curiosament el tractament amb antioxidants no va poder bloquejar aquesta important reducció en el creixement tumoral degut a la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8. Aquests resultats suggereixen que la

combinació d'aquests tractaments activa els mecanismes alternatius d'inhibició de creixement tumoral que són independents de la producció de ROS. Creiem que el fet que la combinació del Vorinostat i la inhibició de la caspasa-8 mostri una reducció important en l'activitat tumoral independent de l'estat d'estrès oxidatiu, augmenta el seu valor com a possible tractament per al càncer d'endometri.

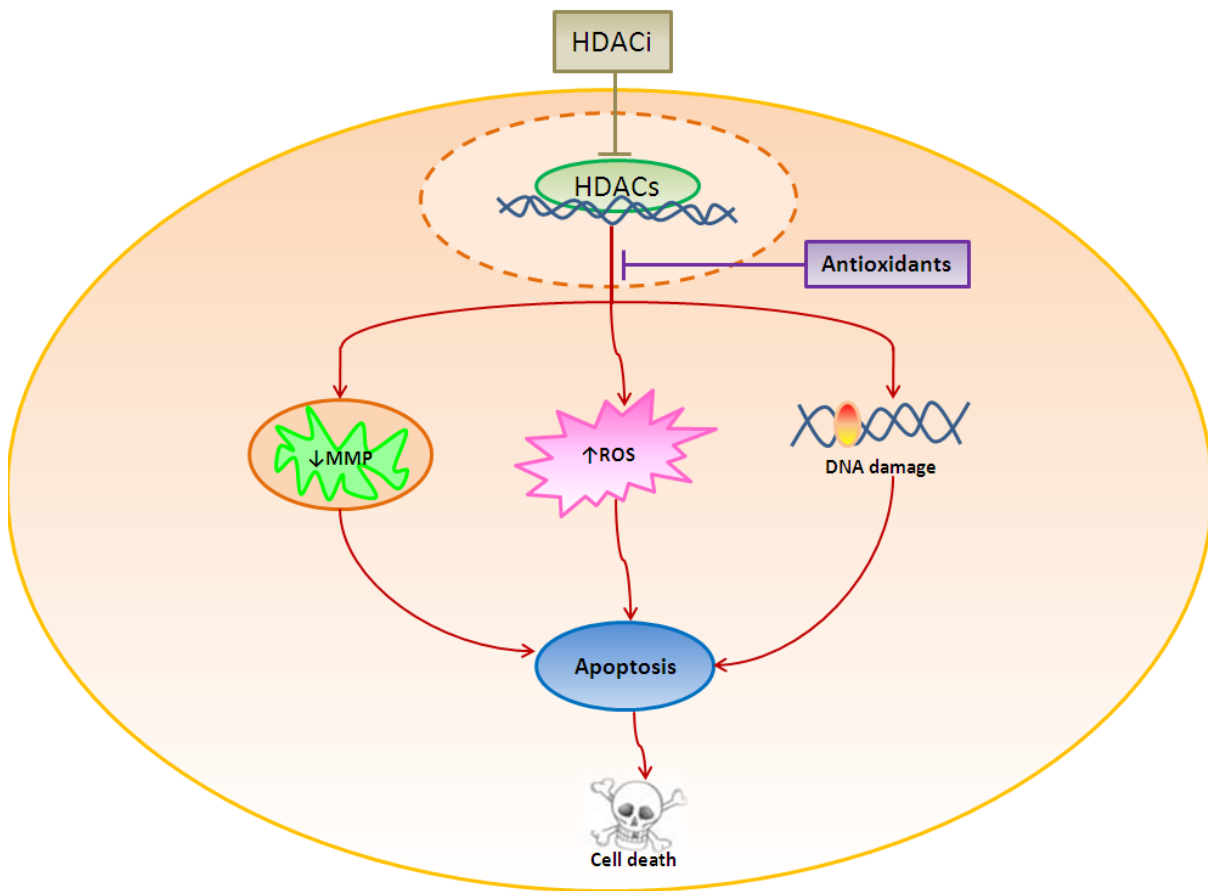


Figura 61. Esquema resum del mecanisme d'inducció de mort del Vorinostat en les cèl·lules de CE.

3. EFECTES DE LA RADIOTERÀPIA EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

En aquesta tercera part de la tesi doctoral s'ha volgut aprofundir en la resposta de les nostres línies de CE al tractament amb radioteràpia. El tractament del CE depèn de varis factors; estadi del tumor, edat de la pacient i profunditat en la invasió del miometri^{119, 296, 297}. Com s'ha explicat en la introducció, hi ha diferents possibilitats terapèutiques en el tractament del CE: la cirurgia, radioteràpia, quimioteràpia i la teràpia hormonal, en alguns casos, una combinació d'elles acaba sent la millor opció^{120, 121, 298}. La radioteràpia s'utilitza després de la cirurgia, generalment en estadis II i III, i en pacients en que les característiques del tumor prediuen un alt risc de recidiva local i/o mal pronòstic. Tot i que la radioteràpia s'utilitza en la clínica, en el tractament del CE, actualment, es qüestiona la seva eficàcia. De fet, els estudis de Creutzberg²⁹⁹ i Keys³⁰⁰, van demostrar que el tractament amb radioteràpia millora el control local, però no augmenta, significativament, la supervivència en les pacients amb CE confinat en l'úter.

El principal problema en aquest tipus de tractament és l'aparició de la radioresistència³⁰¹; la supervivència de les cèl·lules tumorals un cop irradiades pot provocar mecanismes de senyalització que resulten en la selecció clonal (cèl·lules canceroses que sobreviuen a la radiació ionitzant, i, s'adapten a l'entorn per desenvolupar un clon). Aquesta radioresistència es tradueix en la proliferació/creixement de les cèl·lules tumorals, poden provocar una reparació del tumor en el lloc de tractament, i, si existeix una connexió angiogènica entre les cèl·lules tumorals supervivents i l'endoteli circumdant augmentaria encara més el creixement del tumor i, per tant, promouria el risc de metàstasis a distància (expansió clonal)^{302, 303}. Per tant, és necessari comprendre els mecanismes alterats després de l'exposició a la radiació, per intentar inhibir el creixement del tumor.

Són varis els factors que poden influir en la radiosensibilitat cel·lular, el tipus cel·lular³⁰⁴; els tumors amb origen limfoide o de cèl·lules germinals són més sensibles que els sòlids o d'origen epitelial³⁰⁵, mutacions en p53³⁰⁶, escurçament dels telòmers³⁰⁷, augment de l'activitat telomerasa³⁰⁸, activació via PI3K/AKT³⁰⁹ i la interrupció de la reparació del dany en la doble cadena d'ADN³¹⁰.

Per avaluar els esdeveniments moleculars involucrats en la sensibilitat del CE, és van examinar diferents línies de CE (IK, KLE, RL.95 i HEC-1A). Per poder classificar-les en

diferents graus de radiosensibilitat i a la vegada observar, la seva capacitat de reparació, es va avaluar la seva capacitat clorogènica. Les línies van mostrar diferències en la sensibilitat a la radiació ionitzant i la seva resposta a la radioteràpia va ser dosi dependent com ja s'ha descrit en altres estudis ^{301, 307, 311}. Les cèl·lules, de les diferents línies de CE, van mostrar menys colònies a dosis elevades de tractament, és a dir, la seva capacitat de reparació es veia afectada de manera dosi dependent.

La radiació ionitzant és una radiació formada per fotons que en interactuar amb la matèria produeixen ions. El mecanisme molecular de la radiació ionitzant actua, de manera directa, danyant la cadena d'ADN de les cèl·lules canceroses. Aquest dany és produït quan s'ionitzen els àtoms de la cadena d'ADN (ADN⁺). Per altra banda, el dany indirecte té lloc com a conseqüència de la ionització de molècules d'aigua. Aquestes formen radicals lliures (ROS), normalment radicals hidroxils, que acabaran danyant el DNA. La major part de l'efecte de la radiació és a través dels radicals lliures (ROS).

