



Universitat de Lleida

Estudi del paper del TGF- β en la carcinogènesi causada per la deficiència de PTEN

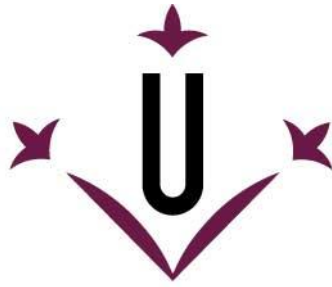
Isidre Felip Nogués

<http://hdl.handle.net/10803/668683>

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

TESI DOCTORAL

**Estudi del paper del TGF- β en la carcinogènesi
causada per la deficiència de PTEN**

Isidre Felip Nogués

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida Programa de Doctorat en Salut

Director/a

Francisco Javier Matias-Guiu Guia

Francisco Javier Dolcet Roca

Tutor/a

Francisco Javier Dolcet Roca

“Cada dia sabem més i entenem menys”

Albert Einstein

AGRAIMENTS

Agraïments

Sembla que no passa el temps, però no només passa, sinó que passa molt ràpid. Sembla com si fos ahir que baixava a Lleida, sembla com si fos ahir que el pollet deixava el niu, sembla com si fos ahir que em separava dels pares, sembla com si fos ahir que deixava Tremp... han estat cinc anys de tesi, cinc anys sembla molt, però són cinc anys que passen molt depressa, passen molt depressa quan coneixes a gent meravellosa, quan tens tantes vivències per explicar que sembla que portis una vida. Però tot i el temps, tot i els anys, tot té data de caducitat i sembla que ara ha arribat la de la meua tesi. He de dir que un no se n'adona del que és la tesi fins que no comença a escriure-la, pàgines i pàgines que sembla que mai s'hagin d'acabar; sempre falta alguna cosa, sempre és pot arreglar quelcom més... Però amb més o menys errades ja està llesta, la seva fi, el seu començament...

Ja us deixo d'explicar històries com si fos un padrí, em buido el llagimal i començo a recordar tots aquells que han passat, tots aquells que n'han format part, tots aquells que són i que sense ells no hauria estat possible aquesta tesi. Començaré per agrair al Dr. Matias-Guiu i al Dr. Dolcet que m'hagin acullit al seu grup de recerca en Patologia Oncològica i m'hagin donat l'oportunitat de fer aquesta tesi i de fer-la, molt important, cobrant! Després a tota aquella gent del grup, han estat uns quants, però cap menys important... primer la ja Dra. Cristina Mirantes, quines bronques que fotia... caràcter gallec, redéu! Però també té coses bones, li agraden els minions tant o més que a mi! I sempre tindrè una polsera feta amb la invitació de la seva boda, això no m'ho treu ningú! També la MaAlba o Alba o Dra. Dosil... no sé com vol que li diguin però sempre serà la MaAlba! Quants moments, quants experiments, quants ratolins, ella és l'hormigueta atòmica tu... no diu res i tic tic tic, quan te n'adones ja ho ha fet tot i cuidadín eh! Que sembla bona nena, però treu la cresta i et posa firmes!! Quins riures!! Sobretot recordeu no parlar-li quan posa una qPCR... si voleu seguir vius...! I tingueu un bon sistema d'antiincendis al laboratori si voleu continuar investigant... segur que la millor bombera no serà! Però i lo maja que és!! Després va arribar el Raúl, un brivón riojano, pim-pam i amb un moment ja es va posar a tope, és el dimoni de Tazmania del laboratori, no hi ha ni un moment que a la seva vora no hagi de patir per la teva vida!!! I espereu, perquè per dimonis després va arribar la Cristina Megino, que és de Cuenca tu, de Cuenca eh! De verdad!!!! Bé, de Cuenca o de no sé que de las Truchas...Peralejos, Pelarejos de las Truchas, gràcies Google. Allí, donde nace el Tajo. Vigileu que sembla basca, però no ho és! Vaia loca!! També van aparèixer per aquí uns que es fan dir Melanoma Team, així, com el Dream Team tu! Agarrate fuerte que vienen curvas... vaia uns... la Carla que era la ordenada... era... pobreta no sé com ha tingut tanta paciència per aguantar-nos, però Sant és l'Arturito que l'aguanta a ella!! La mallorquina que ens atiborraba de tantes sobrassades i ensaimades que ens portava... quasi cada setmana eh... no, és broma, anaven

Agraïments

amb comptagotes, però l' estimem igual. Ah, me n' oblidava, que ja és docotra també, Dra. Barceló! I sense mangarrufes!! El Pol, ojo amb el Pol eh... un fucker, no direm res més, que després això ho llegeix tothom, cotilles... amb un moment el rei dels melanomes, l' únic home del seu grup, tu diràs! I també hi ha l' Anna Mazius, Dra. Macià una noia de Barcelona tu, que ara cosexa! Sempre té coses bones per dir-te i si en té de dolentes també te les diu, la qüestió és dir alguna cosa... perquè a fe de Déu que callar, no calla!!! També tenim una basca, Dra. també, Dra. Urdanibia encara que de basca solo el nombre eh Izas!! Sempre està de bon humor deu ser el caràcter venezolano, guardanos uña de gato que queremos ser inmortales! També hi ha l' Andree, Dra. Yeramian, molt sensible i dentista, sempre va bé per les càries i empastos! Després han passat unes quantes tècnics, la Montse, la Marta, la Cate, el Noel i la Mónica! Ai Mónica, santa Mónica, el GPS del lab., inclús quan fa uns anys que no hi és ho continua sent!! Vaia xoni!! Però clar, de Fraga què esperes! Mónica te queremos, nos abandonaste, maldita! Ja està ho havia de dir!! Ara entra gent nova a fer la tesis, com l' Anna Ruiz, també de Barcelona... Anna fot-li canya que ara viene lo bueno! I per últim, crec que no em deixo a ningú més, la Núria ojo eh, encara que sigui més basta que el ferro corrugat també és doctora, Dra. Eritja, quantes doctores mare de Déu, m' explotarà el cap amb tanta sabiesa. L' Eritjeeeee és única, l' Eritjeee ha estat qui m' ha guiat (quan ha pogut), tot el que sé del laboratori ho he après d' ella, i tot el que no sé... també és culpa seva ajajajaja!! Si no fos per ella aquesta tesi no hauria existit, segur, perquè jo sóc un desastre de categoria, segur que jo solet no me n' hagués sortit! Però cuidadín, que la letra con sangre entra... vaia cleques... vaig pensar en comprar-me un casc, ja no sabia si estava amb un laboratori o amb una obra!! Pobreta, si és un tros de pa!! Gràcies per ensenyar-me, gràcies per tenir paciència amb mi i gràcies per ser com ets! Espero que algun dia puguis estar orgullosa de mi!! A tots vosaltres moltes gràcies per ser a part de companys, uns bons amics, per tots els moments, els bons i els dolents, per les festes, pels bons i els mals resultats, perquè sigui com sigui sempre som i serem PATONCOS de corasssong!!

A part de tots els del laboratori he conegut a mooolta gent, segur que m' oblidaré algú, ja sabeu que tinc memòria de peix... però faré un esforç i intentaré que no passi. Començarem per la resta de gent de la segona planta... Ara ja som poquets, l' Aida i la Gisel, les sanchises... vaia terremotos, semblen un matrimoni tu!! La Visa... vaia perill, de Mollerussa havia de ser, no hasse falta dessir nada más. Per allí també hi voltaven abans la Dra. Cornago i la Dra. Blasco, Marta i Nati, se os echa de menos!! Vaia fenomenals persones!! Vaia rises, la Nati no tant, que és una rància!! Yo también te quiero, Nati!! Marta, que aunque estés a tomar por culo se os quiere muchoo y a ese de Blanes que tienes por marido también! David, Dr.Alsina, volem pescar eh... que no nos engañen más, que nos digan la verdad... no teniu peixos a Blanes o no en pica

Agraïments

cap!! Després també hi ha els Mario's, liderados pel Dr. Encinas, la Marta i el Charli, vaia, vaia... vaia par de fiesteros!! Martita siempre llora, això segur que surt a moltes tesis! I el Carlos, ara Dj i Influencer, cuidadito! Deja de robar! Jajaja! Ara hi ha la Gisela que està donant-ho tot per treure una super tesis!

Em falta tanta gent que serà més llarg això que la introducció... totes les de Nefro! Maite, Aurora, Alicia, Núria, Sandra i Maria!! Sempre estan allí! Els MdN Pau i Rocandio, Dr. Rocandio, no he conegut persona més tranquil·la!!! L' Alba Blasco, que no parla molt i és una mica borde, però ens estimem igual! Tu segueix fent immunos! El Fernando, el líder de l' apnea, si no pots dormir, ell t' ho arregla! També hi ha l' Anabel i l' Ester, vaia team!! La Laura Colàs i la Debajo del Mar (Coral), vaia duo... elles i els seus ictus imparables! Laura, sort en tens del Juame! Sant baró! A la 3ra planta apareix el grup de CYC, la primera la Tania, però la tractarem a part... que tinc massa coses a dir, un altre capítol! El Marc, llàstima que sigui del Madrid, perquè en realitat és majo! El Roger, d' ell no cal que escrigui res, li dono una tauleta de xocolata i felicitat. L' Eva i la Marta, una tan jippie i l' altra tan pija! Que em caieu molt bé, pesades! I mooolta més gent que sou tots molt bona gent! Ah! Osti! La Loli, Loliiii que nos visita cada tarde, como la queremos!! Loli por muchos años!

Ara el torn dels amics del gym, no us penseu que no m' heu hagut d' aguantar també, prou bé que ho sabeu vaia xapes els hi he fotut amb la tesi, pobres!! Luz, Juan, JuanFran, Mariona, Ester, Òscars, Joan, Elena, Cris, Raul, Jordi... quants litres d' aigua hem perdut junts, quantes aventures! No fa molt temps, però ha estat molt intens!! No canvieu!!

Els meus amics de tota la vida Albert i David... buff... no vull ni pensar el temps que fa que ens coneixem, no vull ni recordar tot el que hem passat junts, bestiades i animalades, coses bones i dolentes... mare de Déu, com ens hem fet tan vells?? Després va aparèixer Miqui, deixa ja l' ordinador, viciao! Vaia panda... vaia peligro!! També hi ha les nenes, Tania, Laura, Cristina... sempre sereu les nenes, ya lo siento!

La meva família, a tots: pare, mare, vosaltres sempre heu estat allí, des del primer dia (quin remei eh!). M' heu fet el que sóc, m' heu ensenyat el que sé... només les coses bones, les dolentes ja les he après jo sol! Gràcies per tot el que heu fet sempre per mi, gràcies i gràcies... Per molts cops que ho escrigui, mai us ho podré agrair. Sempre m' heu donat l' oportunitat de fer el que he volgut i gairebé sempre m' heu recolzat en les meves decisions, fossin bones o no tan bones; perquè al cap i a la fi això és el que sóc, les decisions que he pres durant la meva vida! Al meu tiet i a la meva tieta, a les meves padrines, cosins i cosines; tots vosaltres sou una part de mi i sempre ho sereu, això mai ningú ho podrà canviar!!!

Agraïments

A la meva família política! Antonio, Ovidia, Joel i toooooots els allegados, que són uns quants, moltes gràcies per ara formar part de la meva família, per acollir-me i per fer-me sentir un més dels vostres.

Tania, estimada, ara ha arribat el teu torn, et pensaves que no arribaria mai eh!! Doncs aquí estàs!! Vaia, vaia, qui ens ho havia de dir??!! El meu pilar, la meva companya de viatge, d' aventures, d' experiències, de moments i de vivències!! Mil gràcies!

Per últim, al meu avi, padrí Llorenç, fa poc que ens has deixat... sé que estaries granment orgullós d' aquest moment i no hi ha paraules per descriure la pena que em fa que no en puguis ésser partícep! Sempre hem tingut una relació molt estreta i sempre ens hem dit tot el que ens havíem de dir, meló em deies... i tu eres la meva síndria! Sempre seràs present en mi, en el meu cor, en la meva ànima... per tu, padrí!

INDEX

INDEX

AGRAIMENTS.....	4
INDEX.....	1
Abreviatures.....	2
Resums.....	7
Introducció.....	15
1. Úter i endometri.....	17
1.1 Descripció, anatomia i histologia.....	17
1.2 Polaritat cel·lular de l' endometri.....	21
1.3 Lesions premalignes de l' endometri.....	23
1.4 El Càncer d' endometri.....	26
2. La via PI3K/AKT.....	33
2.1 Descripció.....	33
2.2 Components de la via PI3K/AKT.....	33
2.3 El supressor tumoral PTEN.....	35
2.4 La via PI3K/AKT i el càncer d' endometri.....	37
3. El TGF- β	39
3.1 Família del TGF- β	39
3.2 Senyalització canònica del TGF- β	41
3.3 Senyalització No canònica del TGF- β (No Smad).....	43
3.4 Funcions del TGF- β com a supressor tumoral.....	48
3.5 Efectes tumorogènics del TGF- β	54
3.6 Alteracions de la via TGF- β en càncer.....	57
3.7 Efectes del TGF- β en l' endometri.....	60
Hipòtesi i Objectius.....	61
Materials i mètodes.....	63
1. Tècniques de biologia cel·lular.....	65
1.1 Material i reactius usats en els experiments amb cultius cel·lulars.....	65

Índex

1.2	Cultius de línies tumorals.....	65
1.3	Aïllament de cèl·lules epitelials d'endometri murí i establiment de cultius en dues dimensions (2D). i en tres dimensions (3D)	66
1.4	Avaluació de la proliferació mitjançant l'assaig d'incorporació de BrdU	67
1.5	Anàlisi de la mida glandular dels esferoides	67
1.6	Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst i quantificació de caspasa 3 activa	68
1.7	Producció de lentivirus	68
2.	Animals d' experimentació	70
2.1	Consideracions prèvies	70
2.2	Soques de ratolins emprades	71
2.3	Genotipatge i sexatge	73
3.	Tècniques de bioquímica i biologia molecular.....	76
3.1	PCR a temps real quantitativa	76
3.2	Immunodetecció de proteïnes	78
3.3	Construccions plasmídiques	82
3.4	Immunoprecipitació de cromatina.....	83
4.	Histologia i Immunohistoquímica.....	84
4.1	Histologia bàsica.....	84
4.2	Immunohistoquímica	85
5.	Taula d' anticossos	85
	Resultats	89
1.	Estudi dels efectes del tgf- β en cultius tridimensionals d' endometri	91
	El TGF- β induïx mort apoptòtica en les cèl·lules epitelials endometrials polaritzades.....	91
	La deficiència d' Smad3 impedeix l' apoptosi induïda pel TGF- β i augmenta la proliferació cel·lular.....	97
2.	Estudi de la interacció del tgf- β i la via PI3K/AKT en la carcinogènesis endometrial	103
	Smad3 regula l' expressió de pten i l' activació de la via pi3K/akt.....	103
	L' expressió de pten controlada per smad3 regula la proliferació cel·lular i la mort apoptòtica induïda pel TGF- β a través d' un mecanisme dependent de la via PI3K/AKT	110

Índex

La deficiència de pten comporta una fosforilació i una localització nuclear constitutiva d' smad2/3	117
La localització nuclear d' Smad3 bloqueja la proliferació cel·lular en cèl·lules deficientes per pten	122
L' activació de la via de senyalització PI3k/akt/mtor provoca la localització nuclear d' smad2/3 després de la supressió de pten.....	127
La inhibició de la senyalització per pi3k/akt/mtorc1 disminueix la proliferació cel·lular i restaura l' apoptosi induïda pel tgf- β en cèl·lules deficientes per pten	134
3. Estudi dels efectes de la polaritat cel·lular sobre la senyalització pel TGF- β i el seu paper en la carcinogènesis endometrial	139
La pèrdua de polaritat cel·lular canvia l' efecte pro-apoptòtic del TGF- β per un efecte inductor d' EMT	139
La pèrdua de la polaritat cel·lular causada per la falta de matriu extracel·lular activa les vies de senyalització PI3K/Akt i ERK/MAPKs.....	142
El TGF- β provoca EMT en cèl·lules epitelials no polaritzades a través d' un mecanisme ERK-dependent.....	143
La inhibició de la PI3K restaura l' apoptosi induïda pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades en absència de matriu extracel·lular	145
Discussió	147
1. L' apoptosi induïda pel TGF- β en l' endometri depèn de l' activitat de la via PI3K/Akt....	149
2. Interacció de la via del TGF- β i la via PI3K/Akt en la carcinogènesis endometrial.....	151
3. La matriu extracel·lular regula la funció del TGF- β sobre les cèl·lules endometrials	156
Conclusions	159
Referències.....	163
Annex.....	175

ABREVIATURES

Abreviatures

2D: bidimensional

3D: tridimensional

4EBP1/EIF4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

Akt/PKB: protein kinase B

Alk5: activating receptor-like kinase 5

APC: APC regulator of Wnt signaling pathway

ART-5: ADP-Ribosyltransferase 5

ATF3: activating transcription factor 3

BAX: Bcl-2 associated X protein

bHLH: basic helix-loop-helix

BIK: Bcl-2 interacting killer

BIM: Bcl-2 Interacting mediator of cell death

BMF: Bcl-2 modifying factor

Bmper: BMP binding endothelial regulator

BMPs: bone morphogenetic proteins

BSA: albúmina de serum boví

CEE: carcinoma endometrial endometriode

ChIP: chromatin immunoprecipitation

CK1: casein kinase 1

CTNNB1: catenin beta 1

CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12

DAPK: death-associated protein kinase

DAXX: death domain associated protein

Abreviatures

DCC: dextran-coated charcoal-stripped serum

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimetilsulfòxid

DNA: àcid desoxirribonuclèic

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic

EGF: epidermal growth factor

EIN: neoplasia intraepithelial d' endometri

EMT: epithelial to mesenchymal transition

ERK: extracellular-signal-regulated-kinase

FBSi: inactive fetal bovine serum

FBX7: F-Box protein 7

FBXW7: F-Box and WD repeat domain containing 7

FGF2: fibroblast growth factor 2

FOXO: forkhead Box O

GDFs: growth differentiation factors

Grb2: growth factor receptor binding protein 2

GSK3: glycogen synthase kinase 3

GTP: guanosin trifosfat

HER2: Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2

HIF-1 α : hypoxia inducible factor 1 subunit alpha

hMLH1: MutL homolog 1

HRP: horseradish peroxidase

HS: horse serum

Abreviatures

IL-8: interleuquina 8

ITS: insulin transferrin sodium-selenite

JNK: c-Jun N-terminal kinase

Klf5: Kruppel like factor 5

LEF-1: lymphoid enhancer-binding factor 1

MAPK: mitogen-activated protein kinases

MH1: mad homology 1

MIS: müllerian inhibiting substance

mRNA: àcid ribonucleic missatger

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1

MTT: bromur de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol

P16INK4A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-like protein

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PDGF- β : platelet-derived growth factor subunit beta

PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase 1

PDVF: fluorur de polivinilidè

PEI: polietilenimina

PFA: paraformaildehid

PHTS: PTEN hamartoma tumors syndromes

PI: fosfatidylinositol

PI3K: fosfatidylinositol 3 kinase

PIN: neoplasia intraepithelial de pròstata

POLE: DNA polymerase epsilon catalytic subunit protein

Abreviatures

PP2R1A: protein phosphatase 2 scaffold subunit alpha

PPM1A: protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1A

PTEN: phosphatase and tensin homolog 10

Rho: ras homologous

Rheb: ras-related GTPase

RNA: àcid ribonuclèic

RPL22: ribosomal protein L22

S6K: ribosomal protein P70S6K

SDS: sodium dodecyl sulphate

Shc: src homology domain 2 containing

SHIP: signaling inositol polyphosphate 5 phosphatase SIP-145

Smad: suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous

SMURF: Smad specific E3 ubiquitin protein ligase

SPJ: síndrome de poliposis juvenil

TAK1/MAP3K7: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7

TBS: Tris-buffered saline

TCGA: The Cancer Genoma Atlas Research Network

TGF- α : transforming growth factor alpha

TGF- β : transforming growth factor beta

TIEG1: TGF- β inducible early response gene

TRAF: TNF-R-associated factor

TSC: tuberous sclerosis complex

VEGF: vascular endothelial growth factor

Abreviatures

XIAP: X-linker inhibitor of apoptosis

ZEB: zinc finger E-box-binding homeobox

ZO1: zona occludens protein 1

RESUMS

La via del TGF- β i la via PI3K/Akt/mTROC1 són dos importants reguladors de l'homeòstasi cel·lular de les cèl·lules endometrials. Alteracions en elements d'aquestes dues vies s'han associat a processos relacionats amb la carcinogènesi endometrial. Per una banda, la via PI3K/Akt és una de les principals reguladores de la proliferació cel·lular en l'endometri, aquesta via es troba alterada en un gran nombre de tumors endometrials, tant per alteracions que li confereixen guany de funció com per alteracions que provoquen la pèrdua del seu principal inhibidor, Pten. Per altra banda, la via TGF- β /Smad també és capaç de regular la proliferació cel·lular en un gran nombre de teixits, el seu paper en quan a aquesta regulació és controvertit ja que pot actuar tant com a supressor tumoral com a un potent inductor de l'EMT i la metastàsis, tot depenent del context cel·lular sobre el qual actua. És per això, que en aquesta tesi s'analitza l'efecte del TGF- β en el mateix tipus cel·lular (cèl·lules epitelials d'endometri) però en dos contextos diferents, un en cultiu tridimensional ben polaritzat gràcies a la presència de matriu extracel·lular i un altre en cultiu bidimensional amb una polarització cel·lular deficient.

En els últims temps s'han descrit nombrosos mecanismes d'interacció entre aquestes dues vies que intenten explicar els efectes coordinats que es donen entre la via PI3K/Akt i la del TGF- β en processos tals com proliferació i supervivència cel·lular. En aquesta tesi s'han estudiat els efectes de la polaritat cel·lular i de les alteracions en la via PI3K/Akt i TGF- β /Smad en la proliferació i la supervivència de les cèl·lules epitelials d'endometri, així com també el seu paper en el desenvolupament i la progressió del càncer endometrial. Per assolir aquests objectius s'han utilitzat models murins genèticament modificats i cultius tridimensionals de cèl·lules endometrials.

En el cas dels cultius tridimensionals de cèl·lules d'endometri normals el TGF- β és capaç d'induir una mort cel·lular apoptòtica. En canvi, en cultius deficientes en Smad3 o Pten, hi ha una inhibició total de la mort induïda per TGF- β i un marcat increment de la proliferació cel·lular. Aquests resultats recolzen un paper de supressor tumoral del TGF- β quan actua sobre cèl·lules d'endometri, i que alteracions moleculars que afecten a la seva senyalització resulten en l'adquisició de resistència a l'apoptosi i en un increment de la proliferació cel·lular, dos de les característiques fonamentals dels processos oncogènics. A nivell molecular, s'han estudiat les possibles interaccions entre PTEN i les Smads. En aquest sentit, els resultats demostren que, per una banda, Smad3 regula de forma directa la transcripció de Pten i, per una altra banda, que PTEN regula l'activació de les Smads, establint-se així un bucle de regulació entre ambdues vies que controla la proliferació cel·lular i condiona la funció de supressor tumoral en l'endometri.

En la segona part d' aquesta tesi, s' han estudiat els efectes de la presència de matriu extracel·lular i l' establiment d' una correcta polaritat cel·lular en relació amb els efectes del TGF- β en cèl·lules endometrials. A diferència del efectes observats en cultius tridimensionals, la manca de matriu extracel·lular i la consegüent pèrdua de la polaritat cel·lular fa que l' addició del TGF- β en aquestes cèl·lules canviï completament la resposta cel·lular apoptòtica per una inducció de la transició epiteli-mesènquima i una frenada en la proliferació. A nivell molecular, s' ha demostrat que l' absència de matriu extracel·lular causa una sobre-activació de les vies PI3K/Akt i ERK/MAPK, resistència a l' apoptosi induïda pel TGF- β i una promoció de la transició epiteli-mesènquima. Aquests resultats demostren que el correcte establiment de la polaritat cel·lular gràcies a la presència de matriu extracel·lular pot actuar com a un important supressor tumoral.

La vía del TGF- β y la vía PI3K/Akt/mTROC1 son dos importantes reguladores de la homeostasis celular de las células endometriales. Alteraciones en elementos de estas dos vías se han asociado a procesos relacionados con la carcinogénesis endometrial. Por un lado, la vía PI3K/Akt es uno de los reguladores principales de la proliferación celular en el endometrio, esta vía se encuentra alterada en un gran número de tumores endometriales, bien por alteraciones que le confieren ganancia de función como también por alteraciones que provocan la pérdida de su principal inhibidor, Pten. Por otra parte, la vía TGF- β /Smad también es capaz de regular la proliferación celular en un gran número de tejidos, su papel en esta regulación es controvertido ya que puede actuar tanto como supresor tumoral o como un potente inductor de la EMT y la metástasis, dependiendo del contexto celular en el que actúa. Es debido a esta dicotomía, que en esta tesis se analiza el efecto del TGF- β sobre el mismo tipo celular (células epiteliales endometriales) pero en dos contextos diferentes, uno en cultivo tridimensional bien polarizado y otro en cultivo bidimensional con una polarización celular deficiente.

En los últimos tiempos se han descrito numerosos mecanismos de interacción entre estas dos vías que intentan explicar los efectos coordinados que se dan entre la vía PI3K/Akt y la del TGF- β en procesos tales como proliferación y supervivencia celular. En esta tesis se han estudiado los efectos de la polaridad celular y de las alteraciones en la vía PI3K/Akt y TGF- β /Smad en la proliferación y la supervivencia de las células epiteliales de endometrio, así como también su papel en el desarrollo y progresión del cáncer endometrial. Para alcanzar estos objetivos, se han utilizado modelos murinos genéticamente modificados y cultivos tridimensionales de células endometriales.

En el caso de los cultivos tridimensionales de células de endometrio normales el TGF- β es capaz de inducir una muerte celular apoptótica. En cambio, en cultivos deficientes en Smad3 o Pten, hay una inhibición total de la muerte inducida por TGF- β y un marcado incremento de la proliferación celular. Estos resultados apoyan un papel de supresor tumoral del TGF- β cuando actúa sobre células de endometrio, así como el hecho que alteraciones moleculares que afectan a su señalización resultan en la adquisición de resistencia a la apoptosis y en un incremento de la proliferación celular, dos de las características fundamentales de los procesos oncogénicos. A nivel molecular, se han estudiado las posibles interacciones entre PTEN y las Smads. En este sentido, los resultados demuestran que Smad3 regula de forma directa la transcripción de Pten y, por otra parte, que PTEN regula la activación de las Smads, estableciéndose así un bucle de regulación entre ambas vías que controla la proliferación celular y condiciona la función de supresor tumoral en el endometrio. En la segunda parte de esta tesis, se han estudiado los

efectos de la presencia de matriz extracelular y el establecimiento de una correcta polaridad celular en relación con los efectos del TGF- β en células endometriales. A diferencia de los efectos observados en cultivos tridimensionales, la falta de matriz extracelular y la consecuente pérdida de la polaridad celular hace que la adición del TGF- β en estas células cambie completamente la respuesta celular apoptótica por una inducción de la transición epitelio-mesénquima y provoque una parada en la proliferación. A nivel molecular, se ha demostrado que la ausencia de matriz extracelular causa una sobre-activación de las vías PI3K/Akt y ERK/MAPK, resistencia a la apoptosis inducida por TGF- β y una promoción de la transición epitelio-mesénquima. Estos resultados demuestran que el correcto establecimiento de la polaridad celular gracias a la presencia de matriz extracelular puede actuar como un importante supresor tumoral.

The TGF- β and the PI3K/Akt/mTROC1 pathways are two important regulators of the homeostasis of endometrial cellular cells. Alterations in the elements of these two pathways have been associated with endometrial carcinogenesis. On the one hand, the PI3K/Akt pathway is one of the main regulators of cell proliferation in the endometrium, this pathway is altered in a large number of endometrial tumors, both due to gain of function alterations and also because a loss of its main inhibitor, Pten. On the other hand, the TGF- β /Smad pathway is also capable of regulating cell proliferation in a large number of tissues. Its role in cell regulation is controversial cause it can act as a tumor suppressor or as a powerful inducer of EMT and metastasis, depending on the cellular context on which it acts. That is why this thesis analyzes the effect of TGF- β in the same cell type (endometrial epithelial cells) but in two different contexts, one in a well-polarized three-dimensional culture and another in a two-dimensional culture with poor cellular polarization.

In recent times, many interaction mechanisms have been described between these two pathways that attempt to explain the coordinated effects which occurs between the PI3K/Akt and the TGF- β pathway that regulate processes such as proliferation and cell survival. In this thesis, the effects of cellular polarity and alterations in the PI3K/Akt and the TGF- β /Smad pathways have been studied in terms of proliferation and survival on endometrial epithelial cells, as well as its role in the development and progression of endometrial cancer. To achieve these objectives, genetically modified murine models and three-dimensional endometrial cell cultures have been used.

In the case of three-dimensional cultures of normal endometrial cells, TGF- β is capable to induce apoptotic cell death. However, in Smad3 or Pten deficient cultures, there is a total inhibition of the apoptotic cell death induced by TGF- β and a marked increase in cell proliferation. These results support a tumor suppressor role of TGF- β when acting on endometrial cells, and that molecular alterations that affect its signaling can result in the acquisition of resistance to apoptosis and an increased cell proliferation, two of the fundamental characteristics of oncogenic processes. At a molecular level, the possible interactions between PTEN and Smads have been studied. In this terms, the results show that Smad3 directly regulates Pten transcription and, on the other hand, that PTEN regulates the activation of the Smads, establishing a regulation loop between these two pathways that control cell proliferation and tumor suppressor functions in the endometrium. In the second part of this thesis, the effects of the presence of extracellular matrix and the establishment of correct cellular polarity in relation to TGF- β effects on endometrial cells have been studied.

Resums

Unlike the effects observed in three-dimensional cultures, the lack of extracellular matrix and the consequent loss of cellular polarity causes a completely different response to TGF- β addition to these cells changing the apoptotic cell response to an induction of the epithelial-mesenchymal transition leading a brake in cell proliferation. At a molecular level, the absence of the extracellular matrix has been shown to cause an over-activation of the PI3K/Akt and the ERK/MAPK pathways, resistance to apoptosis induced by TGF- β and a promotion of the epithelial to mesenchymal transition. These results show that the correct establishment of cellular polarity due to the presence of cell matrix can act as an important tumor suppressor.

INTRODUCCIÓ

1. ÚTER I ENDOMETRI

1.1 DESCRIPCIÓ, ANATOMIA I HISTOLOGIA

L'úter està dividit en dos segments anatòmics: cos i coll o cèrvix (Figura 1). La paret del cos uterí està formada per tres capes, l'endometri, el miometri i la capa adventícia o serosa (*perimetrium*). El principal component de la part uterina és el miometri, revestit per una mucosa, l'endometri.

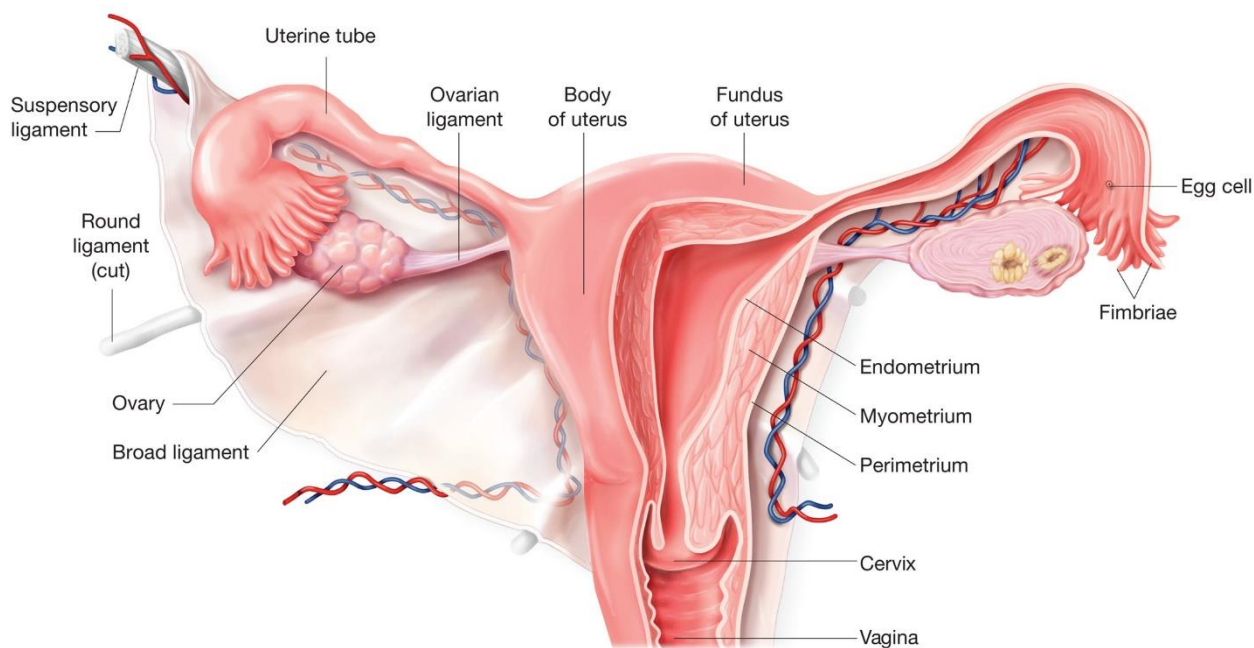


Figura 1. Representació de l'aparell genital femení. Adaptat d' *Anatomy-Medicine*.

El miometri comprèn tres capes musculars llises mal definides. La central és gruixuda i es disposa de forma circular amb abundants vasos sanguinis, també anomenat estrat vascular. Les capes externa i interna contenen fibres musculars disposades en forma obliqua o longitudinal. Durant l'embaràs, el múscul llis miometrial augmenta de mida (hipertròfia) i s'hi produeix

Introducció

també un increment del número de fibres (hiperplàsia). La inhibició de la contracció miometrial durant l' embaràs és controlada per la relaxina, una hormona peptídica produïda per l' ovari i la placenta. La contracció miometrial durant el part es controlada per l' oxitocina, una hormona peptídica secretada per la neurohipòfisis.

L' endometri correspon a un revestiment epitelial cilíndric simple associat a glàndules endometrials tubulars simples i a la làmina pròpia, anomenada estroma endometrial (Figura 2). A nivell funcional, l' endometri està compost per dues capes, una capa funcional superficial, que es perd durant la menstruació i una capa basal, que es conserva i serveix per a regenerar una nova capa funcional després de la menstruació. Les característiques microscòpiques de la capa funcional sofreixen modificacions durant el cicle menstrual, que dura aproximadament 28 dies.

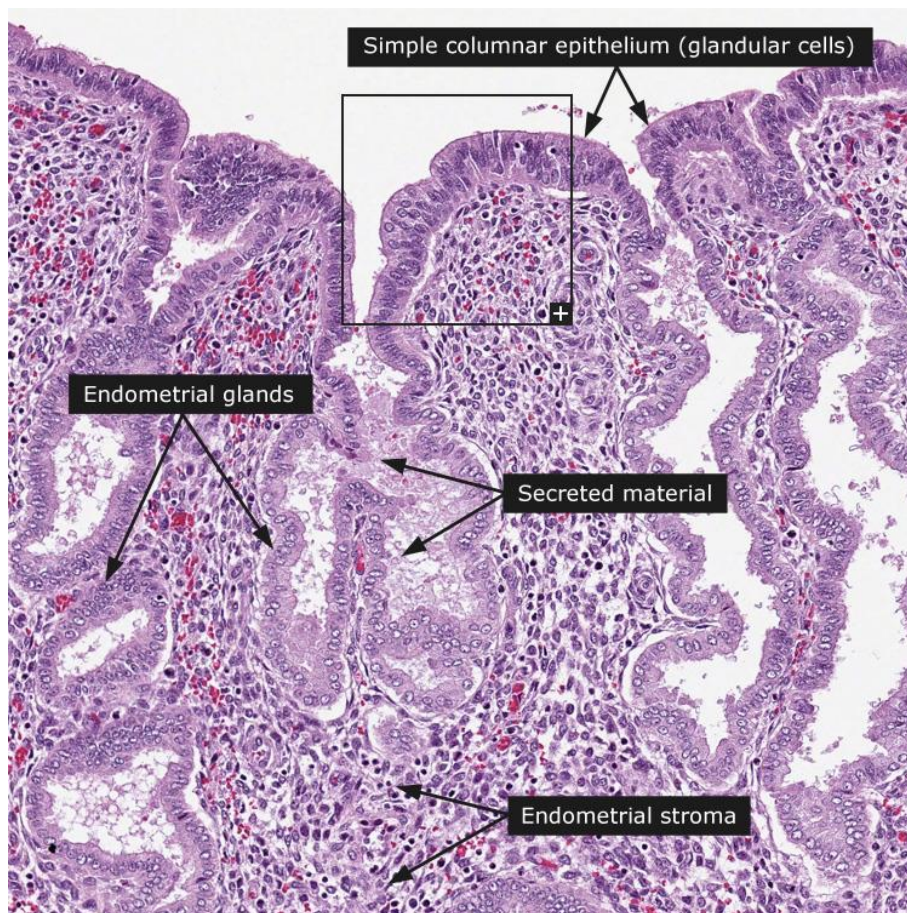


Figura 2. Tall histològic endometrial humà. Adaptat de *The human protein atlas*.

Introducció

Durant el cicle menstrual (Figura 3) es produeixen quatre fases successives: la menstrual, la proliferativa, la secretora i la isquèmica. La fase menstrual (4-5 dies) és la fase inicial del cicle, la fase proliferativa (també anomenada fase estrogènica o fol·licular) dura uns 9 dies i durant aquesta fase l'espessor de l'endometri augmenta com a conseqüència de l'activitat estimuladora dels estrògens sintetitzats en els fol·licles ovàrics en desenvolupament. Durant aquest període és fàcil detectar mitosis en la làmina pròpia i l'epiteli. Les cèl·lules epitelials de l'epiteli glandular migren cap a dalt i les glàndules es tornen rectes i estretes. Passat el dia 14, en el que es produeix l'ovulació, l'endometri inicia la seva tercera fase progèstica o secretora, que dura uns 13 dies. Durant aquesta fase, les glàndules endometrials comencen la seva activitat secretora. El contorn de les glàndules tubulars es torna irregular i contornejat, l'epiteli de revestiment acumula glicogen i hi apareixen secrecions riques en glicogen i glicoproteïnes en la llum glandular. Els vasos sanguinis paral·lels a les glàndules endometrials augmenten la seva longitud i en la làmina pròpia s'hi reconeix un excés d'edema. La fase secretora és controlada per la progesterona i els estrògens produïts pel cos luti. Al final del cicle menstrual es produeix una involució del cos luti degut a una reducció de les concentracions en sang de les hormones esteroidees, fet que condueix a la fase isquèmica (d'un dia de durada). La reducció de la irrigació normal, que ocasiona una isquèmia intermitent, amb la seva conseqüent hipòxia determinen la necrosi de la capa funcional de l'endometri, que es descama durant la fase menstrual. Si es produeix un embaràs, les cèl·lules estromals de la làmina pròpia endometrial augmenten de mida i emmagatzemen lípids i glicogen en resposta a l'augment de les concentracions de progesterona. Aquest canvi en l'endometri es denomina reacció decidual ja que la capa funcional es desprèn com la decidua en el part.