La radiosensibilitat cel·lular depèn de varis factors; dany al DNA, capacitat de reparació del DNA, progressió del cicle cel·lular i la mort cel·lular. El DNA és una perfecta diana cel·lular pels efectes citotòxics, mutagènics i carcinògens de la radiació ionitzant ³¹². El tractament amb radioteràpia induïx trencaments simples (SSB)³¹³ i dobles (DSB)³¹⁴ de la cadena d'ADN. Els trencaments en la cadena simple d'ADN es formen, majoritàriament, com a conseqüència de la producció de ROS ³¹⁵. Aquesta producció de ROS es genera, a dosis baixes de radiació (2-4 Gy). Els ROS a més de SSB promou l'alliberament de bases de l'ADN modificant els sucres de la cadena i zones no bàsiques ³¹⁶. En canvi, a dosis més elevades es produeixen els trencaments de la doble cadena, aquests estan regulats per la via ATM que a la vegada induïx la fosforilació de les kinases Chk1/Chk2, responsables d'activar el mecanisme de reparació de l'ADN ^{317, 318}, a més a més, la formació d'aquests DSB també són deguts al complex MRN, format per unes proteïnes que s'uneixen, trenquen i senyalitzen el DNA ²⁹⁵. Atès que les cèl·lules tenen mecanismes de reparació de danys en una cadena senzilla d'ADN, els trencaments de l'ADN en la doble cadena seria la tècnica més important per a causar la mort cel·lular.

En el lloc de dany en la doble cadena d'ADN, hi ha un reclutament de proteïnes, que microscòpicament es poden veure com a petites regions sub-nuclears, comunament anomenades *focis*. Són moltes les proteïnes que poden formar *focis*, al

voltant o en el mateix lloc que els trencaments de la doble cadena d'ADN. Es pensa, que aquest *focis* serveixen com a plataforma perquè les proteïnes reparadores del DNA s'hi uneixin. Una d'aquestes proteïnes és la histona H2AX²⁹⁵; passats uns minuts de la inducció de dany al DNA, aquesta histona es fosfori-la en la Serina 139 (Y-H2AX) i es col·loca als voltants dels trencaments de la doble cadena d'ADN. La presència d'aquesta proteïna es necessària pel reclutament d'altres per acabar reparant el dany^{319, 320}. D'acord amb aquests treballs, el nostre estudi mostra un augment significatiu del nombre de *focis*, després del tractament amb radiació ionitzant, que és dependent de la dosi. A més a més l'anàlisi del cicle cel·lular de la línia de CE, IK, després de la radiació presentava una aturada en la fase G₂/M, indicant una parada per intentar arreglar el dany³²¹. L'estudi de Li³²² apunta que la cèl·lula té més capacitat de reparar els SSB que el DSB, ja que la radiació indueix una inhibició dels mecanismes de reparació dels DSB.

Són diversos els mecanismes pels quals les cèl·lules s'acaben morint després del tractament amb radiació ionitzant. El grup de Dewey³²³ assenyala l'apoptosi com a responsable de la mort induïda per la radioteràpia. En el nostre treball, no vam poder detectar mort apoptòtica a temps curts post tractament, ni mitjançant una tinció amb *Hoechst* ni amb un assaig amb *Annexina*, però si vam detectar mort apoptòtica, mitjançant una tinció amb *Hoechst*, a temps llargs després del tractament. De fet, les cèl·lules no necessàriament moren immediatament després de la inducció de dany al DNA, poden ciclar una quantitat de vegades fins que la inestabilitat genòmica es tan gran que acaben morint³²⁴. L'aparició de ROS després del tractament i de manera dosi dependent, també conduiria a aquest tipus de mort, a través de l'activació d'una sèrie de senyals pro-apoptòtics³²⁵. L'estudi de Ross³⁰⁵ afegeix la catàstrofe mitòtica com a un altre model de mort cel·lular, aquesta té lloc quan la cèl·lula no s'ha pogut reparar i apareixen aberracions cromosòmiques, passats uns quants cicles, la cèl·lula acaba morint. Tot i que nosaltres no vam poder detectar catàstrofe mitòtica, aquest estudi, assenyala que les cèl·lules d'origen epitelial, com les nostres, tractades amb radiació ionitzant es moren per catàstrofe mitòtica.

El futur de la radioteràpia es centra en la identificació de noves teràpies combinatòries en aquest tipus de neoplàsia. Això es basa en la detecció de gens diferencialment expressats en cèl·lules irradiades i no irradiades³²⁶. Actualment són

molts els estudis que milloren la sensibilitat de les cèl·lules tumorals un cop irradiades utilitzant combinacions de tractaments; la utilització d'inhibidors del proteasoma juntament amb la radioteràpia és una de les vies de recerca actuals ^{327, 328}, teràpies que bloquegen o augmenten la formació de focus en la histona H2AX, acaben inhibint el procés de reparació del DNA ²⁴⁵, o teràpies que inhibeixen el complex MRN, format per les proteïnes Mre11-Rad50-NBS1 ³²⁹. En el nostre treball vam voler combinar la radioteràpia i l'inhibidor de les HDAC, Vorinostat, comunament acceptat com a potent radiosensibilitzador ^{254, 330}. Vam observar que hi ha una interacció estadísticament significativa en la combinació de Vorinostat i radiació ionitzant, aquesta combinació resulta en una disminució del nombre de colònies, suggerint que el Vorinostat augmenta el bloqueig de la reparació cel·lular. Aquesta interacció també es veia reflectida en un augment en el nombre de cèl·lules amb morfologia apoptòtica, el Vorinostat indueix dany al DNA, que es veu reflectit en un augment en la fosforilació de la histona H2AX ^{331, 332}.

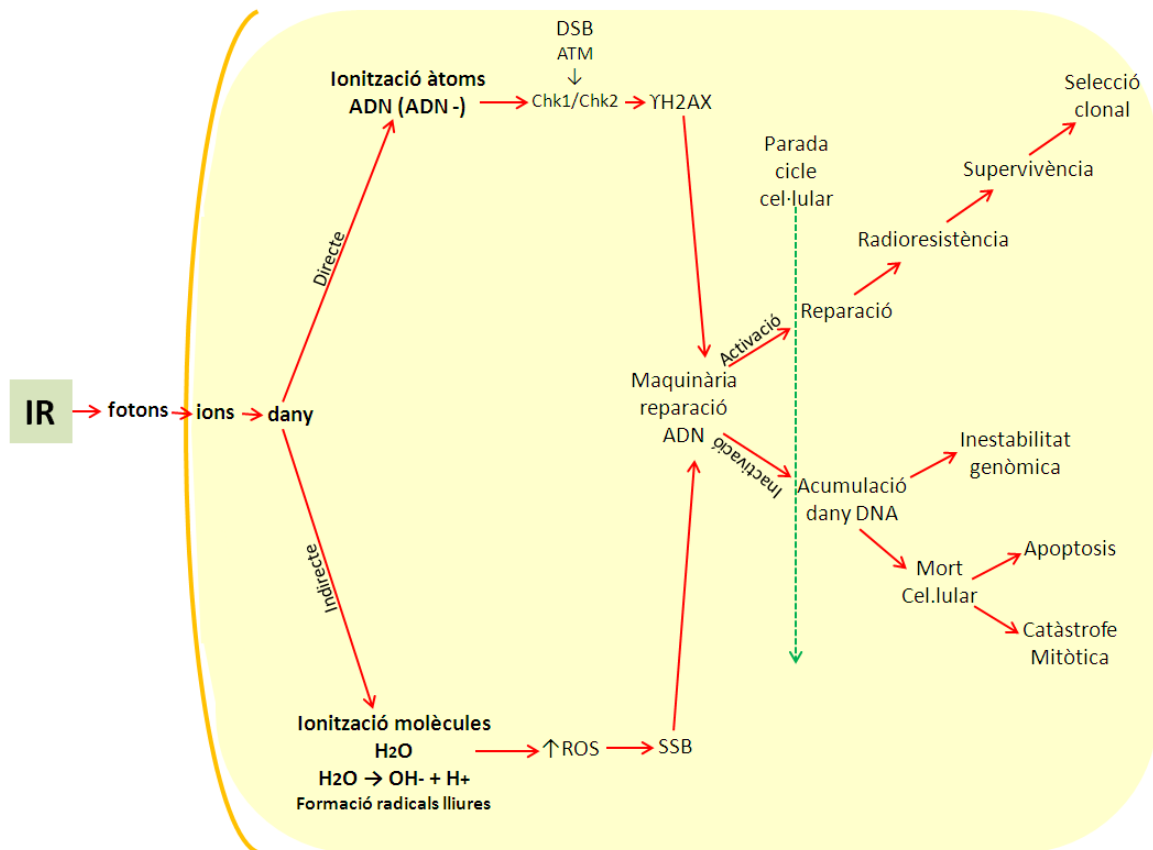


Figura 62. Esquema resum dels efectes de la radioteràpia en les cèl·lules de CE.