Introducció

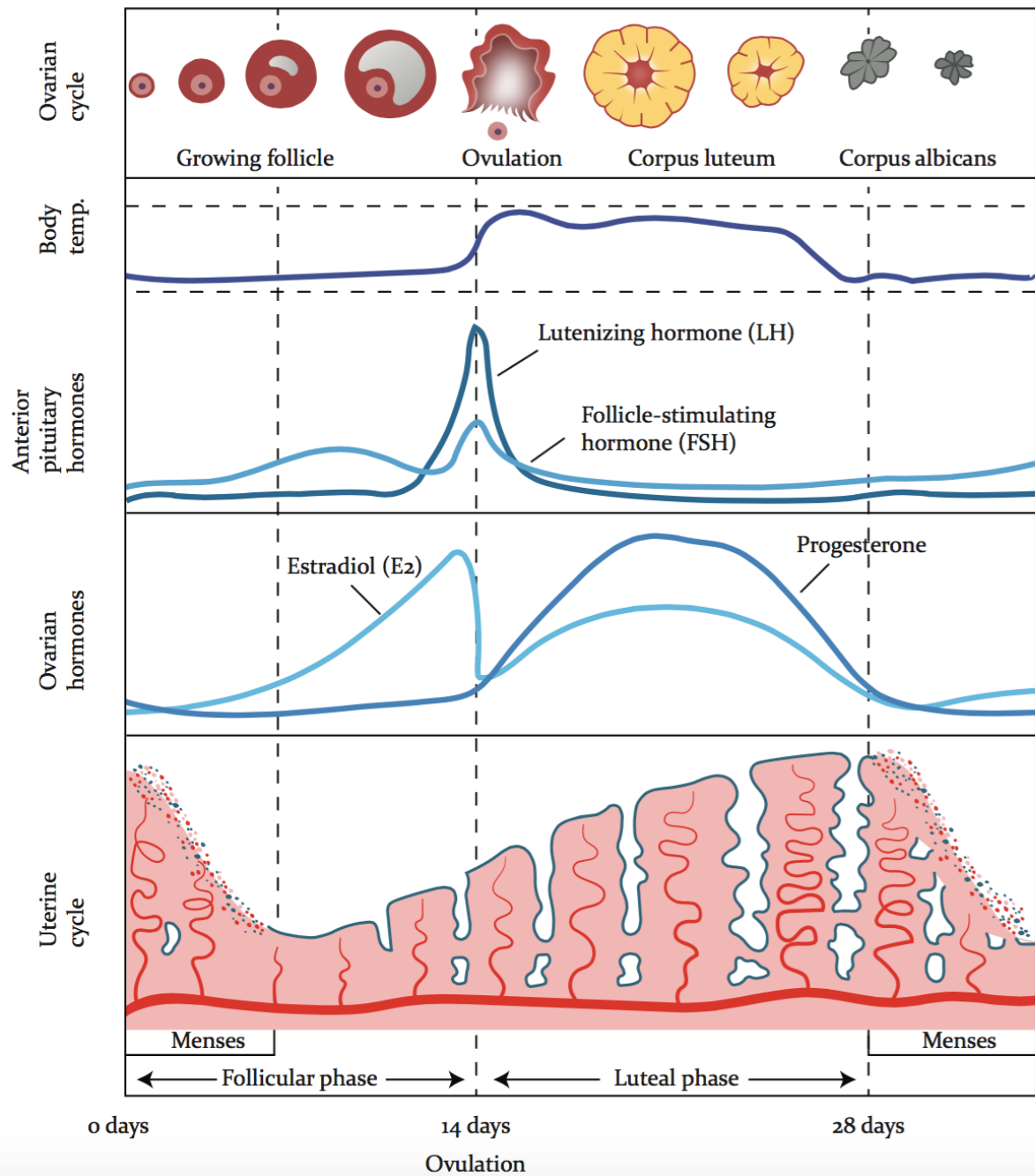


Figura 3. Representació del cicle menstrual femení. Adaptat de VIOS Fertility Institute.

1.2 POLARITAT CEL·LULAR DE L' ENDOMETRI

Els contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular són essencials per a mantenir la polaritat, l'estabilitat i la integritat cel·lular. A més, intervenen de forma activa en el transport de molècules dins i fora de les cèl·lules (Garcia, Nelson, and Chavez 2018). És degut a aquestes funcions que les unions i la correcta polaritat cel·lular tenen una influència cabdal en la fisiologia, l'homeòstasi i la remodelació del teixit endometrial. En el cas de l'endometri, la polarització cel·lular hi és especialment important ja que es tracta d'un teixit que experimenta molts canvis plàstics degut, principalment, al cicle menstrual o a una possible implantació embrionària (Murphy 2000). Per al manteniment d'aquesta correcta polaritat són essencials les unions intercel·lulars.

1.2.1 UNIONS INTERCEL·LULARS

En els últims anys, ha augmentat el coneixement sobre les molècules que contribueixen al manteniment de l'estructura, la funció i la regulació de les unions cel·lulars (Figura 4). Aquestes unions intercel·lulars es classifiquen principalment amb: unions estretes, unions adherents, desmosomes i unions *gap*. Les unions estretes es localitzen a la part superior de la membrana cel·lular lateral. Constitueixen una barrera selectiva amb les cèl·lules adjacents regulant i restringint el transport paracel·lular. A més, mantenen estrictament organitzat el compartiment apical i basolateral cel·lular (Zihni et al. 2016). En aquestes unions estretes s'hi han identificat una gran quantitat de proteïnes que ajuden a formar-les com ara les claudines, les occludines, ZO-1,-2 i -3 i MUPP1. De totes aquestes famílies de proteïnes les claudines constitueixen la família més gran, amb 26 membres diferents identificats en humans (Hartsock and Nelson 2008).

Per altra banda, les unions adherents i els desmosomes, es localitzen just per sota les unions estretes, també en la part lateral de la membrana plasmàtica. Les seves funcions principals són mantenir les cèl·lules veïnes unides, i ajudar a preservar la polaritat cel·lular i tissular. Aquestes unions, es donen gràcies a una família de proteïnes transmembrana anomenades cadherines que inclouen, clàssicament, 20 membres diferents en humans (Campbell, Maiers, and DeMali 2017). També hi participen components desmosomals com les desmogleïnes i les desmocollines (Garrod and Chidgey 2008). Les cadherines formen homodímers (depenents de calci) en l'espai intercel·lular (Garcia, Nelson, and Chavez 2018). Les cadherines clàssiques són: l'E-Cadherina (la qual és la més abundant en les unions adherents de les cèl·lules epitelials de l'endometri), la cadherina neuronal (N-cadherina) i la cadherina vascular (VE-cadherina).

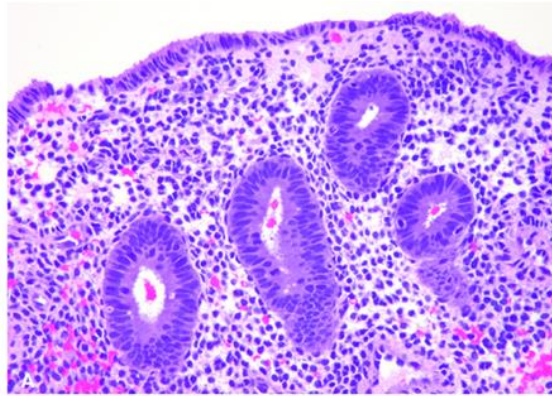
1.3 LESIONS PREMALIGNES DE L' ENDOMETRI

Les lesions premalignes són afectacions endometrials benignes que poden acabar desenvolupant, en menor o major mesura, càncer d' endometri. És per això que si es detecten han de ser avaluades per a la seva resecció i/o seguiment periòdic.

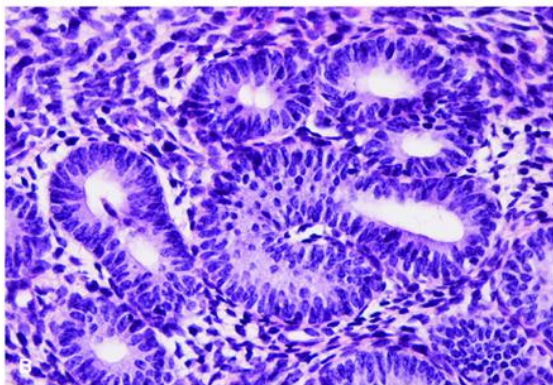
1.3.1 HIPERPLÀSIA ENDOMETRIAL

La hiperplàsia endometrial (Figura 5) és considerada una condició premaligna que apareix, normalment, com a resultat a una exposició anormal als estrògens o la a falta d' estimulació per progesterona. Aquesta condició acostuma a produir sangrat uterí, sobretot en dones perimenopàusiques, i cicles menstruals més curts als 21 dies normals. Es caracteritza per a presentar una remodelació de les glàndules uterines, una estructura cel·lular irregular, una disminució de l' estroma i una hiperproliferació tissular. Existeixen quatre tipus d' hiperplàsies endometrials: hiperplàsia simple amb o sense atípia i hiperplàsia complexa amb o sense atípia. Si s' observa l' evolució que seguirà aquest desordre trobem que l' 1% de les pacients amb hiperplàsia simple progressaran a carcinoma endometrial, el 3% de les pacients amb hiperplàsia complexa progressaran a càncer endometrial, el 8% de les pacients amb hiperplàsia simple amb atípia progressaran a càncer endometrial i el 29% de les pacients amb hiperplàsia complexa amb atípia també ho faran. Per tant, es tracta d' una lesió que requereix d' un seguiment periòdic de la pacient per a controlar-ne l' evolució.

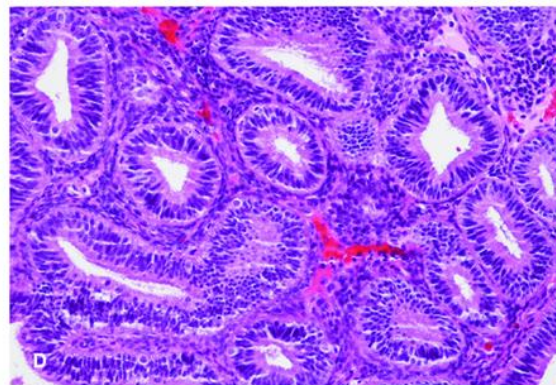
Introducció



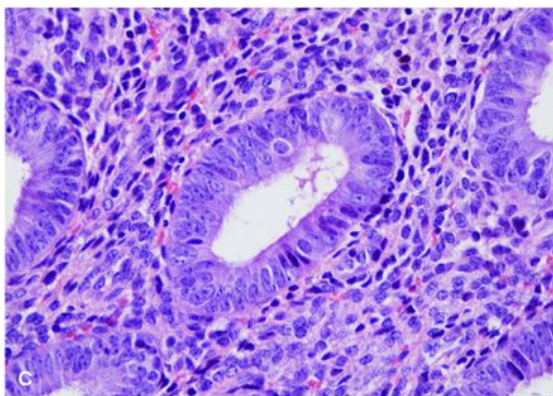
Normal proliferative endometrium



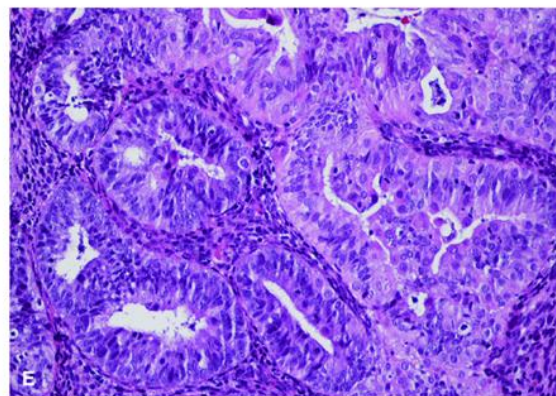
Simple hyperplasia



Complex hyperplasia



Simple hyperplasia with atypia



Complex hyperplasia with atypia

Figura 5. *Imatges representatives d' hiperplàsies endometrials. Adaptat de accessmedicine.mhmedical.com*

1.3.2 PÒLIPS ENDOMETRIALS

El creixement excessiu de l' endometri pot provocar l' aparició de pòlips. Els pòlips (Figura 6) són estructures que creixen en forma de dit i es troben adherides a la paret uterina. Es tracta de la lesió endometrial benigna més comú, malgrat que la seva etiologia encara no és del tot clara, s' han identificat alguns factors de risc que podrien provocar l' aparició d' aquestes estructures com ho són: l' obesitat, el tractament amb tamoxifè (per al càncer de mama), la teràpia hormonal post-menopàusica i tenir un historial familiar amb síndrome de *Lynch* o de *Cowden*. Els principals símptomes que produeixen els pòlips endometrials són: sangrat vaginal i períodes mensuals irregulars.

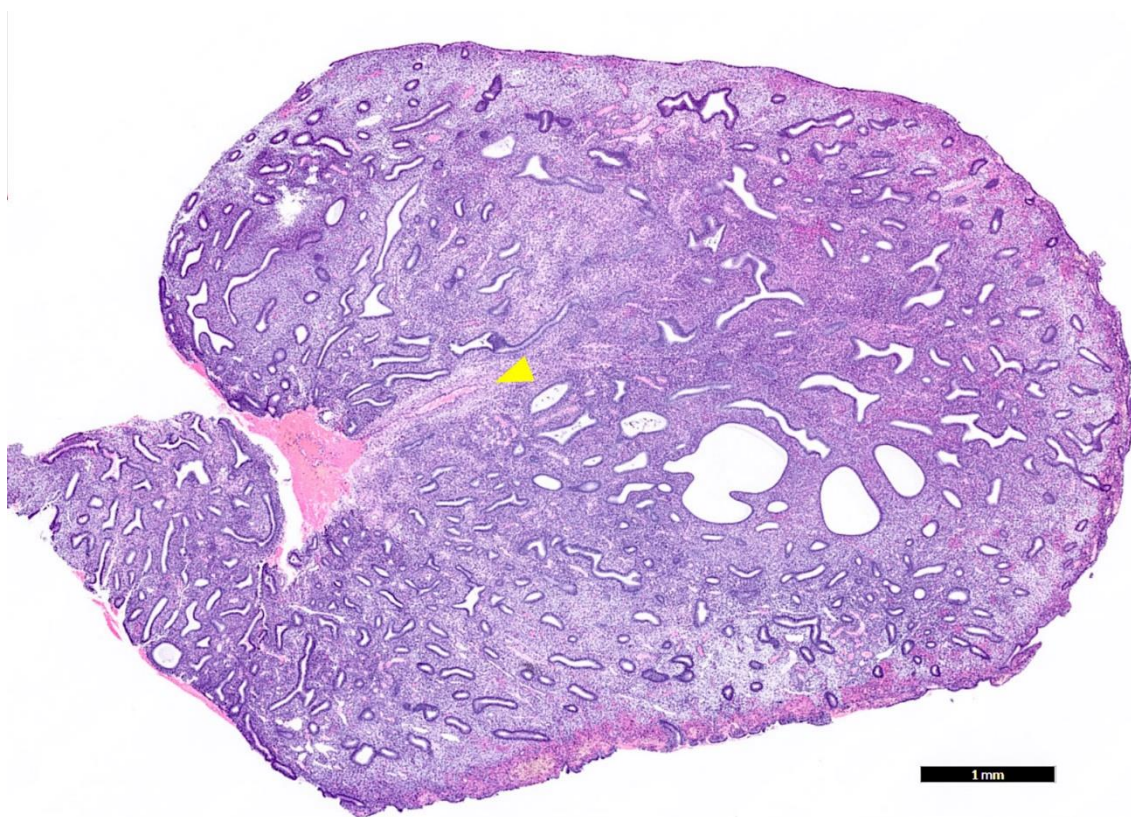


Figura 6. Representació de pòlip endometrials. Adaptat de *Pathology Outlines*.

1.4 EL CÀNCER D' ENDOMETRI

El càncer d' endometri és la patologia ginecològica més comú i el quart càncer més freqüent entre les dones d' Europa i Amèrica del Nord. Al voltant del 75% de les pacients amb càncer d' endometri són diagnosticades quan estan en un estadi primerenc de l' evolució tumoral; en aquests casos la supervivència a cinc anys està al voltant del 74-91%. Per aquelles dones que se' ls-hi detecta en estadi avançats, en canvi, la supervivència a 5 anys disminueix dràsticament fins al 20-26% en els càncers d' estadi IV (Quinn et al. 2006; R. L. Siegel, Miller, and Jemal 2019).

1.4.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER D' ENDOMETRI

En els Estats Units s' estima detectar 61.880 nous casos de carcinoma d' endometri i sarcomes uterins aquest 2019 i s' espera, malauradament, que 12.160 dones morin degut a aquestes afectacions durant el 2019 (Figura 7). El carcinoma d' endometri s' acostuma a detectar en dones que es troben al voltant dels 60 anys d' edat i és estrany que es doni en menors de 45 anys (Figura 8). Curiosament, es tracta d' un càncer que és més freqüent en dones blanques però la mortalitat és més elevada en dones de pell negra.

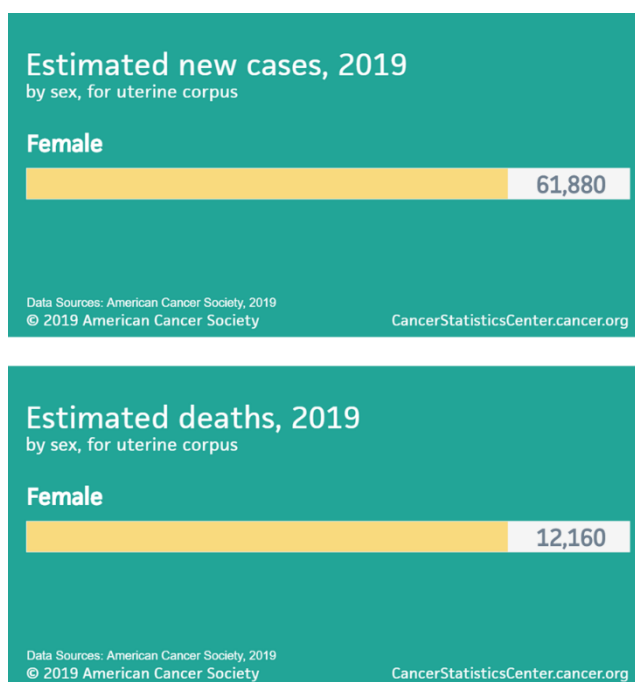


Figura 7. Nous casos i morts estimades per càncer de cos uterí als Estats Units durant el 2019.

Adaptat de American Cancer Society.

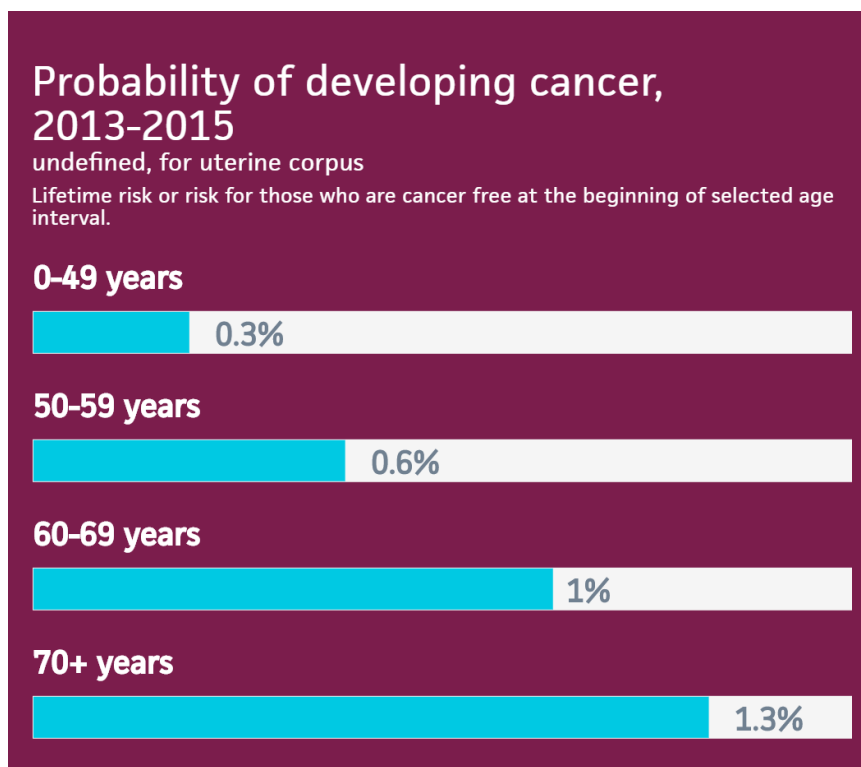


Figura 8. Probabilitat de desenvolupar càncer del cos uterí. Adaptat de American Cancer Society.

1.4.2 CLASSIFICACIÓ TRADICIONAL DEL CARCINOMA D' ENDOMETRI

Tradicionalment, els carcinomes d' endometri s' han classificat en tipus I i tipus II seguint la classificació de Bokhman (Bokhman 1983) (Figura 9), basada en observacions clíniques, endocrines i epidemiològiques. Així, els tumors endometrials de tipus I o endometrioides, són dependents d' estrògens i associats a la hiperplàsia endometrial, mentre que els de tipus II es tracta de tumors estrogen-independents i associats a l' atròfia endometrial (Bokhman 1983). Seguint únicament característiques histopatològiques, el carcinoma endometrial també es classifica en: carcinoma endometriode, carcinoma serós, carcinosarcoma o carcinoma de cèl·lules clares. Correlacionant aquestes dues classificacions s' interpreta que els càncers endometrials de tipus I tenen generalment histologia endometriode i que, per altra banda, els càncers endometrials de tipus II, generalment, presenten una histologia de carcinoma serós; tot i això, aquestes correlacions no són perfectes. En els darrers anys, i gràcies als nous coneixements obtinguts sobre els carcinomes d' endometri, s' ha vist que la classificació histològica no era suficient i que es requeria d' una classificació més sensible i acurada, la genòmica (Dedes et al. 2011).

Table 1 Classification of endometrial cancer		
	Type I	Type II
Phenotype	Younger age Obese Associated lipid and metabolic disturbances Thickened endometrium	Older age Nonobese Lack of associated lipid and metabolic disturbances Atrophic/transitional endometrium
Pathogenesis	Estrogen dependent	Estrogen independent
Histology	Endometrioid	Nonendometrioid
Differentiation	Well/moderately differentiated	Poorly differentiated
Prognosis	Good	Poor
Molecular Aberrations	PTEN, MSI, PI3K/AKT, KRAS	p53, Her2, PI3K/AKT, KRAS

Figura 9. *Classificació tradicional del carcinoma d' endometri. Segons fenotip, patogènesis, estudi histològic, diferenciació cel·lular, prognòsis i aberracions moleculars. Adaptat de Megan et al., 2018.*

1.4.3 CLASSIFICACIÓ GENÒMICA DEL CÀNCER D' ENDOMETRI

Gràcies a *The Cancer Genoma Atlas Research Network (TCGA)* es disposa d' una anàlisi genòmica i transcriptòmica dels càncers d' endometri. Per a que això fos possible, es va analitzar un gran set de càncers endometrials utilitzant tècniques de *next-generation sequencing*, anàlisi de metilació del DNA, arrais de proteïnes de fase reversa i anàlisi d' inestabilitat de microsatèl·lits. Aquestes anàlisis van establir 4 classes diferents de tumors endometrials (Figura 10).

1. **POLE (ultramutats):** es tracta de tumors caracteritzats per tenir un gran nombre de mutacions en el domini exonucleasa de la POLE58 (una subunitat de la polimerasa ϵ implicada en la replicació del DNA), algunes aberracions de número de còpies, transversions C-A, mutacions en PTEN, PIK3R1, PIK3XA, FBXW7 i KRAS. Aquests tipus de tumors tenen un bon pronòstic.
2. **Inestabilitat de microsatèl·lits (hipermutats):** aquells tumors endometrials caracteritzats per presentar una alta inestabilitat de microsatèl·lits degut a la metilació del promotor del gen reparador del DNA MLH1, una alta freqüència mutacional, aberracions de número de còpies, delecions del marc de lectura en RPL22, i mutacions en KRAS i PTEN.

3. **Baix número de còpies (endometrioids):** aquells tumors endometrioids normalment de grau 1 o 2 que presenten estabilitat de microsatèl·lits i una baixa freqüència de mutacions, caracteritzats principalment per mutacions freqüents en CTNNB1.
4. **Alt número de còpies (tipus serós o ECC de grau III):** tumors caracteritzats per una gran quantitat d' aberracions en el número de còpies i baixes ratios de mutacions, es veuen afectats TP53, FBX7 i PPP2R1A, de manera menys freqüent, PTEN i KRAS. Tenen mal pronòstic (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013).

	POLE (ultramutated)	MSI (hypermuted)	Copy-number low (endometrioid)	Copy-number high (serous-like)
Copy-number aberrations	Low	Low	Low	High
MSI/MLH1 methylation	Mixed MSI high, low, stable	MSI high	MSI stable	MSI stable
Mutation rate	Very high (232×10^{-6} mutations/Mb)	High (18×10^{-6} mutations/Mb)	Low (2.9×10^{-6} mutations/Mb)	Low (2.3×10^{-6} mutations/Mb)
Genes commonly mutated (prevalence)	POLE (100%) PTEN (94%) PIK3CA (71%) PIK3R1 (65%) FBXW7 (82%) ARID1A (76%) KRAS (53%) ARID5B (47%)	PTEN (88%) RPL22 (37%) KRAS (35%) PIK3CA (54%) PIK3R1 (40%) ARID1A (37%)	PTEN (77%) CTNNB1 (52%) PIK3CA (53%) PIK3R1 (33%) ARID1A (42%)	TP53 (92%) PPP2R1A (22%) PIK3CA (47%)
Histological type	Endometrioid	Endometrioid	Endometrioid	Serous, endometrioid, and mixed serous and endometrioid
Tumour grade	Mixed (grades 1-3)	Mixed (grades 1-3)	Grades 1 and 2	Grade 3
Progression-free survival	Good	Intermediate	Intermediate	Poor

The four genomic classes were identified by The Cancer Genome Atlas Network²¹ by combining information on mutations, copy-number aberrations, and microsatellite instability. General characteristics of the genomic classes are shown. Mb= megabase. MSI= microsatellite instability.

Figura 10. Classificació genòmica del carcinoma d' endometri. Establerta segons estudis genòmics i transcriptòmics. Adaptat de Murali et al., 2014.

1.4.4 VIES MOLECULARS IMPLICADES EN EL CARCINOMA D' ENDOMETRI

El carcinoma d' endometri engloba moltes vies de senyalització diferents les quals promouen la proliferació cel·lular i protegeixen les cèl·lules tumorals de la reacció immunitària i de la senyalització apoptòtica (McConechy et al. 2012, 2014; O'Hara and Bell 2012). Les vies de senyalització més importants involucrades en el carcinoma endometrial que es coneixen fins avui són: la via del factor 1 alfa induïble per la hipòxia (HIF-1)/VEGF, la via PI3K/Akt/mTOR, la via Ras/Raf/MEK/ERK, la via Wnt/ β -catenina, i la via Insulina/IGF-1.

1.4.4.1 Via HIF-1 α / VEGF

La supervivència a la hipòxia és una de les fites a la qual aspiren totes les cèl·lules tumorals, és per això que activen un seguit de factors de transcripció per a promoure una adaptació cel·lular a aquestes noves condicions microambientals. Els principals gens implicats en aquests processos són aquells que promouen la angiogènesis i la neovascularització, la invasió local i la metastasi distal (Harada et al. 2007; Semenza 2003). El HIF1 α s'ha detectat en tumors endometrials (Berg et al. 2016; Kato et al. 2006; Seeber et al. 2010), es tracta d'un factor de transcripció la funció principal del qual és activar un seguit de gens, entre els que s'hi troba el VEGF, que promouen la vascularització i la progressió tumoral (De Palma, Biziato, and Petrova 2017). Aquesta nova vascularització té com a objectiu aportar nutrients i oxigen al tumor, així com depurar els productes de rebuig cel·lular.

1.4.4.2 VIA RAS/RAF/MEK/ERK

La via Ras (Figura 11) s'ha vist també implicada en el carcinoma endometrial promovent la proliferació cel·lular (Nuria Eritja et al. 2017). Aquesta cascada de senyalització es veu activada per factors mitogènics, factors de creixement, citocines i interleuquines. Aquests factors interactuen amb els receptors de membrana RTKs en el càncer d'endometri activant aquesta via (L. E. Wang et al. 2012). Quan s'activa Ras, aquest és capaç d'interaccionar amb RAF, promovent-ne la seva fosforilació que a la vegada activarà MEK. Quan MEK és activa, fosforila la MAPK, ERK (Wu et al. 2017). També s'han descrit altres alteracions en la via de les MAPK com ho és una sobre-expressió dels seus receptors (Hoshino et al. 1999) o bé mutacions en el gen de K-RAS (Alexander-Sefre et al. 2003; Oda 2011). Totes elles encaminades a una hiper-activació de la via.

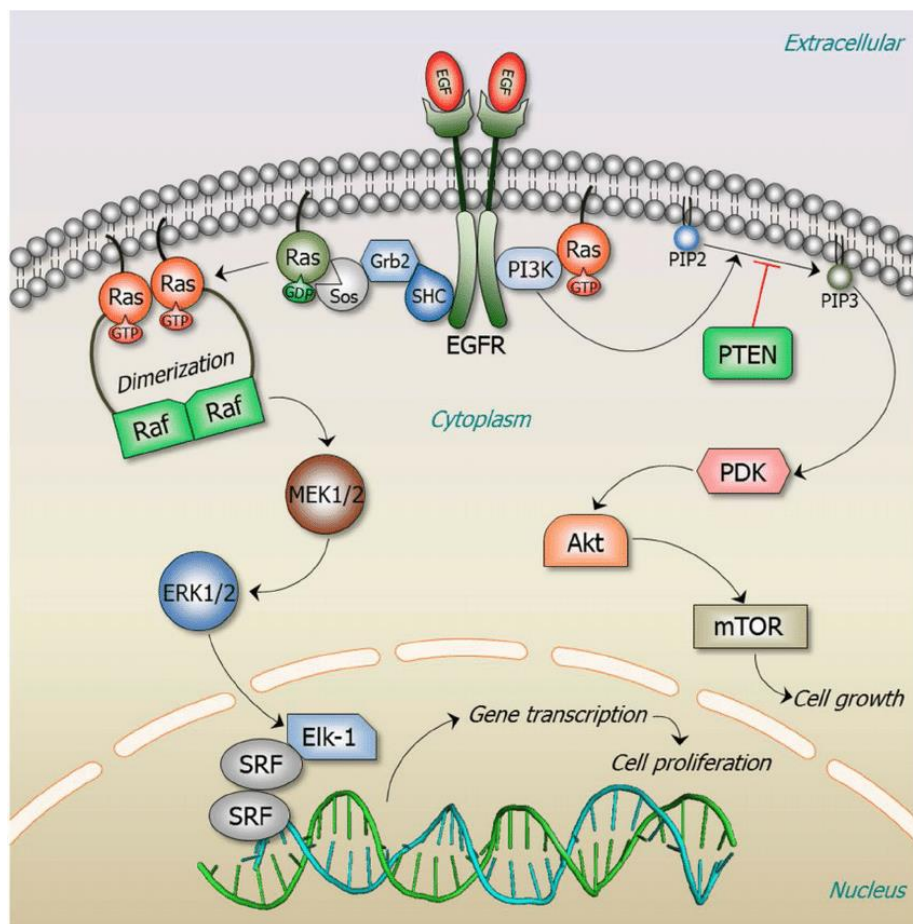


Figura 11. Representació de la via RAS/RAF/MEK/ERK. Adaptat de Nussinov et al., 2014.

1.4.4.3 LA VIA WNT/B-CATENINA

La via Wnt/ β -catenina regula varis aspectes de la biologia cel·lular com per exemple l'embriogènesi, la diferenciació i proliferació cel·lular i la tumorigènesi (Markowska et al. 2014). La senyalització d'aquesta via comença quan el lligand Wnt s'uneix al seu receptor en membrana (*Frizzled*), aquests receptors inhibeixen el complex APC/AXIN/CK1/GSK3 β els quals s'encarreguen d'estabilitzar la proteïna β -catenina, quan el complex està inhibit, β -catenina és capaç de translocar al nucli cel·lular (Hurley et al. 2005; Kestler and Kühl 2008). Un cop en el nucli, la β -catenina interacciona amb diversos factors de transcripció, de la família TCF/LEF tot promovent la proliferació i supervivència cel·lular. En el 12-31% dels carcinomes endometrials s'ha detectat una sobre-acumulació nuclear de β -catenina (Fukuchi et al. 1998; Saegusa et al. 2001). Així com la sobre-expressió d'elements de la família Wnt, com per exemple Wnt7a, el qual s'ha correlacionat amb un progressió ràpida i mal pronòstic en el carcinoma endometrial (J. Liu et al. 2013; N. Liu et al. 2014; Y. Liu et al. 2013).

1.4.4.4 LA VIA INSULINA/IGF-1

La via Insulina/IGF-1 és capaç d' activar la senyalització de PI3K/Akt a través del seu receptor tirosina quinasa; això promou l' activació de CiclinaD1 i la conseqüent proliferació cel·lular (De Marco et al. 2015). A més, s' ha descrit que la insulina és capaç, en ratolins, d' incrementar la sensibilitat de les cèl·lules endometrials als estrògens augmentant la seva proliferació i migració (Q. Zhang et al. 2013). Aquestes observacions, per tant, diluciden la col·laboració de la via Insulina/IGF-1, juntament amb altres vies, en la progressió de la tumorigènesis endometrial.

1.4.4.5 LA VIA PI3K/AKT/MTOR

La via PI3K/Akt és la reguladora central del càncer endometrial. Les senyals induïdes per aquesta via són capaces de controlar la proliferació, el metabolisme, el creixement cel·lular, la supervivència i també l' angiogènesis (Markowska et al. 2014). En el cas del carcinoma d' endometri els encarregats d' activar aquesta via són principalment factors de creixement, citocines i la insulina un cop s' uneixen al seu receptor en la membrana cel·lular. A part d' aquesta activació extracel·lular de la via, s' han descrit nombroses mutacions en el gen de la PI3K, PIK3CA les quals li confereixen guany de funció (Dedes et al. 2011; Oda 2011; Salvesen et al. 2009); així com també delecions i mutacions en el gen que codifica pel principal inhibidor d' aquesta via, Pten.

2. LA VIA PI3K/AKT

2.1 DESCRIPCIÓ

L' axis PI3K-Akt-mTOR regula una gran diversitat de processos biològics entre els quals hi trobem el creixement cel·lular, la progressió del cicle i la proliferació cel·lulars, el metabolisme i la reorganització del citoesquelet. Per tant, no és d' estranyar que es tracti d' una via de senyalització finament regulada ja que l' alteració de la seva homeòstasi produeix una hiperactivació de la via que acaba desembocant en diverses patologies entre les quals hi trobem el càncer. La inactivació del supressor tumoral *phosphatase and tensin homologue deleted on Chromosome 10* (PTEN) i/o l' activació de mutacions de la PI3K han sorgit com uns dels esdeveniments més comunament associats al càncer humà com a resultat d' una hiperactivitat de la via PI3K.

2.2 COMPONENTS DE LA VIA PI3K/AKT

La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) és la principal quinasa de lípids de l' eix de senyalització PI3K-Akt-mTOR (Figura 12). Si estudiem les proteïnes PI3K des d' un punt de vista estructural i funcional, existeixen diferents tipus de PI3Ks, les de tipus IA, són heterodímers formats per una subunitat p85 (reguladora) i una subunitat catalítica multi-isoforma p110: p110 α , p110 β , p110 δ (Vanhaesebroeck et al. 2010). Les tres isoformes de la subunitat p110 formen part de la classe IA PI3K, però només el gen de la isoforma p110 α , PIK3CA, es troba freqüentment mutat en càncers humans (Lawrence et al. 2014; Samuels et al. 2004). En condicions fisiològiques, són els receptors tirosina quinasa (RTKs) i les proteïnes G acoblades a receptors (GPCRs) els que activen la PI3K, la que al seu temps, catalitzarà la forforilació del seu substrat fosfatidilinositol(4,5)-bifosfat (PIP2) a fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfat (PIP3) (Fruman et al. 2017). Aquest PIP3 és un segon missatger essencial que amplificarà la senyal de la PI3K reclutant proteïnes que tinguin dominis d' unió a lípids, com per exemple la serina treonina AGC quinasa Akt i la *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1). Un cop aquestes proteïnes han estat reclutades a la membrana, la PDK1 fosforila i activa l' Akt, en el residu Thr308; és en aquest

moment quan l' Akt és capaç d' activar més de 100 efectors diferents entre els quals s' hi pot trobar la glicogen sintetasa quinasa 3 (GSK3), el *Forkhead Box O* (FoxO), el *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), tots ells capaços d' activar senyals de supervivència cel·lular (Manning and Toker 2017; Saxton and Sabatini 2017). Tot i això, la màxima activació de l' Akt s' aconsegueix quan és forforilada en la seva Ser473, per mTORC2, que a la vegada és regulat per PIP3 (P. Liu et al. 2015). La regulació d' mTORC1 per part de l' Akt es dona a través de diversos mecanismes, un dels quals és la inhibició del supressor tumoral *tuberous sclerosis complex* (TSC). Sota l' estímul de factors de creixement, l' Akt fosforila TSC2, la qual cosa permet introduir un GTP a la *Ras-related GTPase Rheb* la qual, en aquest estat, activarà mTORC1 als lisosomes (Menon et al. 2014). En els lisosomes, l' mTORC1 juntament amb membres del complex *Ragulator* i en presència de nutrients, activarà tota mena de processos anabòlics com ara la síntesis de lípids, àcids nucleics, biogènesis de ribosomes, tot encaminat a mantenir el creixement i la proliferació cel·lular (Saxton and Sabatini 2017). Per tant, la via PI3K estableix una sèrie de senyals moleculars capaces de generar les biomolècules necessàries per al creixement cel·lular durant el desenvolupament embrionari i el creixement tissular i la regeneració durant l' edat adulta. Degut al seu paper fonamental en el control de múltiples processos pro-supervivència, l' activació de la senyal de la PI3K ha d' estar finament controlada mitjançant reguladors negatius que actuïn de forma implacable per tal de prevenir un creixement cel·lular excessiu. El membre més important d' aquesta família de reguladors negatius és el supressor tumoral *phosphatase and tensin homolog deleted on Chromosome 10* (PTEN). Es tracta d' una fosfatasa d' especificitat dual per a lípids i proteïnes la qual desfosforila de manera molt eficient PIP3, acabant amb la propagació de la senyal d' Akt i d' altres dianes de PIP3 (Song, Salmena, and Pandolfi 2012). Per tant, la presència i l' activació de PTEN en la membrana cel·lular és crucial per a garantir una transducció controlada de la senyal de la PI3K. És per aquest motiu, que si el seu fre principal es trenca, la via PI3K queda constitutivament activa, i la cèl·lula experimentarà un creixement incontrolat (Hollander, Blumenthal, and Dennis 2011). De la mateixa manera, si el gen PI3KCA experimenta mutacions pro-oncogèniques, la regulació negativa de PTEN es veurà superada i la cèl·lula acabarà esdevenint cancerosa (Fruman et al. 2017). Per tant, PTEN i la PI3K defineixen un axis extremadament ben regulat que assegura un reproducció cel·lular continguda, però que quan es veu alterat afavoreix la supervivència i la proliferació de les cèl·lules tumorals.

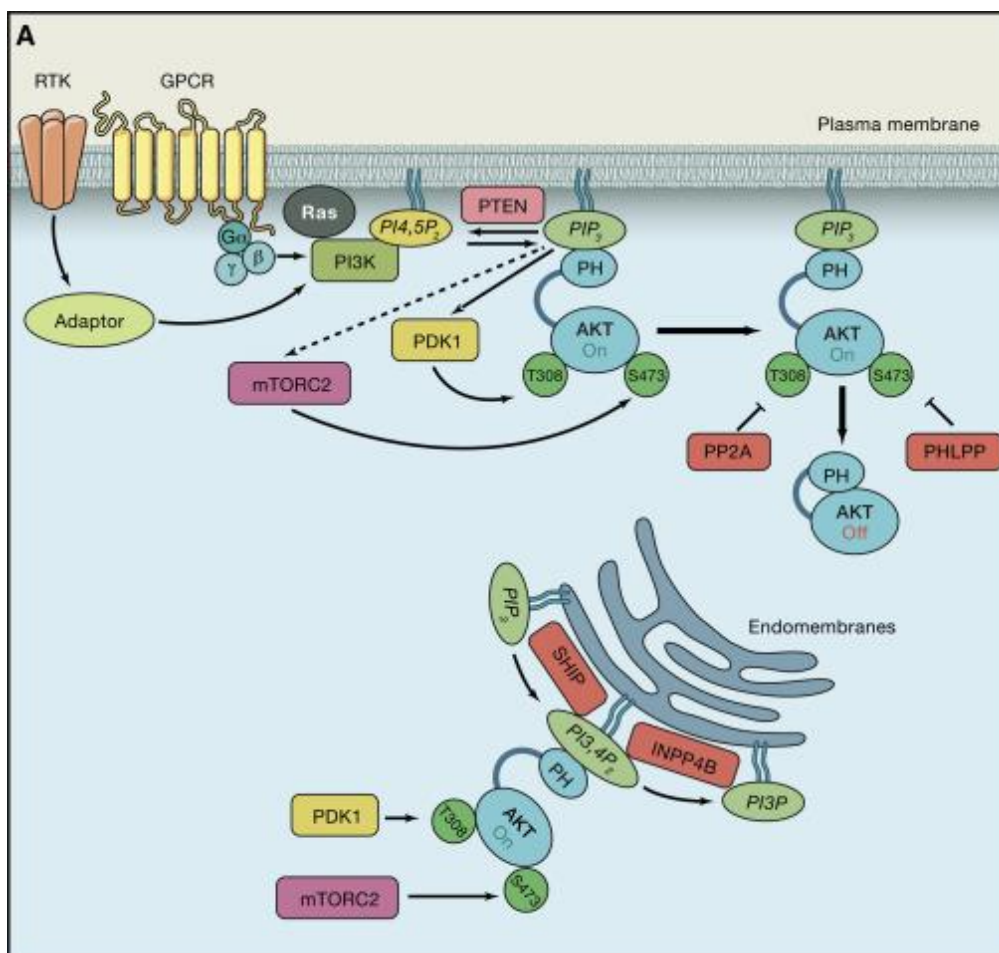


Figura 12. Representació de la via PI3K/Akt. Adaptat de Manning et al., 2017.