4. PAPER DE LA BIOACTIVACIÓ LOCAL DE LA VITAMINA D, PELS ENZIMS CYP27A1 I CYP2R1, EN EL CONTROL DEL CREIXEMENT CEL·LULAR, EN L'ENDOMETRI NORMAL I EL CARCINOMA D'ENDOMETRI.

Aquesta quarta part del treball conté la primera demostració de que el metabolisme de la VD, en l'EN, reproduïx totalment el sistema endocrí sistèmic de la VD, és a dir, dona suport a una capacitat del teixit endometrial, fins ara ignorada, per a la correcta activació de la VD₃ (inactiva) a 1,25D (hormona activa). Aquest fet proporciona una nova comprensió de la importància d'una suplementació adequada de VD₃ en la prevenció/atenuació dels trastorns associats amb les accions del complex 1,25D/VDR, incloent el creixement del CE. Concretament, una millora en l'expressió dels enzims CYP27A1 i CYP2R1, que converteixen la VD inactiva a 25(OH)D, per a que hi hagi una correcta activació autocrina/paracrina de l'activitat antiproliferativa del VDR, ja sigui directament o després de la conversió de 25(OH)D a 1,25D, en l'EN ciclant i el CE; una qüestió de rellevància clínica.

A diferència de l'EN en fase proliferativa, el teixit de la fase secretora va mostrar un augment en l'expressió dels enzims CYP27A1 i CYP2R1, que coincidien amb les taxes de proliferació més baixes i, també, es va correlacionar directament i de manera significativa, amb un augment del VDR nuclear; a més a més vam detectar un augment en l'expressió de CYP24A1, el gen del metabolisme de la VD més caracteritzat, una acció que requereix l'activació transcripcional del complex 1,25D/VDR. Aquest enzim, CYP24A1, és induït per la unió del VDR al seu lligand (25(OH)D o 1,25D), en tots els teixits sensibles a l'activitat de la VD, per tal de prevenir la toxicitat local i sistèmica de la VD, inhibint l'activitat metabòlica tant de 25(OH)D com de 1,25D. Aquests resultats, que els enzims CYP27A1 i CYP2R1 disminueixen en la fase proliferativa, a més a més de la demostració que CYP27B1 és manté constant al llarg del cicle menstrual ¹⁹⁹ (fase proliferativa i secretora), recolzen que una apropiada síntesi local de 25(OH)D podria contribuir a la supressió del creixement endometrial, mediat per VDR, i que l'efecte seria més potent que l'induït per CYP27B1. Desafortunadament, degut a les nostres limitacions per obtenir un anticòs altament específic per tal d'examinar, amb precisió, l'expressió de CYP27B1, no podem corroborar els nivells constants d'aquest enzim al

llarg del cicle menstrual, en el nostre conjunt de mostres d'EN. Segons el nostre coneixement, aquesta és la primera demostració que el metabolisme de la VD a l'EN, reproduïx totalment el sistema endocrí de la VD sistèmica, perquè s'expressen tots els enzims involucrats en la seva biosíntesi.

La deficiència de VD, és coneguda, en afectar negativament la severitat de la endometriosis degut a un control local irregular de les respostes Th1/Th2 cap a la tolerància^{333, 334}; aquesta deficiència també pot afectar a la implantació de l'embrió, reduint les taxes de fecunditat de la dona, a través d'una regulació defectuosa en l'expressió del gen HOXA10 (factor de transcripció que es regula hormonalment, augmenta la seva expressió durant la implantació de l'embrió), procés controlat per VDR^{335, 336}. Un cop més, per tal d'entendre més sobre aquests trastorns, els estudis es limitaven a l'anàlisi de possibles canvis en l'expressió de CYP27B1. En el nostre treball l'anàlisi de l'expressió dels enzims productors de 25(OH)D: CYP27A1 i CYP2R1, en aquests trastorns no cancerosos, de la funció endometrial podria ajudar a millorar les estratègies actuals, amb una suplementació de VD que augmentes de manera efectiva l'activació de VDR, amb un impacte mínim sobre el calci i el fòsfor en l'organisme. Per tant, els nostres resultats suggereixen que les òptimes estratègies de suplementació de VD per tractar la endometriosis o les anomalies en la fertilitat, a causa de defectes en la implantació d'embrions ha de ser personalitzat i regulat a través del cicle menstrual, per assegurar una apropiada producció local de 25(OH)D pel control del complex 1,25D/VDR en les respostes autocrina/paracrina de Th1/Th2 cap a la tolerància, o per induir l'expressió de gens com HOXA10, respectivament. La correlació directa entre els augments en l'expressió dels enzims CYP27A1 i CYP2R1 i la inducció de CYP24A1, també suggereix que l'EN imita el sistema endocrí sistèmic de la VD en la seva auto-regulació estricta per la protecció de la toxicitat⁶.

És important destacar que, en les primeres etapes del desenvolupament del càncer, a diferència de les reduccions observades en VDR, l'expressió de CYP27B1 ha demostrat augmentar al principi, però disminueix en etapes més avançades³³⁷. Els nostres resultats en CE demostren que l'expressió de CYP27A1 i CYP2R1 eren 11 i 1,3 vegades, respectivament, superior que en l'EN, i no van disminuir en etapes més avançades. Aquests augments es poden veure compensats, parcialment, per la reducció citosòlica i nuclear de VDR, tal i com van proposar les correlacions directes

entre els Hscores de CYP27A1 i CYP2R1 i una alta expressió de VDR nuclear, un fet clau en l'activació dels efectes antitumorals causats per la unió del VDR al seu lligand, a més a més també es va veure acompanyat per una reducció en els nivells d'expressió de Ki67, fet que recolza al paper dels enzims productors de 25(OH)D: CYP27A1 i CYP2R1, en els responsables de la reducció del creixement cel·lular a través de l'activació de VDR. En suport d'aquesta evidència, d'un paper funcional i local de la 25(OH)D en la detenció del creixement del CE humà, el tractament de les línies de CE amb VD₃, inactiva (cholecalciferol), durant 48 hores era suficient per a inhibir el creixement i la formació de colònies. A més, aquests efectes antiproliferatius de la VD inactiva van estar d'acord amb els nivells intracel·lulars detectables de 25(OH)D a les cèl·lules de CE, IK, i també amb nivells màxims en l'expressió de VDR nuclear. Des de que CYP2R1 ha passat a tenir una major rellevància fisiològica en mantenir nivells adequats de la VD ²²², el lleu augment del 30% observat en l'EC podria ser de rellevància per atenuar localment l'impacte de la deficiència de VD sistèmica sobre la progressió tumoral. Per tant, la simple correcció de la deficiència de VD podria ajudar a augmentar tant els nivells intratumorals de 25(OH)D com potenciar els efectes de l'VDR nuclear que sinergia amb les accions del complex 1,25D/VDR. Malauradament, la impossibilitat d'aconseguir VD-(colecalfiferol)-tritiada ens a impedit poder avaluar aquesta sinergia en la nostra línia de CE, IK. Si les baixes taxes de conversió, de VD₃ inactiva a 25(OH)D, observades en les cèl·lules de CE, IK, ocorren en altres tipus de cèl·lules canceroses, podria explicar, en part, per què només altes dosis diàries de VD redueixen eficaçment el risc de desenvolupar càncer ²¹⁰, inclòs el d'EC ³³⁸.