2.3 EL SUPRESSOR TUMORAL PTEN

Pten es troba codificat en el cromosoma 10q23. És una proteïna formada per 403 aminoàcids que comparteix homologia de seqüència amb les proteïnes Tensina i Auxilina en la seva regió amino-terminal. Té un domini fosfatasa amb estructura de *p-loop*, i una regió C2 amb gran afinitat per als fosfolípids. En la seva estructura té dos dominis PEST i un domini PDZ, els quals regulen la seva estabilitat i localització subcel·lular. Se sap que pot ser ubiquitinitzat en les seves lisines K13 i K289, la qual cosa també modifica la seva estabilitat i localització. La lisina K289 també pot ser sumoilitzada. Dos sumoïlacions addicionals (en K254 i K255) han estat identificades com a facilitadors de la localització de PTEN en la membrana plasmàtica (Figura 13). PTEN també pot ser acetilat en els seus residus K125 i K128, la qual cosa disminueix

dràsticament la seva habilitat per a inhibir l' activitat PI3K/Akt. A més, l' oxidació de PTEN pot comportar la formació d' un enllaç disulfid entre els residus C71 i C124 que en redueixen la seva activitat. Per altra banda, en PTEN, s' han identificat diverses regions putativament fosforilables, les quals augmentarien la seva estabilitat a la vegada que reduirien la seva activitat (C. Y. Chen et al. 2018).

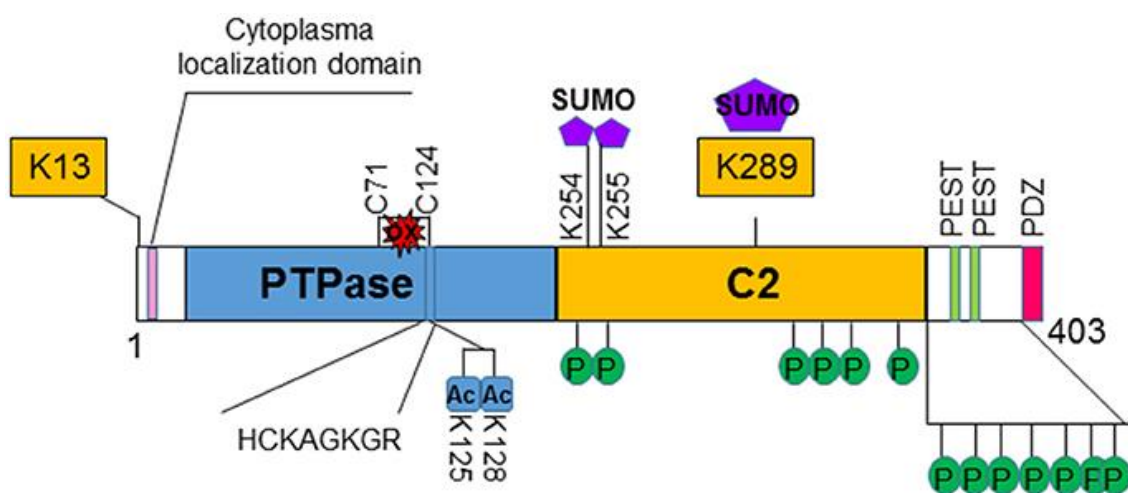


Figura 13. Representació esquemàtica de PTEN. Adaptat de Chen et al., 2018.

Pten és un dels supressors tumorals més mutats en els càncers humans (Hollander, Blumenthal, and Dennis 2011). S' expressa des de temps molt primerencs durant l' embriogènesi i de forma ubiqua durant l' edat adulta. La seva pèrdua pot tenir conseqüències dramàtiques sobre l' homeostasi cel·lular (Di Cristofano et al. 1998; Podsypanina et al. 2002; Suzuki et al. 1998). Les mutacions en Pten es donen tant en tumors somàtics com hereditaris i en ambdós casos condueixen a un creixement anormal amb una posterior progressió tumoral (Di Cristofano et al. 1998). Es coneix que mutacions germinals en Pten predisposen a les síndromes conegudes com a *PTEN Hamartoma Tumors Syndromes* (PHTS). Les persones afectades per aquestes síndromes desenvolupen hamartomes, un creixement cel·lular desorganitzat i hiperplàstic que pot afectar diversos teixits com ara les tiroides, els pits, la pell i el cervell. A més a més, pot causar desordres en el neuro-desenvolupament (Yehia, Ngeow, and Eng 2019). En alguns càncers somàtics, com per exemple l' endometrial, el de mama, pròstata i glioblastoma, la inactivació de Pten engloba una gran varietat de mutacions *missense* i *nonsense*, delecions mono o bi-

al·lèliques del locus genòmic o a través de la metilació del promotor, i sent també la diana de microRNAs oncogènics (Hollander, Blumenthal, and Dennis 2011; Y. R. Lee, Chen, and Pandolfi 2018). Estudis estructurals i funcionals de finals dels noranta van descobrir, a banda de la seva acció tirosina fosfatasa, que PTEN presentava també una sorprenent afinitat per als compostos fosfolipídics, essent el PIP3 el substrat per al que presenta una major afinitat (J. Li et al. 1997; Maehama and Dixon 1998; Steck et al. 1997). A partir d' aquell moment, nombrosos estudis han confirmat que reduccions en els nivells de PTEN o en la seva activitat no només induïen l' acumulació de PIP3, sinó que també una major activitat de la proteïna Akt, establint una connexió entre el supressor tumoral PTEN i la via PI3K (Stambolic et al. 1998). El rol de Pten com a supressor tumoral ha estat demostrat i validat per múltiples models animals i experiments *in vitro*. En ratolí, la inactivació constitutiva de Pten o bé usant un sistema Cre-Lox, condueix a l' aparició de tumors en múltiples teixits epitelials com ara les glàndules mamàries, la pròstata, tiroides, endometri o les glàndules adrenals (Di Cristofano et al. 1998; Mirantes et al. 2013; Papa et al. 2014; Podsypanina et al. 2002; Suzuki et al. 1998; H. Wang et al. 2010). A més, estudis amb ratolins que tenen una sobre-expressió sistèmica de Pten han demostrat gaudir de millors efectes supressors tumorals, per tant, el fet d' augmentar els nivells d' expressió o d' activitat de PTEN podria tenir sentit com a tractament per a prevenir l' aparició de determinats tipus de càncer (Garcia-Cao et al. 2012). La inactivació de Pten s' ha vist inversament relacionada amb la fosforilació d' Akt, per tant, Akt constitueix una diana funcional de PTEN (Manning and Toker 2017). En aquest sentit, en diversos estudis on es va induir una supressió teixit-específica d' Akt, es va poder rescatar la tumorigènesis induïda per la falta de Pten, sent l' endometri i la pròstata els dos òrgans on es van obtenir millors resultats (M. L. Chen et al. 2006; Chin et al. 2014).

2.4 LA VIA PI3K/AKT I EL CÀNCER D' ENDOMETRI

Les alteracions genètiques que condueixen a un increment de senyalització per part de l' axis PI3K/Akt/mTOR es troben en molts càncers endometrials. En aquest sentit, Pten és el gen més comunament alterat en els càncers d' endometri tipus I o endometriode (CEE), i freqüentment mutat en els càncers d' endometri tipus II o no endometriode (Djordjevic et al. 2012) així com en algunes hiperplàsies endometrials, suggerint que les alteracions en Pten són un esdeveniment primerenc en la transformació endometrial (Mutter 2000). El gen PI3KCA que codifica per la subunitat catalítica p110 de la PI3K i el gen PIK3R1 que codifica per la subunitat

reguladora p85a de la PI3K, són els gens més mutats en el carcinoma d' endometri, a més, poden coexistir amb mutacions en Pten (Cheung et al. 2011; Rudd et al. 2011; Urlick et al. 2011). En sentit oposat, les mutacions en l' Akt han estat descrites només en un 2% dels càncers d' endometri tipus I (Shoji et al. 2009). Per altra banda, alteracions en els receptors tirosina-quinasa són també molt freqüents en el càncer d' endometri, es tracta, sobretot, d' amplifícacions o sobre-expressions del receptor HER2 (Morrison et al. 2006; Slomovitz et al. 2004), mutacions en el *fibroblast growth factor receptor 2* (FGF2) (Dutt et al. 2008; Pollock et al. 2007), sobre-expressions en el receptor d' EGF (EGFR) (Khalifa et al. 1994; Livasy et al. 2006), i sobre-expressions també del *insulin-like growth factor receptor 1* (McCampbell et al. 2006). Per altra banda, s' han descrit mutacions activadores de KRAS, predominantment en el càncer d' endometri tipus I (Koul et al. 2002; Lax et al. 2000) les quals poden provocar una activació directa de la subunitat p110 de la PI3K (Mendoza, Er, and Blenis 2011).

Si estudiem amb més detall el cas de Pten, es pot afirmar que les mutacions en aquest gen es donen en estadis molt primerencs de les alteracions endometrials, per exemple, aproximadament el 20% de les lesions hiperplàsiques pre-canceroses i el 50% dels carcinomes d' endometri presenten mutacions o pèrdua d' heterozigocitat en Pten. Tot i això, en el CEE, la inactivació de Pten també es pot donar degut a delecions homozigòtiques o be a través de mecanismes epigenètics. Aquestes alteracions en la via PI3K/Akt poden venir acompanyades per inestabilitat de microsatèl·lits, posterior a la metilació del promotor d' hMLH1, mutacions en KRAS, així com també mutacions en TP53 (en lesions d' alt grau) (Ellenson and Wu 2004). De fet, femelles de ratolí heterozigotes per Pten presenten, amb un ratio 100% penetrant, hiperplàsia endometrial que amb un 25% que progressarà a CEE (Podsypanina et al. 2002; Stambolic et al. 2000). Si aquesta pèrdua monoal·lèlica de Pten es combina amb la deficiència de MLH1, la progressió del carcinoma endometrial augmenta fins a un 40% en les femelles de ratolí.

3. EL TGF-B

3.1 FAMÍLIA DEL TGF- B

El TGF- β forma part d' una superfamília de lligands extracel·lulars com ho són les *bone morphogenetic proteins (BMPs)*, *growth differentiation factors (GDFs)*, *müllerian inhibiting substance (MIS)*, les activines i d' altres (Y. G. Chen et al. 1998; Feng and Derynck 2005) (Figura 14). Totes aquestes citoquines tenen funcions similars com ara la regulació de la proliferació, l' apoptosi, la diferenciació i la migració cel·lulars. A més a més, totes elles comparteixen part de la maquinària intracel·lular encarregada de transmetre les seves senyals i acabar realitzant així la seva funció. En aquesta tesi ens centrarem només amb el TGF- β , el qual es pot presentar amb tres isoformes diferents: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. El TGF- β és secretat com un polipèptid homodimèric inactiu, el qual s' ha de processar per a que acabi sent una molècula activa (regió C-terminal) (Keski-Oja, Koli, and Von Melchner 2004; Rifkin 2005). Aquest lligant ja madur és capaç d' unir-se directament amb un co-receptor transmembrana, anomenat β -glicà o receptor TGF- β III (Feng and Derynck 2005; Shi and Massagué 2003). Tot i això, aquest co-receptor no s' expressa en massa tipus cel·lulars, cosa que permet imaginar que la seva funció pot ser dispensable, en alguns casos, per a la senyalització del TGF- β . De fet, se sap que el β -glicà és reemplaçat en alguns teixits per una glicoproteïna transmembrana anomenada *Endolgin* (Lebrin et al. 2005). Sigui quin sigui el co-receptor que uneixi el lligand, aquests formaran complexos amb el receptor serina/treonina quinasa i li presentaran el lligand.

Es coneixen dos receptors que són capaços de transmetre les senyals biològiques del TGF- β , el receptor TGF- β tipus II (T β RII) i el receptor TGF- β tipus I (T β RI) també anomenat *activin receptor-like kinase 5 (ALK5)* (Feng and Derynck 2005; Shi and Massagué 2003). Aquests receptors I i II formen hetero-tetràmers amb dos receptors idèntics a ells, formant un macro-complex constituït per un parell de receptors T β RI i T β RII, juntament amb el lligand dimèric TGF- β . Un cop s' ha format aquest complex, té lloc un reordenament espacial d' aquestes proteïnes que acaba amb la transfosforilació dels dominis serina treonina quinasa del receptor T β RI per part del receptor II (Huse et al. 1999; Qin et al. 2002; Zhu and Sizeland 1999). Aquesta transfosforilació resulta amb un canvi conformacional del T β RI de tal manera que el seu centre catalític queda exposat (Shi and Massagué 2003). Aquest model d' actuació és el més comú per als receptors del TGF- β , tot i això existeixen models alternatius i força més complexos que es

donen sobretot en cèl·lules endotelials (Lebrin et al. 2005) dels quals no parlarem en aquesta introducció.

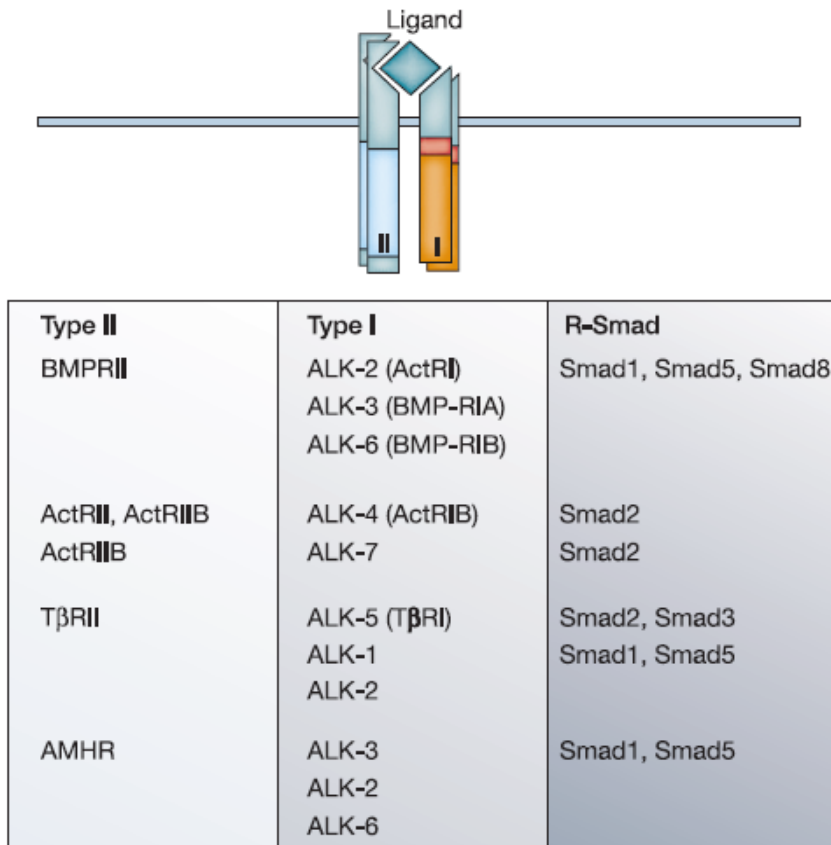


Figura 14. Esquema dels diversos components de la via TGF-β Smad. Adaptat de Derynck et al., 2003.

3.2 SENYALITZACIÓ CANÒNICA DEL TGF- β

Un cop el T β RI està actiu, és capaç de fosforilar els seus efectors intracel·lulars, les proteïnes Smad. Es tracta d'una família de petits transductors de senyals molt conservada al llarg de l'evolució (Massagué, Seoane, and Wotton 2005b). Les Smads són proteïnes modulares constituïdes per un N-terminal amb un lloc *Mad-homology 1* (MH1) molt conservat, un *linker* intermig i una regió C-terminal que conté dominis MH2 (Figura 15). El domini MH1 participa en la localització nuclear, la unió al DNA i amb altres proteïnes d'aquests factors de transcripció Smad. Per altra banda, la regió *linker*, és el domini en el qual es forforilen aquestes proteïnes Smads per a ser activades per quinases i continuar, conseqüentment, amb la transducció de senyals; a més, també és la regió on s'uniran les *ubiquitin-ligases* per a regular la vida mitja de les mateixes Smads i dels receptors del TGF- β . Per últim, el domini MH2 és el més important en quan a les unions proteïna-proteïna de les Smads, incloent-hi l'activitat d'unió a residus fosfo-serina.

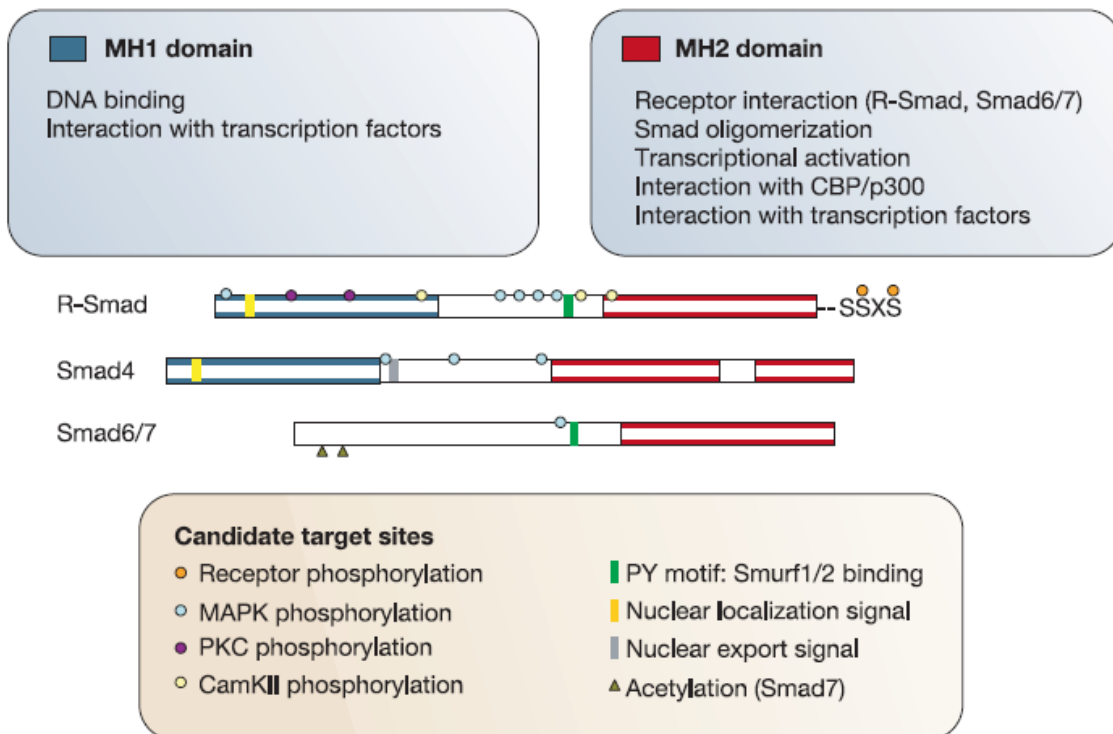


Figura 15. Representació esquemàtica de l'estructura de les Smads. Adaptat de Derynck et al., 2003.

Existeixen diversos tipus d' Smad segons les seves funcions i estructures. Per una banda, les Smads activades pel receptor (R-Smads), es tracta de les proteïnes Smad2 i Smad3, són dues proteïnes independents i amb funcions no sempre redundants. Aquestes dues proteïnes mostren una gran afinitat d' unió per la proteïna Smad4, l' anomenada Co-Smad, aquesta Co-Smad no pot ser fosforilada pels receptors del TGF- β tot i que ràpidament oligomeritza amb les Smad2 i Smad3 fosforilades, formant uns complexos trimèrics ja funcionals. Quan totes aquestes Smads es troben en forma de monòmer, estan constantment entrant i sortint del nucli cel·lular, això s' acaba quan s' activa el receptor del TGF- β i fosforila les R-Smad, aquestes dimeritzaran amb la Co-Smad i això afavorirà la seva acumulació nuclear (Schmierer and Hill 2005). Un cop en el nucli els complexos ja actius R-Smad/Co-Smad s' uniran directament al DNA (a través dels *Smad-binding elements*) i s' associaran amb una gran diversitat de factors de transcripció, co-activadors o co-repressors, donant lloc a una activació o una repressió dels seus gens diana (més de 500 gens diana coneguts només en cèl·lules de mamífer) (Feng and Derynck 2005; Massagué, Seoane, and Wotton 2005b) (Figura 16). Enmig d' aquesta senyalització aparentment simple, s' activa un loop de regulació negativa per tal d' apagar la senyal induïda pel TGF- β . En aquesta senyal inhibidora hi participen bàsicament tres tipus de proteïnes: les Smads inhibidores (I-Smads), ubiquitin lligases de la família Smurf i fosfatases (Massagué, Seoane, and Wotton 2005a). L' activació de la senyalització pel TGF- β induïx ràpidament la transcripció de les I-Smad (Smad6 i Smad7) i de les Smurf (Smurf1 i Smurf2). És en aquest procés on l' Smad7 és reclutada pel complex de receptors TGF- β i tot competint per la unió al receptor amb les R-Smads n' inhibeix la fosforilació. Al mateix temps, l' Smad7 recluta fosfatases que desfosforilaran i inactivaran el complex receptor del TGF- β . Per acabar, l' Smad7 s' unirà directament i activarà l' activitat catalítica de les *ubiquitin* lligases Smurf, conduint a la ubiquitilació del T β RI, tot promovent l' endocitosis i una degradació lisosomal del complex receptor-ligand (Kretzschmar, Doody, and Massagué 1997). Finalment, algunes fosfatases nuclears com per exemple PPM1A, desfosforilaran les cules C-terminals de les R-Smads provocant la desunió del complex actiu R-Smad/Co-Smad i iniciant una cascada molecular per a finalitzar la senyalització de la via Smad (Funaba, Zimmerman, and Mathews 2002; Kretzschmar et al. 1999). Tot i el coneixement i la importància de tots aquests reguladors de la via TGF- β /Smad, continuen havent-hi grans incògnites en la seva regulació que hauran d' esperar descobriments futurs per a ser resoltes.

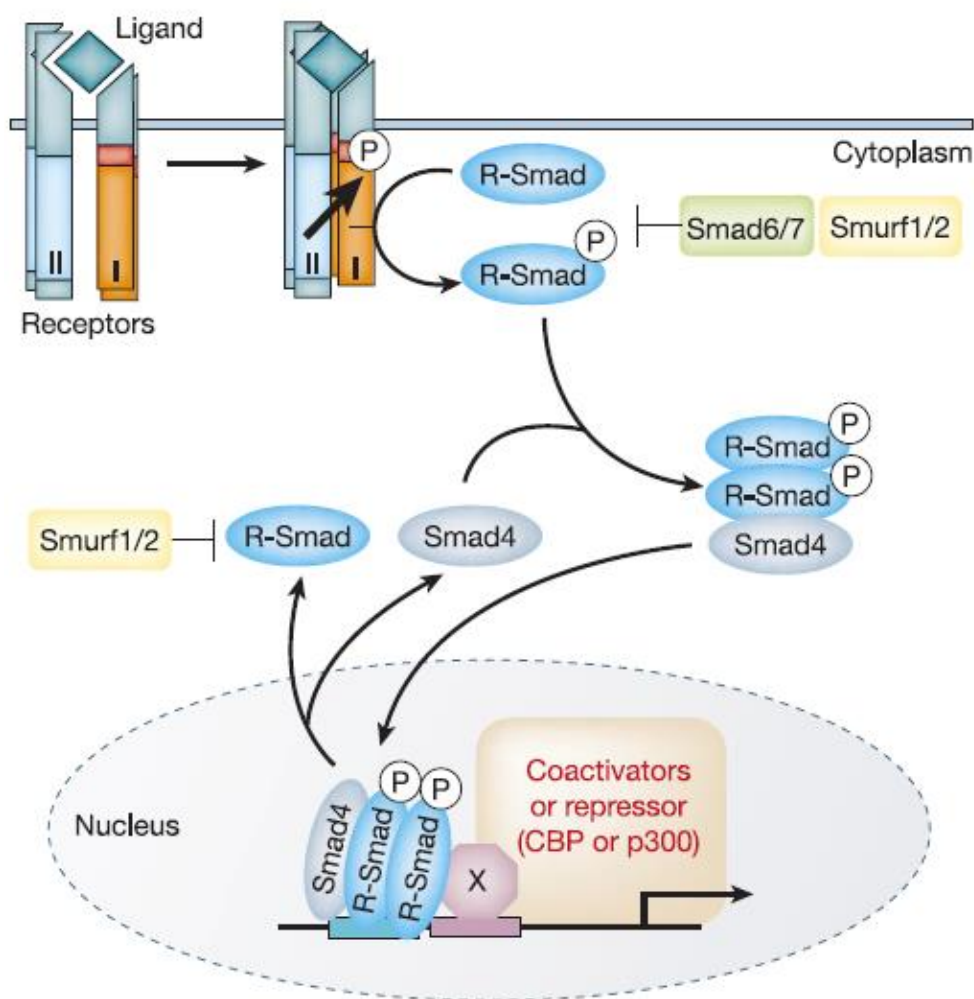


Figura 16. Esquema de la via TGF-β. Adaptat de Derynck et al., 2003.

3.3 SENYALITZACIÓ NO CANÒNICA DEL TGF- B (NO SMAD)

La via de senyalització descrita anteriorment fa referència a la via canònica o la coneguda com a via Smad, tot i això, els receptors del TGF-β poden activar branques de moltes vies alternatives que res tenen a veure amb les Smads, són les conegudes com a *non-Smad pathways*. Aquestes vies comprenen branques de la senyalització per MAP quinases (MAPK), les vies de senyalització de les *Rho-like GTPases* i la via de la fosfaditilinositol-3-quinasa (PI3)/Akt.

3.3.1 ACTIVACIÓ DE LA VIA DE LES MAPKS

S' ha descrit en diversos tipus de teixit i línies cel·lulars que l' activació dels receptors T β RI i T β RII pot comportar la fosforilació per part d' aquests receptors de les proteïnes *growth factor receptor binding protein 2* (Grb2) i *Src homology domain 2 containing* (Shc). Aquesta fosforilació acaba desencadenant una cascada de senyalització que activa, en última instància, les proteïnes ERK1/2 (Gallier and Schiemann 2007; M. K. Lee et al. 2007) (Figura 17). L' activació d' aquestes proteïnes ERK és necessària i essencial per a que les cèl·lules adquireixin un fenotip mesenquimal, promovent la coneguda transició epiteli-mesènquima (EMT) que posteriorment detallarem en aquesta introducció.

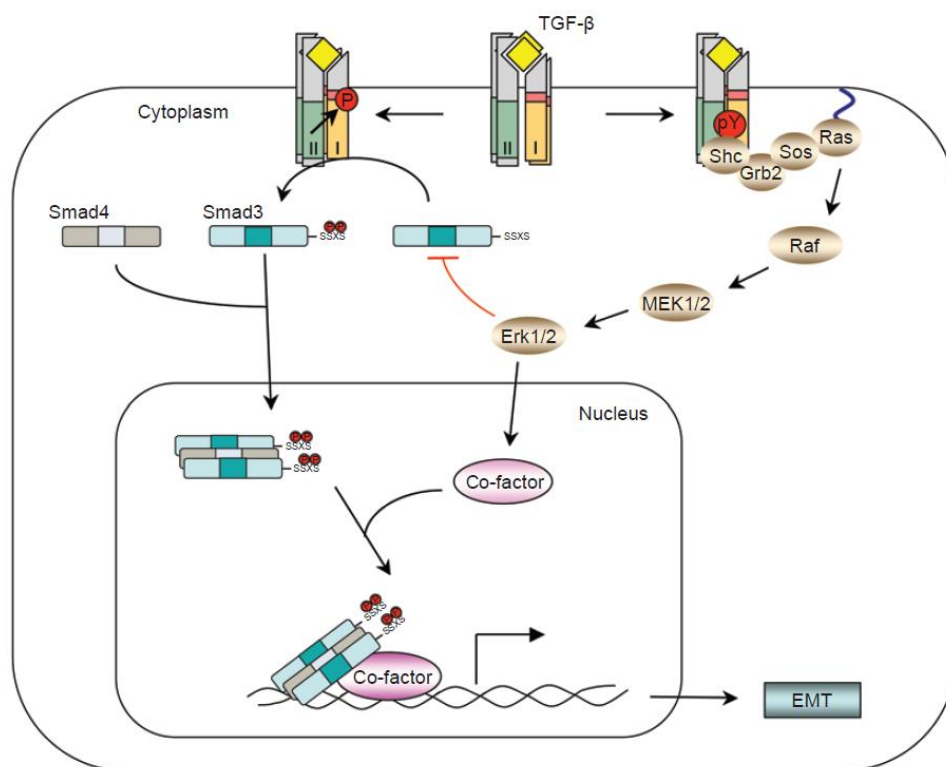


Figura 17. Esquema de l' activació no canònica per part del TGF- β de la via de les MAPKs. Adaptat de Zhang et al., 2009.

Introducció

Seguint en el mateix sentit, també s' ha elucidat que els receptors del TGF- β són capaços de reclutar i activar TRAF6. Aquesta proteïna al seu temps recluta TAK1 i mitjançant una reacció de poliubiquitinació acaben activant les proteïnes JNK i p38. Aquesta altra branca de la via de les MAPK activada també pel TGF- β és coneguda per participar en senyals que indueixen apoptosi, de tal manera que esdevé una via alternativa a la Smad per a provocar la mort cel·lular induïda pel TGF- β (Liao et al. 2001; Sorrentino et al. 2008; Yamashita et al. 2008; Yu, Hébert, and Zhang 2002) (Figura 18). En contraposició a aquests resultats també s' ha descrit que l' activació d' aquesta via JNK/p38 és indispensable per a que es doni la EMT induïda per TGF- β (Yamashita et al. 2008).

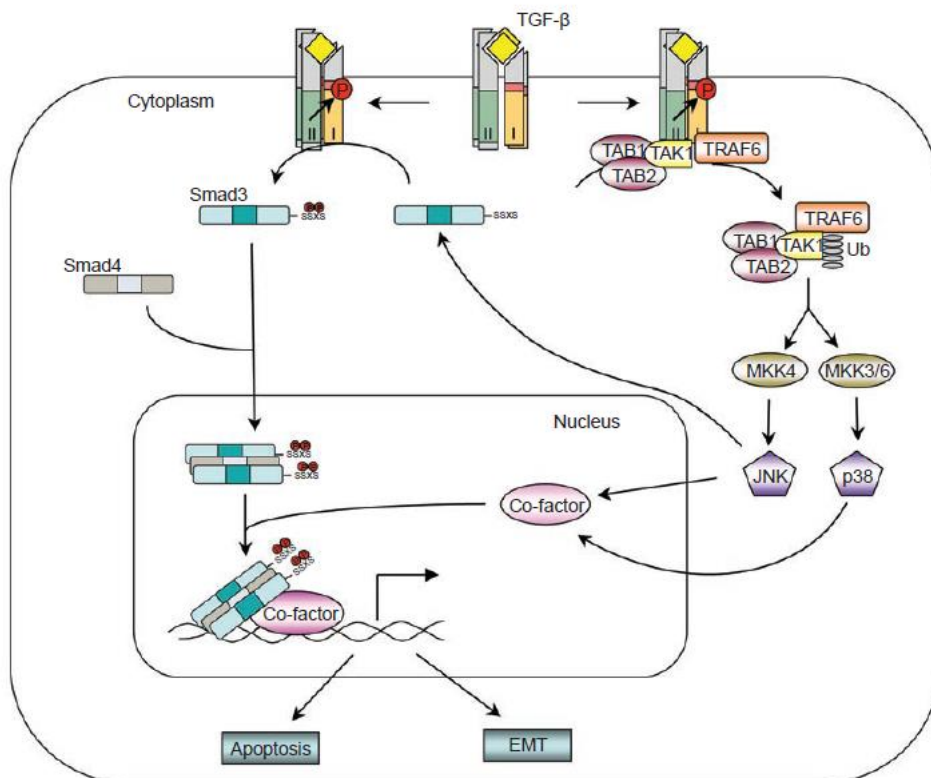


Figura 18. Esquema de l' activació no canònica de les JNK i p38 per part del TGF- β . Adaptat de Zhang et al., 2009.

3.3.2 ACTIVACIÓ DE LES RHO-LIKE GTPASES

Una altra via que pot ser activada pels receptors del TGF- β de forma alternativa a la canònica és la via de les Rho GTPases, en concret la RhoA (Figura 19). Aquestes GTPases són també essencials per a la inducció de l' EMT per part del TGF- β , de tal manera que la seva activació promou la polimerització de fibres d'estrès i, juntament amb l'activació també per part dels receptors de TGF- β , de Cdc42 a la desintegració de les unions estretes entre cèl·lula i cèl·lula, pas indispensable per a que les cèl·lules es puguin desunir les unes de les altres i puguin iniciar la invasió de l'espai extracel·lular (Barrios-Rodiles et al. 2005; H. R. Wang et al. 2003; M. C. Wilkes et al. 2003).

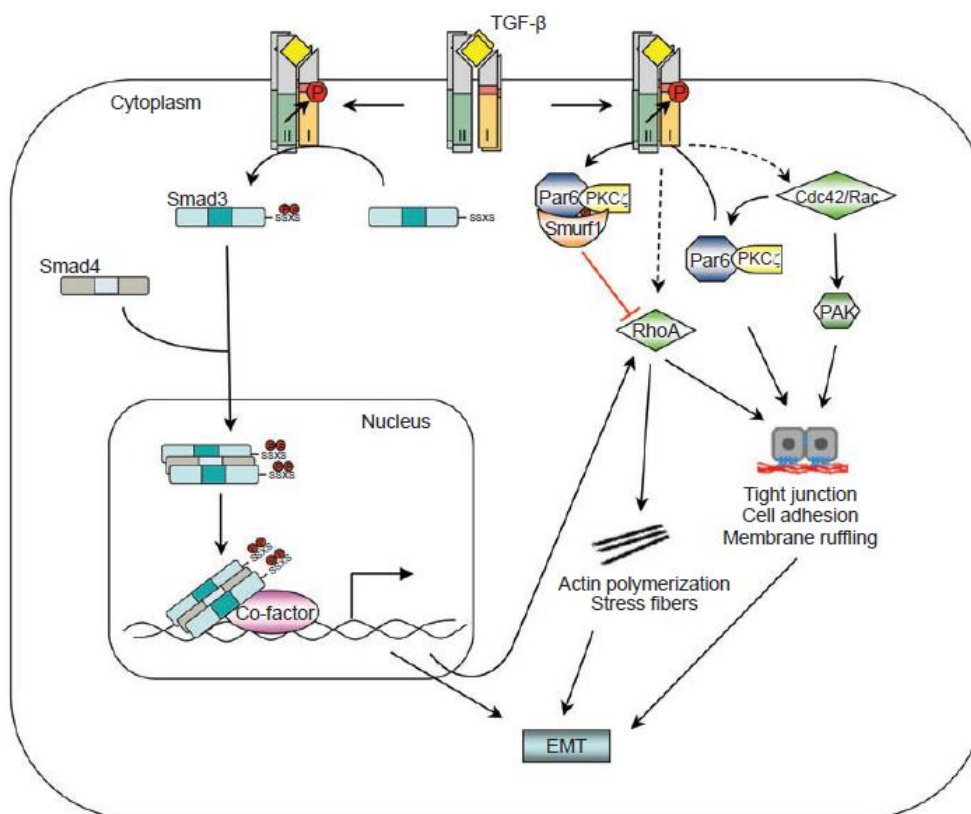


Figura 19. Representació de l'activació de la via de les Rho-GTPases per part del TGF- β . Adaptat de Zhang et al., 2009.

3.3.3 ACTIVACIÓ DE LA VIA PI3K/AKT

En els últims anys, s'ha descrit una relació cada cop més estreta entre la via PI3K/Akt i la via del TGF- β . Se sap que el TGF- β és capaç d'induir l'activació de la PI3K com ho demostra la fosforilació del seu efector posterior Akt després de l'estímul amb TGF- β (Bakin et al. 2000; Lamouille and Derynck 2007) (Figura 20). Aquesta estimulació, però, sembla independent dels efectors Smad2/3 (Mark C. Wilkes et al. 2005) ja que per experiments d'immunoprecipitació s'ha pogut demostrar que la subunitat p85 de la PI3K està unida al receptor II del TGF- β de forma constitutiva, mentre que la unió de p85 a T β RI és dependent de l'estímul del lligant TGF- β (Jae, Shin, and Arteaga 2005). Tot i això, els receptors de TGF- β també poden activar la PI3K de forma indirecta, mitjançant la inducció de l'expressió de TGF- α que activarà la PI3K a través de la inducció del receptor d'EGF (Viñals and Pouyssegur 2001). Aquesta activació de PI3K per part del TGF- β , activa l'axis Akt/mTORC1 que culminarà amb la fosforilació de les proteïnes S6K i 4E-BP1 la qual cosa provoca l'activació de la polimerització de filaments d'actina i la reorganització del citoesquelet cel·lular, senyal inequívoc de la promoció d'EMT (Lamouille and Derynck 2007). Tanmateix, quan la PI3K és activada per TGF- β , a part de la promoció de l'EMT, la PI3K és capaç d'activar la proliferació cel·lular i d'inhibir la senyal apoptòtica promoguda pel TGF- β , degut a que l'Akt pot interaccionar directament amb la Smad3 retenint-la al citoplasma i incapacitant així la senyal proapoptòtica transmesa per la via canònica del TGF- β (Conery et al. 2004; Remy, Montmarquette, and Michnick 2004). Totes aquestes dades semblen establir una contradicció en la senyalització de PI3K/Akt activada pel TGF- β ja que moltes de les senyals que promou la PI3K són antagòniques a les activades per la via canònica del TGF- β , és per això que aquesta relació i la seva regulació necessiten un major estudi per aprofundir en la seva descripció i intentar entendre millor com interaccionen les dues vies de senyalització.

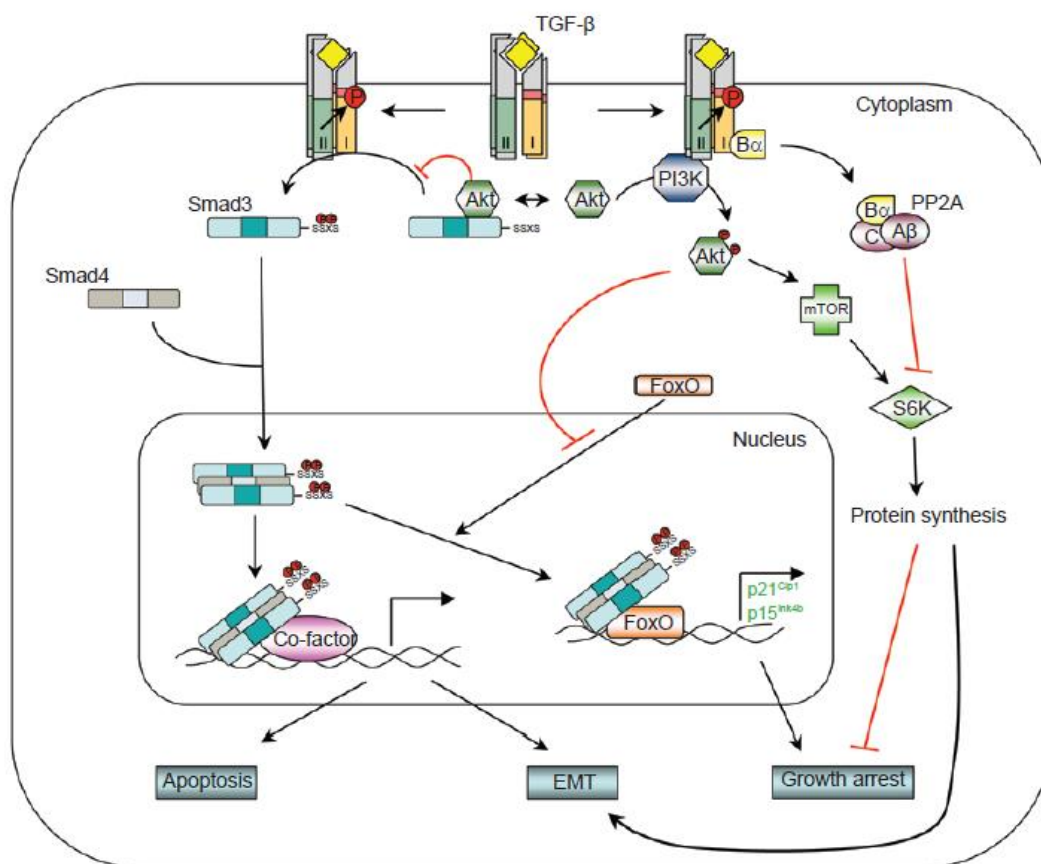


Figura 20. Esquema de l'activació de la via PI3K/Akt per part del TGF- β . Adaptat de Zhang et al., 2009.