El nostre estudi recolza les diferències en l'expressió local de VDR i CYP24A1 amb el desenvolupament de diferents tipus de càncers. Està àmpliament acceptat que la combinació de nivells reduïts de VDR i nivells alts de CYP24A1, enzim que degrada els nivells circulants de 25(OH)D i 1,25D, contribueixen a agreujar els efectes de la deficiència de VD en la progressió del tumor ²⁰⁰. D'acord amb les propietats antiproliferatives, conegudes, de l'activació del VDR, els nostres anàlisis dels TMA van mostrar nivells de VDR nuclear superiors en la fase secretora de l'EN quan es comparava amb la fase proliferativa de l'EN. En contrast amb els nostres resultats, el grup de Vienonen ³³⁹ van demostrar que els nivells de mRNA del VDR, en l'endometri humà, es mantien similars al llarg del cicle menstrual, de manera similar en l'estudi

realitzat en càncer de còlon ³⁴⁰, els tipus més agressius de CE van mostrar nivells de VDR nuclear inferiors que en el teixit normal adjacent. En el nostre treball vam observar que l'expressió citoplasmàtica de CYP24A1 era inferior en el CE que en l'EN, suggerint que la degradació dels metabòlits de la VD, per la CYP24A1, no té un paper important, en la iniciació del CE en pacients amb carència de VD. Resultats similars han estat publicats en altres neoplàsies regulades hormonalment; en càncer de pròstata ³⁴¹ i en cèl·lules MCF-7 de càncer de mama ³⁴², histològicament, l'expressió de CYP24A1 estava més reduïda en les zones neoplàstiques que en les zones adjacents benignes. En aquest estudi, solament les formes més agressives de CE; de NEEC, tumors de grau 3 i tumors en estadis III i IV, mostraven els nivells més elevats de CYP24A1 coincidint amb nivells baixos de VDR nuclear. Aquest fet suggereix, que en pacients amb deficiència de VD i estadis avançats de CE, l'expressió de CYP24A1 podria agreujar la deficiència local de 25(OH)D i 1,25D, a més de reduir l'activació de VDR i, per tant, de la seva activitat antitumoral, donant suport a la hipòtesis de que existeix una associació entre la sobreexpressió de CYP24A1 i el mal pronòstic demostrat en altres càncers humans; tal i com demostra el grup de Bareis en càncer de còlon ³⁴³ i el grup de Mimori en càncer esofàgic ²⁰². En concordança amb aquests estudis, en els tumors amb nivells baixos de VDR, alta expressió de CYP24A1, amb la conseqüent degradació de 25(OH)D i 1,25D agreujaria encara més l'impacte de la deficiència de la VD sobre les accions antitumorals del VDR, ja limitades pels baixos nivells inicials. L'expressió de CYP24A1 sembla ser més específica del tumor que VDR. Anderson i el seu grup ³⁴⁴ van demostrar que malgrat l'expressió del mRNA de CYP24A1 estava significativament augmentada en diferents tipus de càncer, com còlon, ovari i pulmó, en comparació amb el teixit normal adjacent, estava disminuïda en càncer de mama.

El nostre estudi posa de relleu una sèrie d'avantatges en la millora de les estratègies dels suplementes de VD sobre intervencions exclusives amb el potent 1,25D o els seus anàlegs en l'atenuació de la progressió del CE. No només, el 1,25D, inhibeix l'activitat endometrial de CYP27B1, a nivells fisiològics ³⁴⁵, també suprimeix l'expressió de CYP2R1 en fibroblasts i càncer de pròstata ³⁴⁶, compromentent així al mateix temps la producció endometrial de 1,25D i agreujant la deficiència de la VD sistèmica. A causa del sinergisme entre 25(OH)D i el 1,25D, en l'aturada del creixement tumoral induïda per l'activació del VDR ²⁰¹, i que el 25(OH)D té una afinitat 25 cops menor per

l'enzim CYP24A1 que el 1,25D, els nostres resultats també suggereixen que una suplementació apropiada de VD podria ajudar a reduir tant les dosis de 1,25D com de compostos relacionats, per a la prevenció i tractament del CE, en tumors que expressen nivells baixos de VDR, mitjançant la reducció de la inducció de CYP24A1 i maximitzant les activitats intratumorals de CYP27A1 i CYP2R1, i, potser induint una sinergia amb l'activitat de CYP27B1 en l'activació del VDR.

Sense cap dubte, els assaig clínics prospectius, amb un examen dels nivells d'expressió dels enzims del metabolisme de la VD: CYP27A1, CYP2R1 i CYP24A1 juntament amb l'expressió de VDR, en el diagnòstic, són necessaris per obtenir proves concloents sobre l'impacte real dels suplementes de VD en l'atenuació de la progressió del CE i de la precisió i la sensibilitat d'aquests marcadors del metabolisme de la VD endometrial en la predicció dels resultats clínics.

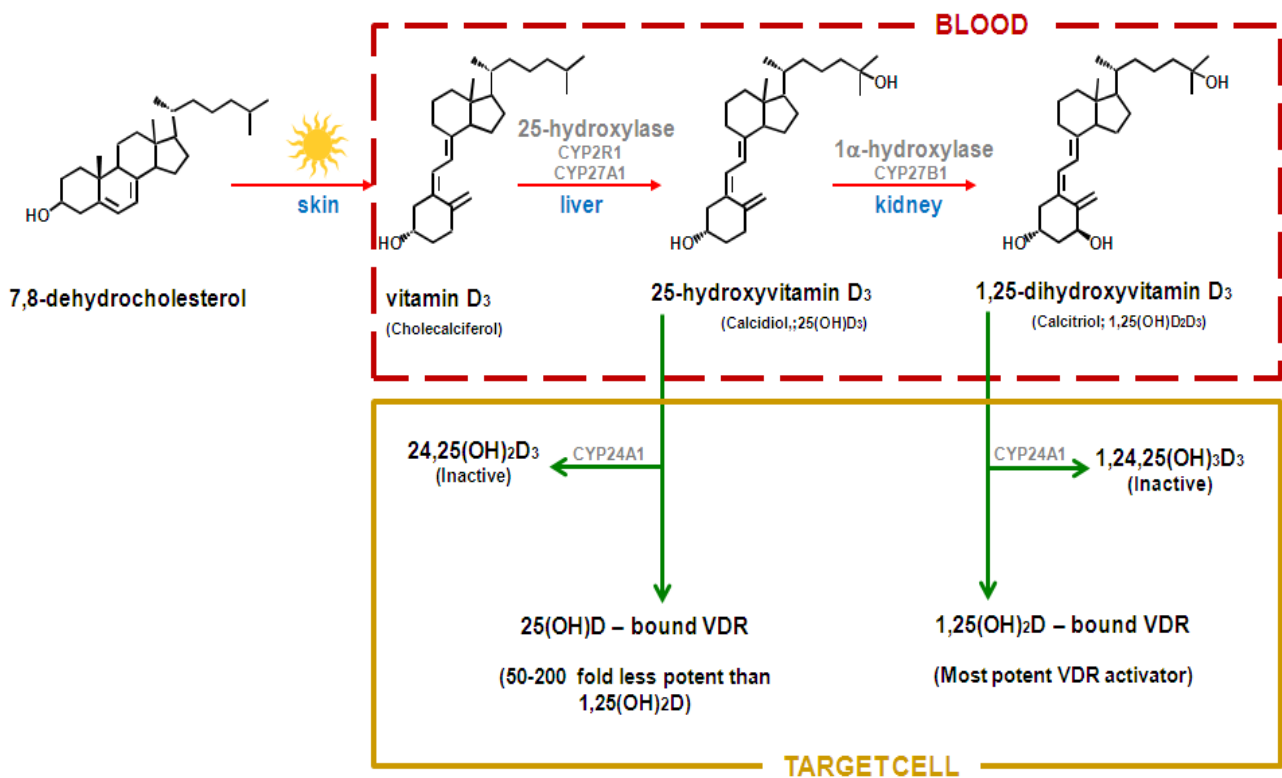


Figura 63. Esquema resum de la conversió de la vitamina D en les cèl·lules de CE.



Conclusions

CONCLUSIONS

Primera

L'inhibidor de les histones deacetilases, Vorinostat, indueix una reducció de la viabilitat, una parada del cicle cel·lular i apoptosi *in vitro* i *in vivo* en les línies cel·lulars de CE.

Segona

El Vorinostat provoca una activació de les vies intrínseca i extrínseca de l'apoptosi en les línies cel·lulars de CE.

Tercera

La baixada en l'expressió de la caspasa-8 redueix el creixement tumoral de manera significativa *in vitro* i *in vivo* en les línies cel·lulars de CE.

Quarta

La combinació del Vorinostat amb la baixada en l'expressió de la caspasa-8 gairebé suprimeix el creixement tumoral *in vitro* i *in vivo* en les línies cel·lulars de CE.

Cinquena

El tractament amb Vorinostat indueix dany al DNA, augmenta la producció de ROS i disminueix el potencial de membrana mitocondrial (MMP), en les línies cel·lulars de CE.

Sisena

La combinació d'antioxidants amb Vorinostat inhibeix els efectes antineoplàsics induïts pel tractament amb Vorinostat *in vitro* i *in vivo* en les línies cel·lulars de CE.

Setena

El tractament amb Nac no inhibeix els efectes antineoplàsics de la combinació del Vorinostat i la baixada en l'expressió de la caspasa-8 en ni *in vivo* ni *in vitro* en les línies cel·lulars de CE.

Vuitena

Les línies cel·lulars de CE expressen diferents graus de radiosensibilitat en ser exposades a radiació ionitzant. Aquesta radiació indueix mort apoptòtica, parada del cicle cel·lular, dany al DNA i augmenta la producció de ROS.