3.4 FUNCIONS DEL TGF-B COM A SUPRESSOR TUMORAL

El TGF- β és una citoquina multifuncional coneguda àmpliament pel seu paper dual segons l'ambient i el tipus cel·lular damunt del qual actua. Així doncs, el TGF- β és una espasa de doble fil, que, per una banda, presenta una funció com a supressor tumoral quan senyalitza sobre cèl·lules pre-tumorals o en estadis inicials de l'evolució cancerosa promovent la citoestasi i l'apoptosis. I per altra banda, el TGF- β presenta una funció de potent promotor tumoral i inductor d'EMT quan actua damunt de cèl·lules en estadis avançats de la progressió tumoral (Massagué 2012).

3.4.1 EFECTES CITOESTÀTICS DEL TGF- β

Una de les funcions més conegudes i estudiades del TGF- β és el seu efecte citostàtic (Figura 21). Les primeres evidències que provaven aquest efecte inhibidor del creixement per part del TGF- β es remunten a mitjans dels anys 80. En aquella època, diversos grups van demostrar que l'exposició al TGF- β provocava l'aturada de cicle en diferents tipus cel·lulars, tals com cèl·lules epitelials, endotelials, hematopoiètiques i queratinòcits de pell (Coffey et al. 2015; Roberts et al. 1985; Takehara, LeRoy, and Grotendorst 1987; Tucker et al. 1984). Posteriorment, això també fou provat en models murins (Pierce et al. 1993; Shull et al. 1992). El cicle cel·lular típic d'una cèl·lula eucariota consta de quatre fases: la divisió nuclear (fase M), la síntesi de DNA (fase S), el temps entre la fase M i la fase S, anomenada fase G1; i el període entre la fase S i la fase M anomenat fase G2. Ha estat descrit, en cèl·lules epitelials, que el TGF- β és capaç d'induir una parada de cicle en el punt de restricció de la fase G1 on les cèl·lules estudien si es donen les condicions idònies per a seguir amb la divisió cel·lular. Aquesta parada orquestrada pel TGF- β es dona mitjançant la coordinació, principalment, de dos mecanismes. La repressió de l'expressió de determinats factors de transcripció promotors del creixement i a través de la inducció d'inhibidors específics de les CDKs. En aquest sentit, el TGF- β és capaç de suprimir l'expressió de factors pro-proliferació tals com c-Myc i factors de diferenciació cel·lular com Id1, 2 i 3 (Alexandrow and Moses 1983; C.-R. Chen, Kang, and Massague 2002; Kang, Chen, and Massagué 2003). Aquesta repressió de c-Myc es dona per interacció directa d'Smad3 amb el promotor MYC, on forma un complex repressor juntament amb E2F4/5, DP1 i p107. Aquesta inhibició d'expressió de MYC no només comporta la parada de la promoció del creixement cel·lular sinó que també provoca l'expressió de diversos gens inhibidors de les CDKs. En el mateix sentit, el TGF- β és capaç d'induir l'expressió del factor activador de la transcripció 3 (ATF3). ATF3 forma un complex juntament amb Smad3 i Smad4 el qual és capaç de silenciar el promotor d'Id1 (Kang, Chen, and Massagué 2003). L'Expressió del gen Id2 és suprimida mitjançant un sistema similar com a conseqüència de la inhibició de c-Myc pel TGF- β (P. M. Siegel and Massagué 2003). És conegut que per a que es doni la transició de la fase G1 a la S es requereix de l'activació de les proteïnes CDKs tals com CDK2, CDK4 i CDK6. En aquest procés el TGF- β hi juga un paper inhibitori activant la transcripció de p21^{CIP1} (Datto et al. 2006) i p15^{INK4B} (Hannon and Beach 1994) els quals són capaços d'inhibir l'activació d'aquestes CDKs. Cal apuntar que aquests factors p21^{CIP1} i p15^{INK4B} són inhibits per c-Myc, el qual, recordem, és també inhibit pel TGF- β (Seoane et al. 2001; Seoane, Le, and Massagué 2002; Staller et al. 2001). A més a més, el TGF- β augmenta l'activitat de p27^{KIP1} ja que p15^{INK4B} trenca el complex p27^{KIP1}-CDK4/6-CiclinaD deixant lliure p27^{KIP1} que és capaç, un cop lliure, d'unir-se als complexos

Ciclina E-CDK2 inhibint l'activitat quíntica de la CDK2 (Reynisdóttir and Massagué 1997). Per a complementar els mecanismes descrits anteriorment, el TGF- β també reprimeix l'expressió de Cdc25A. Cdc25A és una fosfatasa que extrau els fosfats inhibitoris de les CDKs promovent el pas de fase G1 a S i el pas de fase G2 a M. En cèl·lules epitelials aquest procés és promogut per la translocació nuclear de p160^{ROCK} provocada pel TGF- β a través d'un mecanisme Smad-independent que acaba amb la inactivació per desfosforilació de Cdc25A (Bhowmick et al. 2003). Al mateix temps, el TGF- β també activa la degradació proteosomal de Cdc25A augmentant-ne la seva associació amb el complex ubiquitin lligasa SFCb2TrCP format per Skp1, Cullin1 i la proteïna b2TrCP (Ray et al. 2005). A banda de la regulació de Cdc25A, el factor d'iniciació 4EBP1, que suprimeix el creixement i la proliferació cel·lular a través de la regulació d'eIF4F, és també activat pel TGF- β mitjançant un sistema Smad4-dependent (Azar et al. 2009).

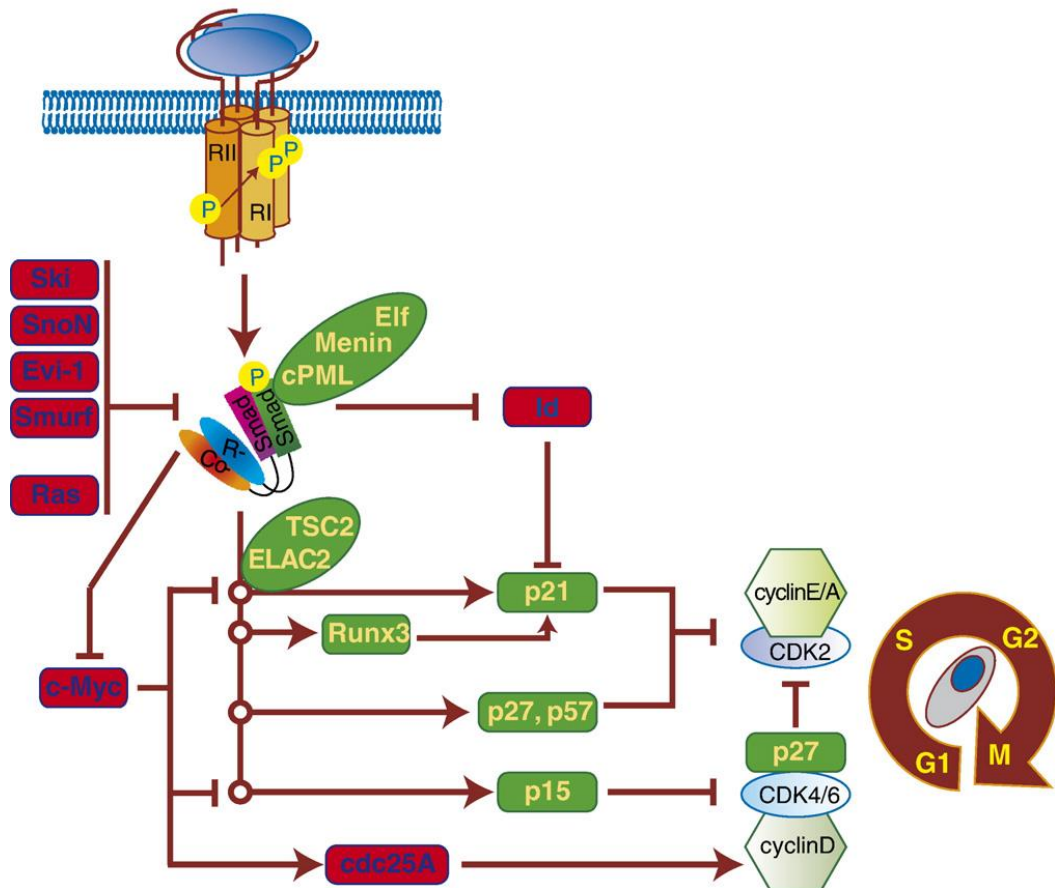


Figura 21. Esquema de la regulació de la proliferació cel·lular per part del TGF- β . Adaptat de Pardali et al., 2006.

3.4.2 APOPTOSI INDUIDA PER TGF-B

S'ha descrit que el TGF- β pot actuar com a un potent inductor de l'apoptosi en cèl·lules precanceroses (Figura 22). L'activació d'aquesta apoptosi es dona a través de vies de senyalització tant Smad dependents com Smad independents. La via pro-apoptòtica Smad-dependent engloba la inducció d'un gran nombre de proteïnes pro-apoptòtiques entre les quals hi podem trobar la TGF- β *inducible early response gene* (TIEG1) (Tachibana et al. 1997), la proteïna quinasa associada a mort (DAPK) (Jang et al. 2002; Valderrama-Carvajal et al. 2002) i la inositol-5-fosfatasa (SHIP) (Valderrama-Carvajal et al. 2002). La TIEG1 induïx estrès oxidatiu (Ribeiro et al. 1999), mentre que la DAPK induïx l'alliberament de citocrom C per part de les mitocondries per a promoure directament l'apoptosis (Jang et al. 2002). Al mateix temps, la SHIP inhibeix la senyalització pro-supervivència de la via PI3K/Akt (Valderrama-Carvajal et al. 2002). En la via pro-apoptòtica Smad-dependent, també hi pot jugar un paper fonamental la proteïna Smad4, la qual és capaç d'induir la senyalització de la via SAPK/JNK per a promoure l'expressió de gens pro-apoptòtics com ara BIM, BMF, BAX i Caspasa 9 (Atfi et al. 1997; Ohgushi et al. 2005; Wildey, Patil, and Howe 2003). En el mateix sentit, el TGF- β també és capaç d'induir directament l'expressió d'altres gens pro-apoptòtics com ara BIK, Caspasa 3 i Caspasa 8, al mateix temps que inhibeix l'expressió de gens anti-apoptòtics com Bcl-XL, XIAP i Bcl-2 (Chipuk et al. 2001; Francis et al. 2000; Saltzman et al. 1998; Shima et al. 1999). Per altra banda, el TGF- β també ha estat directament relacionat amb l'apoptosis induïda per Fas, a través de la proteïna adaptadora DAXX, la qual ajuda a activar la senyalització del receptor de Fas. DAXX és capaç d'estabilitzar el T β RII, promovent la senyalització de JNK i la potenciació de la senyalització pro-apoptòtica de Fas (Perlman et al. 2001). Ha estat descrit, també, que fins hi tot cèl·lules que són resistents a la inhibició del creixement per part del TGF- β , són encara sensibles però, a la mort induïda pel TGF- β induint la translocació de les proteïnes mitocondrials ARTS al nucli. Aquesta translocació estimula l'activació de Caspasa 3 la qual és capaç d'inhibir la senyalització anti-apoptòtica de les proteïnes Bcl-XL i XIAP, promovent la inducció de l'apoptosi (Gottfried et al. 2004; Larisch-Bloch et al. 2000; Larisch et al. 2000). Sorprenentment, alguns estudis demostren que l'apoptosis induïda per TGF- β es pot activar fins hi tot en aquelles cèl·lules que han estat capaces de fer EMT. Per exemple, en cèl·lules pancreàtiques sota l'estímul del TGF- β s'indueix EMT al mateix moment però que Smad4 inhibeix la senyalització de Klf5. Sense Klf5, Sox4 induïx apoptosis (David et al. 2016). Tots aquests mecanismes pro-apoptòtics induïts pel TGF- β es poden veure alterats si es perd la correcta senyalització d'aquesta via. En molts casos, la senyalització pro-apoptòtica del TGF- β és Smad-dependent, amb sobre-expressió d' Smad4, com s'ha vist en les cèl·lules de càncer de mama MDA-MB-468 (Dai, Bansal, and Kern 2002). Tot

i això, s' ha demostrat en línies cel·lulars d' hepatocarcinoma (Hep3B) que quan l' expressió d' Smad3 està reduïda, l' apoptosi induïda pel TGF- β no es dona. També s' ha descrit que el paper del T β RII és fonamental per a activar l' apoptosi en el procés de regeneració del teixit epitelial, tot evitant una híper-proliferació tissular. Per tant, si el T β RII es perd en les cèl·lules epitelials de la pell, aquesta pèrdua d' apoptosi trencarà el fi balanç que hi ha d' haver entre apoptosi i híper-proliferació, donant lloc a una progressió tumoral que pot acabar amb un carcinoma escamós invasiu (Guasch et al. 2007). De forma similar, la *down*-regulació d' Smad2 o l' expressió d' un dominant negatiu pel T β RII en cèl·lules NRP-152, una línia no tumorigènica de teixit epitelial de pròstata, redueix la sensibilitat d' aquestes cèl·lules a morir per apoptosi induïda per TGF- β , promovent, subseqüentment, una transformació maligna d' aquestes cèl·lules i permetent-les-hi adquirir la capacitat d' induir tumors quan són injectades en ratolins *nude-scid* (Tang et al. 1999; Yang, Wahdan-Alaswad, and Danielpour 2009). Per altra banda, en cèl·lules pancreàtiques deficients per Smad4, la senyalització de la proteïna Klf5 està híper-activada, inhibint l' apoptosi i conduint les cèl·lules a la immortalització i dotant-les de la subseqüent capacitat tumorigènica (David et al. 2016).

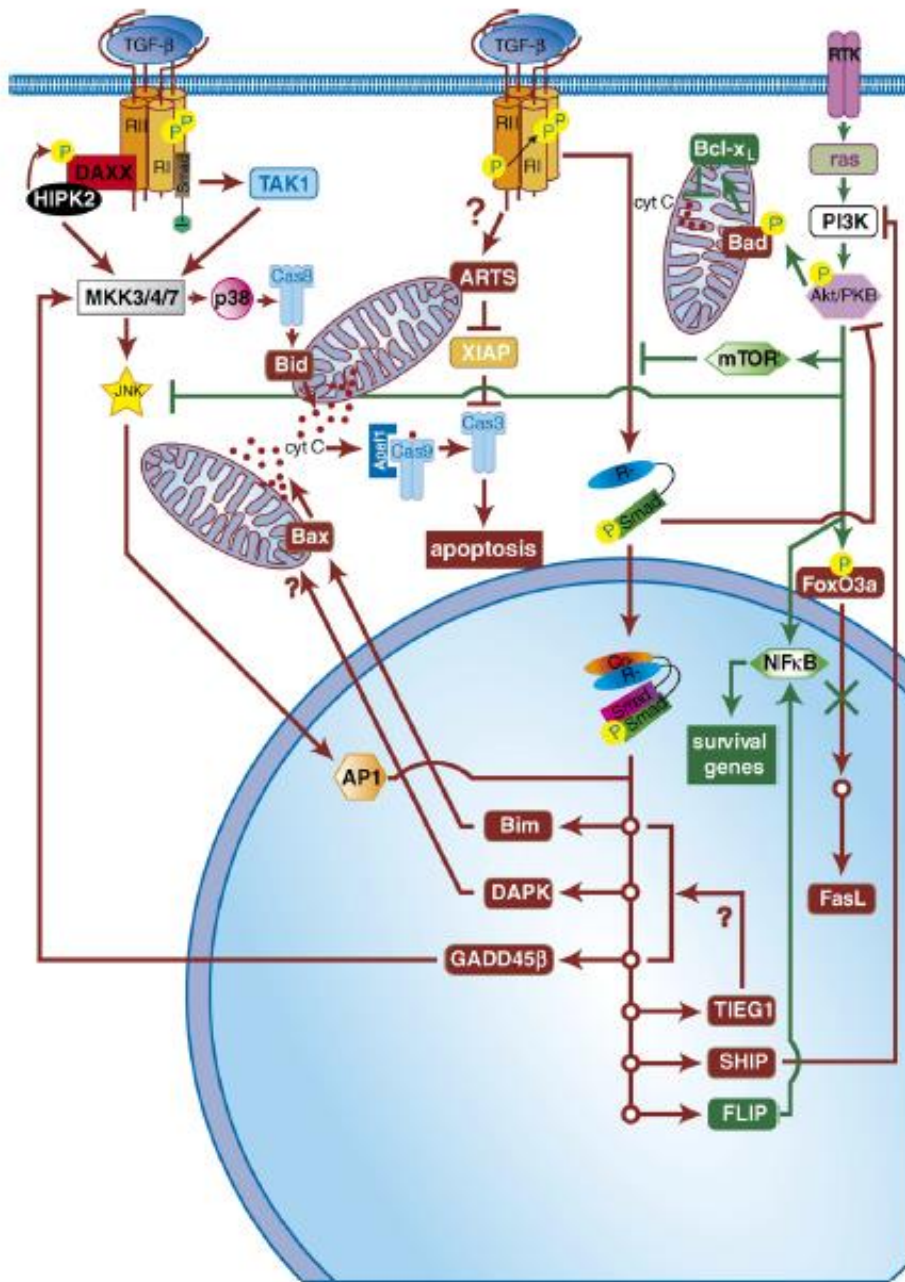


Figura 22. Representació de l'activació de l'apoptosis induïda pel TGF-β. Adaptat de Pardali et al., 2006

3.5 EFECTES TUMOROGÈNICS DEL TGF- β

A banda de la ja descrita capacitat del TGF- β per a induir EMT i promoure la metàstasi en estadis avançats del càncer, altres efectes pro-tumorogènics del TGF- β s'han anat identificant al llarg dels anys.

3.5.1 GENERACIÓ DE MIOFIBROBLASTS

La mobilització de miofibroblasts és un altre component essencial de l'efecte pro-invasiu del TGF- β . El TGF- β estimula la generació de miofibroblasts a partir de precursors mesenquimals (De Wever and Mareel 2003) (Figura 23). Aquest miofibroblasts tenen característiques dels fibroblasts i del múscul llis i són importants per la seva gran motilitat. La seva presència en l'estroma tumoral (fibroblasts associats al càncer) facilita el desenvolupament del tumor (Allinen et al. 2004; De Wever and Mareel 2003). Per exemple, s'ha demostrat que en plaques de cultiu, aquests miofibroblasts guien la invasió de cèl·lules de càncer colorectal a la matriu de col·lagen, un procés que necessita una aportació continua de TGF- β . A més, és important destacar que els miofibroblasts produeixen gran quantitat de metaloproteases de matriu extracel·lular, citokines (IL-8, VEGF) i quimioquines (CXCL12) per a promoure la proliferació de les cèl·lules canceroses, la invasió tumoral i la neoangiogènesis.

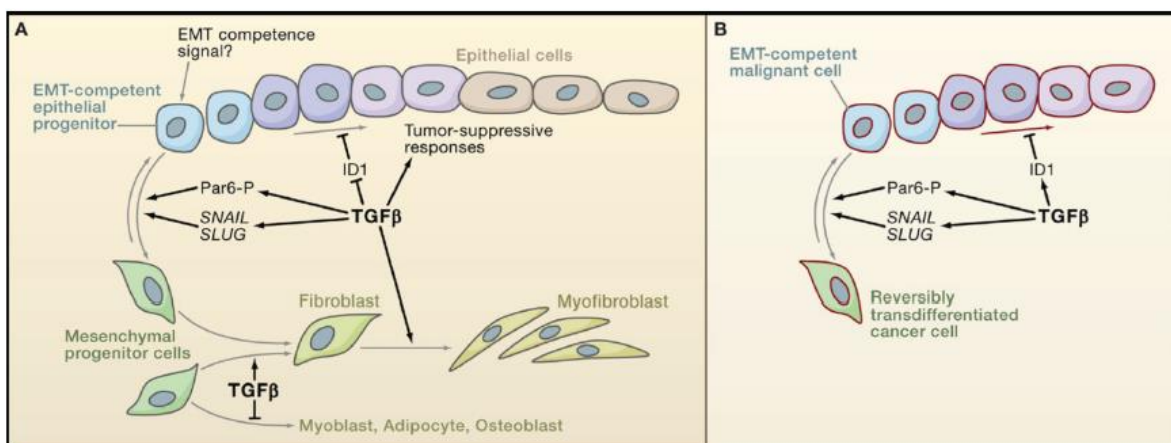


Figura 23. Esquema de la inducció de miofibroblasts per part del TGF- β . Adaptat de Massagué et al., 2008.