Novena

La combinació de Vorinostat i radiació ionitzant disminueix la capacitat clonogènica de les línies cel·lulars de CE i augmenta els efectes citotòxics del fàrmac.

Desena

L'endometri normal té la capacitat d'activar la vitamina D inactiva en la seva forma hormonal.

Onzena

Els augments de CYP27A1 i CYP2R1 en el CE sugereixen que la suplementació adequada amb vitamina D seria suficient per a prevenir el desenvolupament i/o atenuar la progressió del CE.

Dotzena

El tractament amb vitamina D₃ inactiva, colecalciferol, redueix la proliferació en les línies cel·lulars de CE. Per tant, és una demostració conclouent de l'activitat de la CYP27A1 i CYP2R1 en convertir *in vitro* la vitamina D inactiva en 25(OH)D.



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

1. www.hdacis.com. HDAC Inhibitor Base.
2. <http://graphy21.blogspot.com.es/2010/07/mammalian-epigenome.html>.
3. Gabriel R. Genética - Técnicos para Bioterio. 2013.
4. Kurdistani SK, Grunstein M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4: 276-284.
5. Chaigne-Delalande B, Moreau JF, Legembre P. Rewinding the DISC. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56: 9-14.
6. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289: F8-28.
7. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3: 58.
8. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17: 617-625.
9. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004;384: 201-232.
10. Tresguerres JAF. *Fisiología Humana*. 3ª ed. Mc Grau Hill, 2005.
11. ESQUEMAS2013.
12. Stevens A, Lowe J. *Texto y Atlas de histología*. Ed. DOYMA, 1993.
13. Stevens A., Lowe J. *Histología Humana*, 1998.
14. Johnson MH., BJ. E. *Essential Reproduction*. Blackwell Science, 2000.
15. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol*. 2009;62: 777-785.
16. Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*. 2013;32: 403-413.
17. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*. 2013;24: 792-800.
18. Bovicelli A, D'Andrilli G, Giordano A, De Iaco P. Conservative treatment of early endometrial cancer. *J Cell Physiol*. 2013;228: 1154-1158.
19. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15: 10-17.
20. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology*. 2007;39: 72-87.
21. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc*. 2008;83: 97-112.
22. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2001;32: 569-577.
23. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2013;62: 111-123.
24. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497: 67-73.

25. Pallares J, Velasco A, Eritja N, et al. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol.* 2008;21: 691-699.
26. Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol.* 2001;193: 193-199.
27. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene.* 2002;21: 7981-7990.
28. Pallares J, Bussaglia E, Martinez-Guitarte JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol.* 2005;18: 719-727.
29. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol.* 2006;37: 1465-1472.
30. Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, Prat J. PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum Pathol.* 2000;31: 312-317.
31. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Malvasi A, Tinelli R. Hormonal carcinogenesis and socio-biological development factors in endometrial cancer: a clinical review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87: 1101-1113.
32. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55: 74-108.
33. International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).
34. David P, Winchester M. American Joint Committee on Cancer (AJCC).
35. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986;44: 817-829.
36. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94: 12736-12737.
37. Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. [Programmed death of cells (apoptosis)]. *Patol Pol.* 1993;44: 113-119.
38. Lheureux S, Le Moulec S. [Molecules involved in apoptosis regulation as therapeutic targets in oncology]. *Bull Cancer.* 2011;98: 1029-1036.
39. Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh.* 2003;75: 5-9.
40. Claveria C, Torres M. Mitochondrial apoptotic pathways induced by *Drosophila* programmed cell death regulators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304: 531-537.
41. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 2002;9: 358-361.
42. Zmasek CM, Zhang Q, Ye Y, Godzik A. Surprising complexity of the ancestral apoptosis network. *Genome Biol.* 2007;8: R226.
43. Kerr JF. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol.* 1965;90: 419-435.
44. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988;13: 18-54.

45. Peter ME, Medema JP, Krammer PH. Does the *Caenorhabditis elegans* protein CED-4 contain a region of homology to the mammalian death effector domain? *Cell Death Differ.* England, 1997;5:23-525.
46. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002;181-182: 471-474.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35: 495-516.
48. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26: 239-257.
49. Rodenburg RJ, Raats JM, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays.* 2000;22: 627-636.
50. SEBBM. Apoptosis: una forma controlada de muerte celular, 2010.
51. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407: 770-776.
52. Donepudi M, Grutter MG. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys Chem.* 2002;101-102: 145-153.
53. Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11: 191-201.
54. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997;22: 299-306.
55. Meier P, Vausden KH. Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol Cell.* 2007;28: 746-754.
56. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326 (Pt 1): 1-16.
57. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6: 1028-1042.
58. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22: 8543-8567.
59. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5: 897-907.
60. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int.* 2005;29: 489-496.
61. Peter ME. The flip side of FLIP. *Biochem J.* 2004;382: e1-3.
62. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116: 205-219.
63. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* 2002;2: 420-430.
64. Valmiki MG, Ramos JW. Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66: 814-830.
65. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012;19: 36-41.
66. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388: 190-195.
67. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42: 210-213.
68. Chang DW, Xing Z, Pan Y, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8

- activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo j.* 2002;21: 3704-3714.
69. Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol.* 2005;25: 31-58.
70. Micheau O, Thome M, Schneider P, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 2002;277: 45162-45171.
71. Thome M, Schneider P, Hofmann K, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997;386: 517-521.
72. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94: 1172-1176.
73. Yeh WC, Itie A, Elia AJ, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity.* 2000;12: 633-642.
74. Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J.* 2004;382: 651-657.
75. Gronski MA, Weinem M. Death Pathways in T Cell Homeostasis and Their Role in Autoimmune Diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2006;3: 88-95.
76. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2005;5: 876-885.
77. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305: 626-629.
78. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 2006;13: 1396-1402.
79. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem.* 2009;16: 4058-4065.
80. Cain K. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev.* 2003;35: 337-363.
81. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 2002;84: 203-214.
82. Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal.* 2012;24: 1420-1425.
83. Perez-Paya E, Orzaez M, Mondragon L, et al. Molecules that modulate Apaf-1 activity. *Med Res Rev.* 2011;31: 649-675.
84. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274: 11549-11556.
85. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001;15: 2922-2933.
86. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010;123: 3209-3214.
87. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8: 405-413.
88. Gross A, Yin XM, Wang K, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor

- necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 1999;274: 1156-1163.
89. Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30: 3127-3135.
90. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9: 47-59.
91. Reed JC, Cuddy M, Haldar S, et al. BCL2-mediated tumorigenicity of a human T-lymphoid cell line: synergy with MYC and inhibition by BCL2 antisense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87: 3660-3664.
92. Reed JC, Stein C, Subasinghe C, et al. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 1990;50: 6565-6570.
93. Kitada S, Miyashita T, Tanaka S, Reed JC. Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs. *Antisense Res Dev.* 1993;3: 157-169.
94. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 1126-1132.
95. Zhang LN, Li JY, Xu W. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther.* 2013;20: 1-7.
96. Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* 2012;19: 1733-1740.
97. Tomek M, Akiyama T, Dass CR. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64: 1695-1702.
98. Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene.* 1997;14: 405-414.
99. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813: 521-531.
100. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11: 621-632.
101. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* 2007;315: 856-859.
102. Youle RJ. Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science.* 2007;315: 776-777.
103. Fletcher JI, Huang DC. Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle.* 2008;7: 39-44.
104. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003;112: 481-490.
105. Basanez G, Soane L, Hardwick JM. A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS Biol.* 2012;10: e1001399.
106. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 2002;9: 505-512.
107. Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 2000;7: 1174-1181.
108. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's

box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2: 67-71.

109. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26: 1324-1337.

110. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813: 508-520.

111. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288: 1053-1058.

112. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001;7: 683-694.

113. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell.* 2001;7: 673-682.

114. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol.* 2000;10: 1201-1204.

115. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 1996;87: 619-628.

116. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94: 491-501.

117. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94: 481-490.

118. Shimazu T, Degenhardt K, Nur EKA, et al. NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev.* 2007;21: 929-941.

119. Halkia E, Kalinoglou N, Spiliotis J. Surgical management of endometrial cancer. A critical review. *J buon.* 2012;17: 637-643.

120. Arora V, Quinn MA. Endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26: 311-324.

121. Southcott BM. Carcinoma of the endometrium. *Drugs.* 2001;61: 1395-1405.

122. Lee NK. Adjuvant treatment of advanced-stage endometrial cancer. *Clin Obstet Gynecol.* 2011;54: 256-265.

123. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58: 71-96.

124. *Chemotherapy* 1999.

125. Dizon DS. Treatment options for advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2010;117: 373-381.

126. Lovecchio JL, Averette HE, Lichtinger M, Townsend PA, Girtanner RW, Fenton AN. Treatment of advanced or recurrent endometrial adenocarcinoma with cyclophosphamide, doxorubicin, cis-Platinum, and megestrol acetate. *Obstet Gynecol.* 1984;63: 557-560.

127. Bradford LS, Rauh-Hain JA, Schorge J, Birrer MJ, Dizon DS. Advances in the Management of Recurrent Endometrial Cancer. *Am J Clin Oncol.* 2013.

128. Wright JD, Barrena Medel NI, Sehouli J, Fujiwara K, Herzog TJ. Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet.* 2012;379: 1352-1360.

129. Hormone therapy for endometrial cancer. Available from URL: <http://www.cancer.org/cancer/endometria/cancer/detailedguide/endometrial-uterine-cancer-treating-hormone-therapy>.
130. Kauppila A. Progestin therapy of endometrial, breast and ovarian carcinoma. A review of clinical observations. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1984;63: 441-450.
131. Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA, et al. Effects of octreotide on liver metastasis and intrametastatic lipid peroxidation in experimental pancreatic cancer. *Oncology*. 2001;60: 282-288.
132. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128: 635-638.
133. Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn*. 2007;236: 1144-1156.
134. Wu N, Gui JF. [Histone variants and histone exchange]. *Yi Chuan*. 2006;28: 493-500.
135. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128: 693-705.
136. La célula. 8-Ciclo celular. Cromosomas. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Available from URL: <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/8-cromosomas.php>.
137. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*. 2007;13: 363-372.
138. Le Dinh L. Basic Principles of Genetics. 2009.
139. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. 2003;21: 255-261.
140. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17: 666-672.
141. Conocer Ciencia: La epigenética y el resurgir del lamarckismo (II). Available from URL: <http://pepascientificas.blogspot.com.es/2012/11/la-epigenetica-y-el-resurgir-del-5.html>.
142. www.geneticamolecularunlar.wikispaces.com/.
143. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293: 1074-1080.
144. Shi Y, Whetstine JR. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. 2007;25: 1-14.
145. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403: 41-45.
146. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64: 435-459.
147. Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*. 2003;116: 3677-3685.
148. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004;14: R546-551.
149. Hatzimichael E, Crook T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J Drug Deliv*. 2013;2013: 529312.
150. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5: 37-50.

151. Boumber Y, Issa JP. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park)*. 2011;25: 220-226, 228.
152. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*. 2011;3: 166-179.
153. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 2002;108: 475-487.
154. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*. 2007;1: 19-25.
155. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005;363: 15-23.
156. Tang J, Yan H, Zhuang S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124: 651-662.
157. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Focus on acetylation: the role of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy and beyond. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16: 569-571.
158. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5: 769-784.
159. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6: 38-51.
160. Takai N, Narahara H. Human endometrial and ovarian cancer cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity, potently induce cell cycle arrest, and stimulate apoptosis. *Curr Med Chem*. 2007;14: 2548-2553.
161. Takai N, Kawamata N, Gui D, Said JW, Miyakawa I, Koeffler HP. Human ovarian carcinoma cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potently induce apoptosis. *Cancer*. 2004;101: 2760-2770.
162. Bi G, Jiang G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects. *Cell Mol Immunol*. 2006;3: 285-290.
163. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27: 5459-5468.
164. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*. 2009;107: 600-608.
165. Dolcet X, Llobet D, Encinas M, et al. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem*. 2006;281: 22118-22130.
166. Sorolla A, Yeramian A, Valls J, et al. Blockade of NFkappaB activity by Sunitinib increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells. *Mol Oncol*. Netherlands: 2012 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V, 2012:530-541.
167. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18: 5856-5864.
168. Konecny GE, Kolarova T, O'Brien NA, et al. Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2013;12: 632-642.
169. Bergada L, Sorolla A, Yeramian A, et al. Combination of Vorinostat and caspase-8 inhibition exhibits high anti-tumoral

- activity on endometrial cancer cells. *Mol Oncol*. 2013.
170. Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today*. 2010;40: 809-815.
171. Di Gennaro E, Bruzzese F, Caraglia M, Abruzzese A, Budillon A. Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*. 2004;26: 435-441.
172. Bergman JA, Woan K, Perez-Villarrol P, Villagra A, Sotomayor EM, Kozikowski AP. Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J Med Chem*. 2012;55: 9891-9899.
173. Zhang Z, Hao C, Wang L, et al. Inhibition of leukemic cells by valproic acid, an HDAC inhibitor, in xenograft tumors. *Onco Targets Ther*. 2013;6: 733-740.
174. Horing E, Podlech O, Silkenstedt B, Rota IA, Adamopoulou E, Naumann U. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes apoptosis and antitumor immunity in glioblastoma cells. *Anticancer Res*. 2013;33: 1351-1360.
175. Li ZH, Zhang XB, Han XQ, et al. Antitumor effects of a novel histone deacetylase inhibitor NK-HDAC-1 on breast cancer. *Oncol Rep*. 2013;30: 499-505.
176. Shan Z, Feng-Nian R, Jie G, Ting Z. Effects of valproic acid on proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13: 3977-3982.
177. Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Inhibition of class I histone deacetylases in non-small cell lung cancer by honokiol leads to suppression of cancer cell growth and induction of cell death in vitro and in vivo. *Epigenetics*. 2013;8: 54-65.
178. Das C, Kundu TK. Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics. *IUBMB Life*. 2005;57: 137-149.
179. Spange S, Wagner T, Heinzel T, Kramer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41: 185-198.
180. Veenstra TD, Pittelkow MR, Kumar R. Regulation of Cellular Growth by 1,25-Dihydroxyvitamin D(3)-Mediated Growth Factor Expression. *News Physiol Sci*. 1999;14: 37-40.
181. Sanchez CP. Modulation of endochondral bone formation: roles of growth hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D and hyperparathyroidism. *Pediatr Nephrol*. 2000;14: 646-649.
182. Manolagas SC, Yu XP, Girasole G, Bellido T. Vitamin D and the hematolymphopoietic tissue: a 1994 update. *Semin Nephrol*. 1994;14: 129-143.
183. Peterlik M, Grant WB, Cross HS. Calcium, vitamin D and cancer. *Anticancer Res*. Greece, 2009:3687-3698.
184. Calvo MS, Whiting SJ. Prevalence of vitamin D insufficiency in Canada and the United States: importance to health status and efficacy of current food fortification and dietary supplement use. *Nutr Rev*. 2003;61: 107-113.
185. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med*. 2002;112: 659-662.
186. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res*. 1990;10: 1307-1311.

187. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol.* 1999;277: F157-175.
188. Okano T, Yasumura M, Mizuno K, Kobayashi T. Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skins. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1977;23: 165-168.
189. J.M. Q. Vitamina D. 2004.
190. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond).* 2000;98: 217-240.
191. Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem.* 1974;249: 1251-1257.
192. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001;81: 1269-1304.
193. Carlberg C, Bendik I, Wyss A, et al. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature.* 1993;361: 657-660.
194. Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G, Pfahl M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature.* 1992;355: 441-446.
195. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;215: 31-38.
196. Zehnder D, Bland R, Chana RS, et al. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13: 621-629.
197. Cross HS, Bareis P, Hofer H, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids.* 2001;66: 287-292.
198. Adams JS, Gacad MA. Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D₃ sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med.* 1985;161: 755-765.
199. Vigano P, Lattuada D, Mangioni S, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol.* 2006;36: 415-424.
200. Lopes N, Sousa B, Martins D, et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer.* 2010;10: 483.
201. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118: 162-170.
202. Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, et al. Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol.* 2004;15: 236-241.
203. Sakaki T, Yasuda K, Kittaka A, Yamamoto K, Chen TC. CYP24A1 as a Potential Target for Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013.
204. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev.* 2002;23: 763-786.

205. Dusso AS, Brown AJ. Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis.* 1998;32: S13-24.
206. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology.* 1983;113: 1511-1518.
207. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays.* 2004;26: 21-28.
208. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006;371: 1-12.
209. ACOG Committee Opinion No. 495: Vitamin D: Screening and supplementation during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2011;118: 197-198.
210. Garland CF, French CB, Baggerly LL, Heaney RP. Vitamin D supplement doses and serum 25-hydroxyvitamin D in the range associated with cancer prevention. *Anticancer Res.* 2011;31: 607-611.
211. Gross C, Stamey T, Hancock S, Feldman D. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Urol.* 1998;159: 2035-2039; discussion 2039-2040.
212. Zhao XY, Feldman D. The role of vitamin D in prostate cancer. *Steroids.* 2001;66: 293-300.
213. Gocek E, Studzinski GP. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46: 190-209.
214. Stubbins RE, Hakeem A, Nunez NP. Using components of the vitamin D pathway to prevent and treat colon cancer. *Nutr Rev.* 2012;70: 721-729.
215. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet.* 1989;2: 1176-1178.
216. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* United States, 2005:1991-1997.
217. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control.* 2000;11: 847-852.
218. Zehnder D, Bland R, Williams MC, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86: 888-894.
219. Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, et al. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol.* 2002;161: 105-114.
220. Delvin EE, Arabian A, Glorieux FH, Mamer OA. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by isolated cells from human decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60: 880-885.
221. Hoenderop JG, van der Kemp AW, Urben CM, Strugnell SA, Bindels RJ. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2004;66: 1082-1089.
222. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 7711-7715.
223. Van Veldhuizen PJ, Taylor SA, Williamson S, Drees BM. Treatment of

- vitamin D deficiency in patients with metastatic prostate cancer may improve bone pain and muscle strength. *J Urol*. 2000;163: 187-190.
224. Hisatake J, O'Kelly J, Uskokovic MR, Tomoyasu S, Koeffler HP. Novel vitamin D(3) analog, 21-(3-methyl-3-hydroxy-butyl)-19-nor D(3), that modulates cell growth, differentiation, apoptosis, cell cycle, and induction of PTEN in leukemic cells. *Blood*. 2001;97: 2427-2433.
225. Reddy CD, Patti R, Guttapalli A, et al. Anticancer effects of the novel 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 hybrid analog QW1624F2-2 in human neuroblastoma. *J Cell Biochem*. 2006;97: 198-206.
226. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, et al. Dietary vitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol) exhibit. *Endocrinology*. 2012;153: 2576-2587.
227. Ingraham BA, Bragdon B, Nohe A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr Med Res Opin*. 2008;24: 139-149.
228. Chen TC, Sakaki T, Yamamoto K, Kittaka A. The roles of cytochrome P450 enzymes in prostate cancer development and treatment. *Anticancer Res. Greece*, 2012;291-298.
229. Sergeev IN. Vitamin D and cellular Ca²⁺ signaling in breast cancer. *Anticancer Res. Greece*, 2012;299-302.
230. Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Grotsky DA, et al. A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates cathepsin L and vitamin D. *Embo j*. 2011;30: 3383-3396.
231. Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci*. 2002;4: E12.
232. Dusso AS, Kamimura S, Gallieni M, et al. gamma-Interferon-induced resistance to 1,25-(OH)₂ D₃ in human monocytes and macrophages: a mechanism for the hypercalcemia of various granulomatoses. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82: 2222-2232.
233. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer DA. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398: 779-789.
234. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Rue M, Comella JX, Matias-Guiu X. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest*. 2005;85: 885-894.
235. Llobet D, Eritja N, Encinas M, et al. Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 2008;19: 115-124.
236. Llobet D, Eritja N, Domingo M, et al. KSR1 is overexpressed in endometrial carcinoma and regulates proliferation and TRAIL-induced apoptosis by modulating FLIP levels. *Am J Pathol*. 2011;178: 1529-1543.
237. Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol*. 2004;173: 2976-2984.
238. Park SM, Schickel R, Peter ME. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17: 610-616.
239. You BR, Park WH. Suberoyl bishydroxamic acid inhibits the growth of A549 lung cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2010;344: 203-210.

240. You BR, Park WH. Trichostatin A induces apoptotic cell death of HeLa cells in a Bcl-2 and oxidative stress-dependent manner. *Int J Oncol.* 2013;42: 359-366.
241. Miller CP, Ban K, Dujka ME, et al. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells. *Blood.* 2007;110: 267-277.
242. Yu C, Friday BB, Lai JP, et al. Abrogation of MAPK and Akt signaling by AEE788 synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through reactive oxygen species generation. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 1140-1148.
243. Robert C, Rassool FV. HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair. *Adv Cancer Res.* 2012;116: 87-129.
244. Shin H, Lee YS, Lee YC. Sodium butyrate-induced DAPK-mediated apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncol Rep.* 2012;27: 1111-1115.
245. Kao J, Milano MT, Javaheri A, et al. gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006;6: 197-205.
246. Becker S, Cordes T, Diesing D, Diedrich K, Friedrich M. Expression of 25 hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human endometrial tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103: 771-775.
247. Brazelle W, Krehling JM, Gemmer J, et al. Histone deacetylase inhibitors downregulate checkpoint kinase 1 expression to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One.* 2010;5: e14335.
248. Tate CR, Rhodes LV, Segar HC, et al. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast Cancer Res.* 2012;14: R79.
249. Krishnan M, Singh AB, Smith JJ, et al. HDAC inhibitors regulate claudin-1 expression in colon cancer cells through modulation of mRNA stability. *Oncogene.* 2010;29: 305-312.
250. Takai N, Narahara H. Histone deacetylase inhibitor therapy in epithelial ovarian cancer. *J Oncol.* 2010;2010: 458431.
251. Borbone E, Berlingieri MT, De Bellis F, et al. Histone deacetylase inhibitors induce thyroid cancer-specific apoptosis through proteasome-dependent inhibition of TRAIL degradation. *Oncogene.* 2010;29: 105-116.
252. Ocker M. Deacetylase inhibitors - focus on non-histone targets and effects. *World J Biol Chem.* 2010;1: 55-61.
253. Dickinson M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs.* 2010;28 Suppl 1: S3-20.
254. Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011: 514261.
255. Sarfstein R, Bruchim I, Fishman A, Werner H. The mechanism of action of the histone deacetylase inhibitor vorinostat involves interaction with the insulin-like growth factor signaling pathway. *PLoS One.* 2011;6: e24468.
256. Kerr E, Holohan C, McLaughlin KM, et al. Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2012;19: 1317-1327.

257. Uchida H, Maruyama T, Ono M, et al. Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology*. 2007;148: 896-902.
258. Conti C, Leo E, Eichler GS, et al. Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage. *Cancer Res*. 2010;70: 4470-4480.
259. Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 14639-14644.
260. Namdar M, Perez G, Ngo L, Marks PA. Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 20003-20008.
261. Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, et al. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell*. 2012;149: 780-794.
262. Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*. 2005;103: 1551-1560.
263. Deleu S, Lemaire M, Arts J, et al. Bortezomib alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor JNJ-26481585: effect on myeloma bone disease in the 5T2MM murine model of myeloma. *Cancer Res*. 2009;69: 5307-5311.
264. Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *Eur J Cancer*. 2009;45: 2425-2438.
265. Frew AJ, Lindemann RK, Martin BP, et al. Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 11317-11322.
266. Sung ES, Kim A, Park JS, Chung J, Kwon MH, Kim YS. Histone deacetylase inhibitors synergistically potentiate death receptor 4-mediated apoptotic cell death of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Apoptosis*. 2010;15: 1256-1269.
267. Yerbes R, Lopez-Rivas A. Itch/AIP4-independent proteasomal degradation of cFLIP induced by the histone deacetylase inhibitor SAHA sensitizes breast tumour cells to TRAIL. *Invest New Drugs*. 2012;30: 541-547.
268. Zhang G, Park MA, Mitchell C, et al. Vorinostat and sorafenib synergistically kill tumor cells via FLIP suppression and CD95 activation. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 5385-5399.
269. Llobet D, Eritja N, Encinas M, et al. CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulating FLIP levels in endometrial carcinoma cells. *Oncogene*. 2008;27: 2513-2524.
270. Kim PK, Mahidhara R, Seol DW. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 2001;4: 293-296.
271. McKee AE, Thiele CJ. Targeting caspase 8 to reduce the formation of metastases in neuroblastoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2006;10: 703-708.
272. Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, et al. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Rep*. 2012;1: 401-407.
273. van Raam BJ, Salvesen GS. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8

- dimer controls cell fate. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824: 113-122.
274. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 1998;94: 325-337.
275. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992;356: 314-317.
276. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998;9: 267-276.
277. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med*. 1999;190: 1891-1896.
278. Lemmers B, Salmena L, Bidere N, et al. Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. *J Biol Chem*. 2007;282: 7416-7423.
279. Barbero S, Barila D, Mielgo A, Stagni V, Clair K, Stupack D. Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *J Biol Chem*. 2008;283: 13031-13034.
280. Torres VA, Mielgo A, Barbero S, Hsiao R, Wilkins JA, Stupack DG. Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell*. 2010;21: 369-376.
281. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22: 50-55.
282. Jazirehi AR. Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2010;21: 805-813.
283. New M, Olzscha H, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol*. 2012;6: 637-656.
284. Rosato RR, Almenara JA, Maggio SC, et al. Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions. *Mol Cancer Ther*. 2008;7: 3285-3297.
285. Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*. 2003;278: 33714-33723.
286. Rasul A, Di J, Millimouno FM, et al. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecules*. 2013;18: 9382-9396.
287. Sun X, Ai M, Wang Y, et al. Selective induction of tumor cell apoptosis by a novel P450-mediated reactive oxygen species (ROS) inducer methyl 3-(4-nitrophenyl) propiolate. *J Biol Chem*. 2013;288: 8826-8837.
288. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60: 6-20.
289. Hu Y, Lu W, Chen G, et al. Overcoming resistance to histone deacetylase inhibitors in human leukemia with the redox modulating compound beta-phenylethyl isothiocyanate. *Blood*. 2010;116: 2732-2741.
290. Petrucci LA, Dupere-Richer D, Pettersson F, Retrouvey H, Skoulikas S, Miller WH, Jr. Vorinostat induces reactive

- oxygen species and DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *PLoS One*. 2011;6: e20987.
291. Yaseen A, Chen S, Hock S, et al. Resveratrol sensitizes acute myelogenous leukemia cells to histone deacetylase inhibitors through reactive oxygen species-mediated activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Pharmacol*. 2012;82: 1030-1041.
292. Portanova P, Russo T, Pellerito O, et al. The role of oxidative stress in apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Int J Oncol*. 2008;33: 325-331.
293. Basu HS, Mahlum A, Mehraein-Ghomi F, et al. Pretreatment with anti-oxidants sensitizes oxidatively stressed human cancer cells to growth inhibitory effect of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67: 705-715.
294. Nihal M, Roelke CT, Wood GS. Anti-melanoma effects of vorinostat in combination with polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Pharm Res*. 2010;27: 1103-1114.
295. Stucki M, Jackson SP. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5: 534-543.
296. Diavolitsis V, Boyle J, Singh DK, Small W, Jr. The role of adjuvant radiation in endometrial cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2009;23: 342-349.
297. Jerezek-Fossa BA. Postoperative irradiation in endometrial cancer: still a matter of controversy. *Cancer Treat Rev*. 2001;27: 19-33.
298. Zivanovic O, Carter J, Kauff ND, Barakat RR. A review of the challenges faced in the conservative treatment of young women with endometrial carcinoma and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;115: 504-509.
299. Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. *Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma*. *Lancet*. 2000;355: 1404-1411.
300. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, et al. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2004;92: 744-751.
301. Du XL, Jiang T, Wen ZQ, Li QS, Gao R, Wang F. Differential expression profiling of gene response to ionizing radiation in two endometrial cancer cell lines with distinct radiosensitivities. *Oncol Rep*. 2009;21: 625-634.
302. Yu H. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage. *Chin J Cancer Res*. 2012;24: 83-89.
303. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481: 306-313.
304. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;34: 251-266.
305. Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer*. 1999;6: 41-44.
306. Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 4032-4037.

307. Rantanen V, Grenman S, Kulmala J, Salmi T, Grenman R. Radiation sensitivity of endometrial carcinoma in vitro. *Gynecol Oncol.* 1992;44: 217-222.
308. Leteurtre F, Li X, Gluckman E, Carosella ED. Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia.* 1997;11: 1681-1689.
309. Millet P, Granotier C, Etienne O, Boussin FD. Radiation-induced upregulation of telomerase activity escapes PI3-kinase inhibition in two malignant glioma cell lines. *Int J Oncol.* 2013;43: 375-382.
310. Dubner D, del Rosario Perez M, Michelin S, et al. Pharmacological inhibition of DNA repair enzymes differentially modulates telomerase activity and apoptosis in two human leukaemia cell lines. *Int J Radiat Biol.* 2004;80: 593-605.
311. Kurvinen K, Rantanen V, Syrjanen S, Johansson B. Radiation-induced effects on telomerase in gynecological cancer cell lines with different radiosensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Biol.* 2006;82: 859-867.
312. Akkose A, Omer B, Deniz G, Darendeliler E. Detection of DNA single-strand breaks and glutathione in mononuclear blood cells of radiotherapy technicians. *Addict Biol.* 2002;7: 409-414.
313. Eastman A, Barry MA. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest.* 1992;10: 229-240.
314. Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 1997;27: 155-174.
315. Wilson DM, 3rd. Processing of nonconventional DNA strand break ends. *Environ Mol Mutagen.* 2007;48: 772-782.
316. Koll TT, Feis SS, Wright MH, et al. HSP90 inhibitor, DMAG, synergizes with radiation of lung cancer cells by interfering with base excision and ATM-mediated DNA repair. *Mol Cancer Ther.* 2008;7: 1985-1992.
317. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science.* 2002;297: 547-551.
318. Lowndes NF, Murguia JR. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10: 17-25.
319. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, et al. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem.* 2003;278: 20303-20312.
320. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 2000;10: 886-895.
321. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59: 928-942.
322. Li LJ, Zhong LF, Jiang LP, Geng CY, Zou LJ. beta-Elemente radiosensitizes lung cancer A549 cells by enhancing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Phytother Res.* 2011;25: 1095-1097.
323. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;33: 781-796.
324. Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301: 133-142.

325. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, et al. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther.* 2007;6: 789-801.
326. Guo WF, Lin RX, Huang J, et al. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis. *Radiat Res.* 2005;164: 27-35.
327. Tamatani T, Takamaru N, Hara K, et al. Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor-kappaB activity in human oral cancer cells. *Int J Oncol.* 2013;42: 935-944.
328. Denlinger CE, Rundall BK, Keller MD, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small-cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2004;78: 1207-1214; discussion 1207-1214.
329. Kuroda S, Urata Y, Fujiwara T. Ataxia-telangiectasia mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 complex: promising targets for radiosensitization. *Acta Med Okayama.* 2012;66: 83-92.
330. Cerna D, Camphausen K, Tofilon PJ. Histone deacetylation as a target for radiosensitization. *Curr Top Dev Biol.* 2006;73: 173-204.
331. Baschnagel A, Russo A, Burgan WE, et al. Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown in vitro and as intracranial xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2009;8: 1589-1595.
332. Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol Cancer Ther.* 2006;5: 1967-1974.
333. Evans KN, Nguyen L, Chan J, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod.* 2006;75: 816-822.
334. Agic A, Xu H, Altgassen C, et al. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci.* 2007;14: 486-497.
335. Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS. Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2005;19: 2222-2233.
336. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11: 263-271.
337. Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A. Antineoplastic effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20: R31-47.
338. Zeleniuch-Jacquotte A, Gallicchio L, Hartmuller V, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of endometrial cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am J Epidemiol.* 2010;172: 36-46.
339. Vienonen A, Miettinen S, Blauer M, et al. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig.* United States, 2004:104-112.
340. Matusiak D, Murillo G, Carroll RE, Mehta RG, Benya RV. Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1{alpha}-hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* United States, 2005:2370-2376.

341. Luo W, Karpf AR, Deeb KK, et al. Epigenetic regulation of vitamin D 24-hydroxylase/CYP24A1 in human prostate cancer. *Cancer Res. United States: 2010 Aacr.*, 2010:5953-5962.
342. Fischer D, Becker S, Cordes T, et al. Vitamin D-24-hydroxylase in benign and malignant breast tissue and cell lines. *Anticancer Res. Greece*, 2009:3641-3645.
343. Bareis P, Bises G, Bischof MG, Cross HS, Peterlik M. 25-hydroxy-vitamin d metabolism in human colon cancer cells during tumor progression. *Biochem Biophys Res Commun. United States: 2001 Academic Press.*, 2001:1012-1017.
344. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57: 234-240.
345. Delvin EE, Arabian A. Kinetics and regulation of 25-hydroxycholecalciferol 1 alpha-hydroxylase from cells isolated from human term decidua. *Eur J Biochem.* 1987;163: 659-662.
346. Ellfolk M, Norlin M, Gyllensten K, Wikvall K. Regulation of human vitamin D(3) 25-hydroxylases in dermal fibroblasts and prostate cancer LNCaP cells. *Mol Pharmacol.* 2009;75: 1392-1399.