3.5.2 PRODUCCIÓ AUTOCRINA DE MITÒGENS

El TGF- β és també capaç de promoure la proliferació cel·lular estimulando la producció de factors mitogènics de forma autocrina. Per exemple, se sap que la pèrdua del braç supressor de tumors del TGF- β en glioma activa la producció de mitògens quan aquests són sotmesos a l'estímul del TGF- β (mitjançant l'activació de vies no canòniques). De fet, les cèl·lules de glioma proliferen en cultiu, sota l'estímul del TGF- β , degut a que aquest estimula la producció de PDGF- β a través de la regulació de l'estat de metilació del promotor d'aquest gen (Bruna et al. 2007; Jennings and Pietenpol 1998).

3.5.3 EVASIÓ DE LA IMMUNITAT

També es coneguda la funció immunosupressora que desenvolupa el TGF- β sobre les cèl·lules del sistema immune, aquesta característica pot ser aprofitada per les cèl·lules tumorals per a evadir l'atac de les defenses del nostre organisme (Figura 24). En melanoma i timoma de ratolí, s'ha vist que l'expressió, en cèl·lules T, d'una forma dominant-negativa del T β RII prevé el creixement d'aquests tumors (Gorelik and Flavell 2000). A més, la senyal del TGF- β induïda a través de la via Smad reprimeix la producció de factors citolítics tals com les perforines, factors pro-apoptòtics com les granzimes A i B, les citoquines Fas-ligand i Interferó gamma, per part de les cèl·lules T CD8⁺ (Thomas and Massagué 2005).

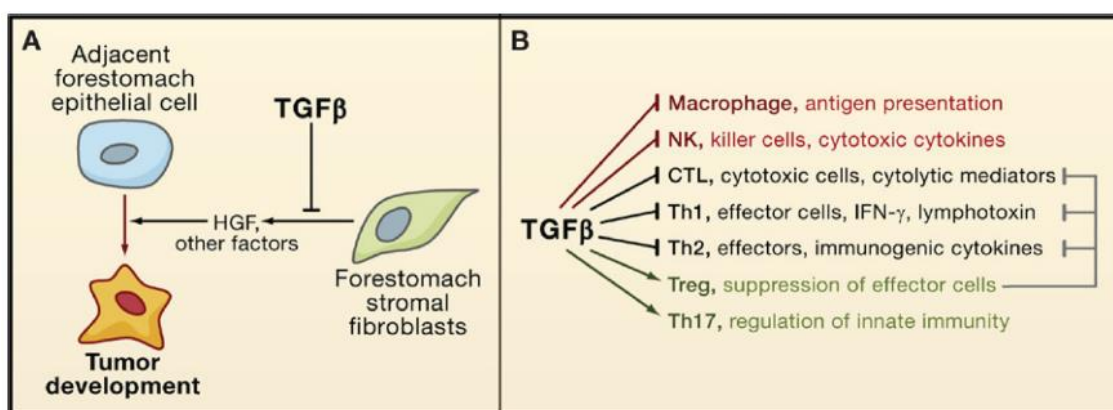


Figura 24. Representació de l'evasió de la immunitat causada pel TGF- β . Adaptat de Massagué et al., 2008.

3.5.4 TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA (EMT)

La transició epiteli-mesènquima és una diferenciació cel·lular que permet a les cèl·lules epitelials migrar, moure's dins el seu ambient local i fins i tot entrar dins el torrent sanguini ja durant la metàstasi. Comença amb la destrucció de l'epiteli polaritzat seguit de l'adquisició de característiques mesenquimals i migratòries de les cèl·lules que en són participants. Aquest procés requereix d'una disrupció i desorganització de les unions cèl·lula-cèl·lula així com de les unions cèl·lula-matriu, seguida d'una degradació de la matriu extracel·lular circumdant. L'EMT és un procés que es dona de forma natural durant el desenvolupament i fins hi tot durant la reparació tissular, tot i això, també intervé en processos patològics com ho pot ser la metàstasi d'un càncer o la fibrosi tissular (Thiery et al. 2009). Aquesta EMT està controlada per una amalgama de factors de transcripció que inclouen les proteïnes amb dits de zinc *Snail* i *Slug*, el factor *bHLH Twist*, les proteïnes amb homeodominis/dits de zinc *ZEB-1* i *2* i el factor *forkhead FoxC3*. Es tracta d'un procés on hi juga un paper fonamental el TGF- β (Figura 25).

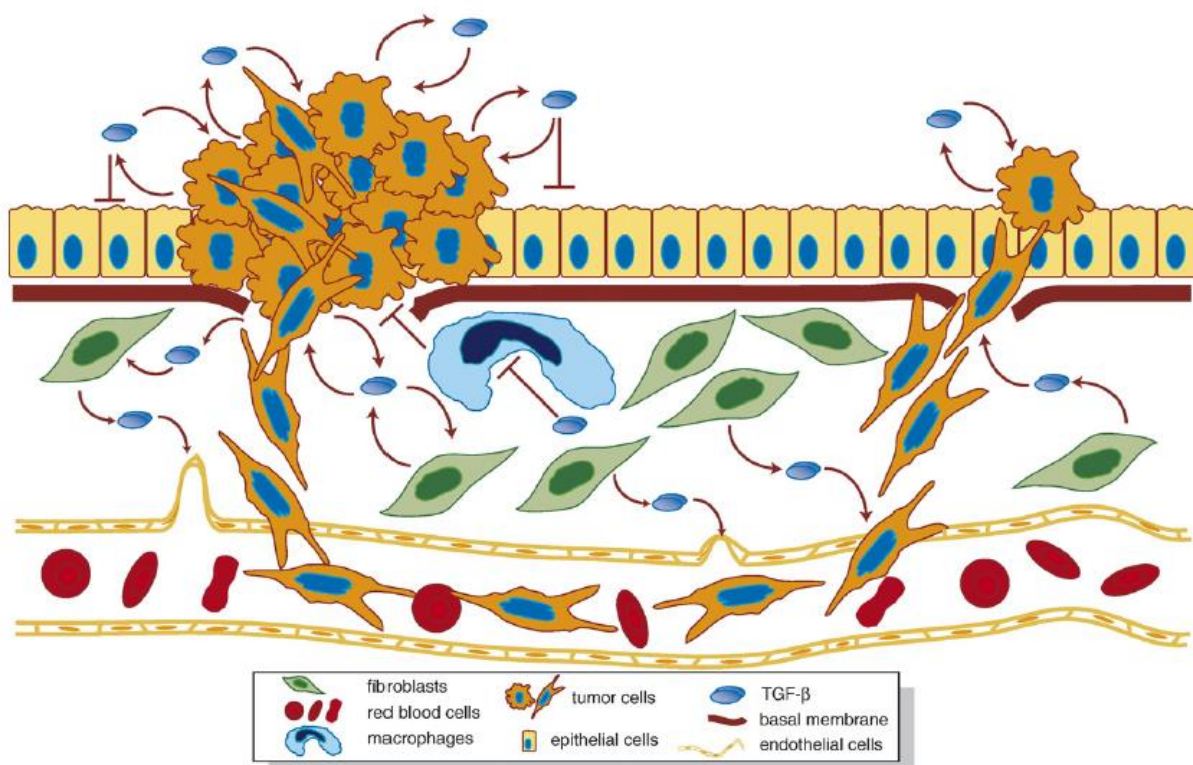


Figura 25. Representació de la inducció d'EMT per part del TGF- β . Adaptat de Pardali et al., 2006.

3.5.4.1 CONTROL DE LA EMT PER PART DE LES SMADS

Al llarg dels darrers anys una sèrie innumerable d' experiments han demostrat el paper crucial que tenen les Smads en la inducció d' EMT per part de la senyalització per TGF- β . S' han descrit una gran quantitat de gens que regulats per la via del TGF- β poden activar el procés d' EMT; entre aquests, els gens Id2 i Id3 hi juguen un paper fonamental. L' activació de les Smads per part dels receptors del TGF- β indueix una repressió robusta i sostinguda dels gens Id2 i Id3, aquesta repressió és crítica per a la *down*-regulació d' E-cadherina i ZO-1 (Kowanetz et al. 2004) necessària per al progrés de l' EMT. Aquesta repressió d' Id2 i Id3 és revertida un cop les cèl·lules que han migrat han estat capaces d' establir metàstasis per a proporcionar un ratio de proliferació i de supervivència més alt a les cèl·lules canceroses en el seu nou ambient tumoral (Perk, Iavarone, and Benezra 2005). Tan important com la repressió dels gens Id, ho és l' expressió d' altres gens repressors de l' E-cadherina com els membres de la família *Snail*, les proteïnes *ZEB*, *Twist*, *LEF-1* etc. totes elles involucrades en la repressió de l' E-cadherina en resposta al TGF- β (Thuault et al. 2006). Aquests repressors reconeixen les seqüències de DNA E-box, situades prop de l' origen de replicació del gen de l' E-cadherina, aquesta inhibició és crucial, doncs l' E-cadherina és un component indispensable per a la formació de les unions adherents les quals han de desaparèixer per a que es pugui donar una correcta i completa EMT (Ozdamar et al. 2005).

En conclusió, el TGF- β és capaç d' activar i promoure l' EMT a través d' una complexa regulació molecular que en última instància acaba amb la progressió de les cèl·lules epitelials cap a una estructura mesenquimal, la millora de la motilitat cel·lular i l' adquisició de capacitat metastàtica.

3.6 ALTERACIONS DE LA VIA TGF-B EN CÀNCER

Degut a la necessitat d' evadir els efectes supressors tumorals per a poder progressar, molts càncers acumulen mutacions inactivadores dels receptors del TGF- β així com de les proteïnes Smads. Per tant, és important conèixer les estratègies que adopten diversos tipus tumorals per a evitar la senyal citostàtica i pro-apoptòtica del TGF- β (Shi and Massagué 2003).

3.6.1 ALTERACIONS EN ELS RECEPTORS DEL TGF-B

Ha estat descrit que càncers com el de còlon, el gàstric, biliar, pulmonar, d' ovari, d' esòfag i alguns de cap i coll presenten inactivacions bial·lèliques del TR β II a través de mutacions que trunquen la proteïna o be n' inactiven el seu domini quinasa (Levy and Hill 2006). Els tipus de tumors que presenten més mutacions en el T β RII són aquells que tenen una gran inestabilitat de microsatèl·lits, una condició causada principalment per mutacions en gens reparadors del DNA. S' ha descrit aquest fenomen en càncers gastrointestinals, de còlon, biliars, adenocarcinomes de pulmó i gliomes. Per contra, càncers com el d' endometri o de mama que també poden presentar inestabilitat de microsatèl·lits, no acumulen mutacions en el T β RII (Levy and Hill 2006). Per altra banda, altres tipus de mutacions com mutacions de canvi en el marc de lectura o mutacions de canvi de sentit (*missense*) en la regió codificant del T β RI han estat descrites en varis càncers d' ovari, d' esòfag, cap i coll. De fet, l' al·lel hipomòrfic TGF β I*6A s' ha associat amb mal pronòstic en alguns tipus de càncers com ara el de pròstata (Kaklamani et al. 2004). Més recentment, també s' han descobert regulacions epigenètiques capaces de disminuir els nivells d' expressió dels receptors I i II del TGF- β ; de fet, aquest fenomen es dona freqüentment en càncers de pulmó, gàstrics, de pròstata i de bufeta. Per acabar, s' han descrit mutacions germinals en el receptor tipus I de les BMP (BMPRIA) en casos de Síndrome de Poliposis Juvenil (SPJ), una malaltia autosòmica dominant amb predisposició a desenvolupar càncer gastrointestinal (Levy and Hill 2006).

3.6.2 SISTEMES CONTRA CO-RECEPTORS I LLIGANDS

Seguint amb el mateix objectiu d' intentar evitar la senyalització per TGF- β , molts tumors desenvolupen mecanismes per tal de segrestar o inactivar co-receptors d' aquesta via o be els seus lligands. En aquest sentit, han estat identificades diferents tipus de proteïnes com ara: *Noggin*, *Chordin*, *Gremlin*, *Follistatin*, *DAN/cerberus* i *Bmper* capaces de segrestar les BMPs, mentre que les activines són segrestades només per les *follistatines* i els Nodals per la *DAN/cerberus*. Un augment en l' expressió de les *follistatines* ha estat descrit en l' hepatocarcinogènesis i en la metàstasi de mama a teixit ossi (Kang et al. 2003; Rodgarkia-Dara et al. 2006). D' igual manera, *Gremlin-1* ha estat identificada com a un factor important en la progressió d' alguns carcinomes de pell i altres tipus de càncers (Sneddon et al. 2006).

3.6.3 ALTERACIONS EN LES R-SMADS I CO-SMADS

Tot i la importància de les Smads reguladores en la senyalització pel TGF- β , les mutacions en aquestes proteïnes són molt poc freqüents en els càncers. Només han estat descrites mutacions intragèniques d' Smad2 en una proporció molt petita de càncers colorectals (Sjöblom et al. 2006) i pèrdues d' expressió d' Smad3 en alguns tipus de càncers gàstrics i leucèmies limfoblàstiques de cèl·lules T (Levy and Hill 2006). Més recentment, la pèrdua dels gens Smad2 i Smad3 ha estat descrita com un factor causant del carcinoma d' endometri en ratolins (Kriseman et al. 2019). En contraposició a les poques alteracions conegudes de les R-Smads en càncer, la Co-Smad Smad4 és, freqüentment, una diana d' inactivació en molts tipus de tumors (Levy and Hill 2006). En càncer de pàncreas s' han identificat deleccions en el cromosoma 18q21 que afecten a Smad4. De fet, les mutacions en Smad4 són presents en més de la meitat dels carcinomes pancreàtics, tenint una prevalença similar a les mutacions en *KRAS*, *p53* i *p16INK4A* (Jaffee et al. 2002). Seguint en la mateixa línia, una gran majoria dels càncers esporàdics de còlon sense inestabilitat de microsatèl·lits, també presenten mutacions en Smad4; el mateix passa en els tumors esofàgics i en menor mesura en altres tipus de càncers (Sjöblom et al. 2006). Cal apuntar, que les inactivacions d' Smad4 són esdeveniments que es donen en estadis tardans del càncer i que, per tant, ajuden a la seva progressió.

3.6.4 ANTAGONISTES DE LES SMADS

Cada pas de la via TGF- β està minuciosament controlat i regulat per factors especialitzats, per tant, no és d' estranyar que alguns d' aquests factors reguladors es vegin alterats en càncer. Les proteïnes Smad6 i Smad7 són reguladors negatius de la via que s' activen a través de senyalitzadors antagònics o be com a un feedback regulador negatiu del mateix TGF- β (Massagué, Seoane, and Wotton 2005b). Smad6 competeix amb Smad4 per la unió a Smad1 actiu, i, Smad7 recluta Smurf per a inactivar els receptors del TGF- β i de les BMPs. Per tant, no és d' estranyar que s' hagi d' escrit una sobre-expressió d' Smad7 en carcinomes d' endometri i tumors fol·liculars de tiroïdes (Cerutti et al. 2003; Dowdy et al. 2005). També s' ha vist que una sobre-expressió d' Smad7 en cèl·lules del sistema immune presents en la mucosa del còlon condueix a una inflamació crònica la qual predisposa el teixit a tornar-se cancerós (Broderick et al. 2007).

3.7 EFECTES DEL TGF-B EN L' ENDOMETRI

Com en d'altres teixits, el TGF- β és capaç de regular el creixement, la diferenciació cel·lular, l'apoptosis, la resposta immunitària, la migració i la tumorigènesi en l'endometri. Les tres isoformes del TGF- β hi són presents (TGF- β 1, 2 i 3) tot i que d'una manera regulada en l'espai i el temps. El TGF- β 2 es troba principalment localitzat en les cèl·lules estromals, mentre que el TGF- β 1 i 3 es troben tant en cèl·lules estromals com epitelials (Godkin and Doré 1998). Tot i això, aquestes citocines tenen una acurada regulació que fa que s'expressin de forma cíclica en l'endometri, mentre que els TGF- β 1 i 2 s'expressen just abans de la menstruació, ajudant al descamament que sofreix la paret endometrial, la màxima expressió de TGF- β 3 es dona durant la fase secretora, la qual cosa fa pensar en que aquesta isoforma del TGF- β té un paper cabdal en la preparació de l'endometri per a una suposada implantació embrionària (Figura 26). També s'ha descrit que un defecte o una manca dels receptors de TGF- β o bé dels seus lligands condueix a la pèrdua de la fertilitat en femelles de ratolí i, a més, una desregulació de la senyalització pel TGF- β en l'endometri pot derivar en l'adquisició d'un fenotip tumoral augmentant la capacitat migratòria i metastàtica de les cèl·lules endometrials transformades (Gao, Li, and Li 2014)(Kriseman et al. 2019).

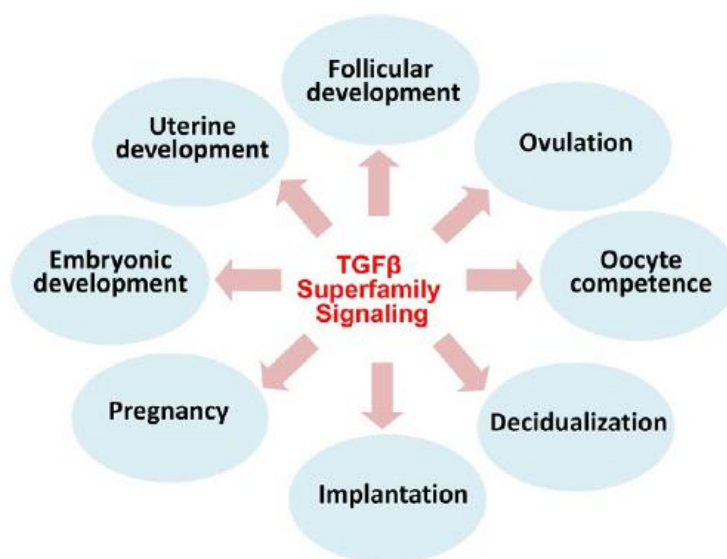


Figura 26. Esquema dels efectes del TGF- β en l'endometri. Adaptat de Li et al., 2014.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La importància de la regulació de l'homeòstasi cel·lular i de la intercomunicació entre les diverses vies que participen en aquesta és un dels pilars per a entendre la carcinogènesis. Degut al paper cabdal que juga la via PI3K/Akt en el carcinoma d' endometri i la creixent relació d' aquesta via amb la del TGF- β és important analitzar i estudiar els efectes i la correlació que guarden aquestes dues vies en l' endometri i com això afecta a la progressió tumoral. En aquest sentit, els objectius que s' han establert en aquest treball són:

1. Estudi dels efectes del TGF- β en cultius tridimensionals d' endometri.
2. Estudi de la interacció del TGF- β i la via PI3K/Akt en la carcinogènesis endometrial.
3. Estudi dels efectes de la polaritat cel·lular sobre la senyalització pel TGF- β i el seu paper en la carcinogènesis endometrial.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

1.1 MATERIAL I REACTIUS USATS EN ELS EXPERIMENTS AMB CULTIUS CEL·LULARS

Els medis de cultiu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) i DMEM/F12, el sèrum fetal boví inactivat (FBSi), el sèrum de cavall (*horse serum*, HS), la tripsina, el *Hank's balanced salt solution* (HBSS), l' amfotericina B, l' EGF (*epidermal growth factor*) i el ITS (*insulin-Transferrin-Sodium-Selenite*) s' adquireixen a Invitrogen. El piruvat sòdic, l' hepes, la penicil·lina/estreptomicina, la tripsina al 0,25% d' EDTA, el dimetilsulfòxid (DMSO), el bromur de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5 difeniltetrazol (MTT), són de Sigma Aldrich. El Matrigel® s' obté de la casa comercial BD Biosciences i el DCC (*dextran-coated charcoal-stripped serum*) a GIBCO.

1.2 CULTIUS DE LÍNIES TUMORALS

La línia cel·lular humana de ronyó embrional, HEK293T, és un bon model per a sobreexpressar i obtenir proteïnes cel·lulars i extracel·lulars, secretades o de membrana. Aquesta línia cel·lular expressa l' antigen T de SV40, permetent la replicació episomal de plàsmids que continguin la regió promotora SV40. La línia cel·lular HEK293T creix en medi DMEM, complementat amb un 10% de FBSi, un 10% d' aminoàcids no essencials (NEAA; GIBCO), 1nM de piruvat sòdic i es manté a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂. Per a mantenir la línia cel·lular, es renta la placa amb tampó fosfat salí (PBS), posteriorment, es desenganxen les cèl·lules amb tripsina al 0,25% d' EDTA durant 3 minuts a 37°C. Tot seguit, s' atura l' acció de la tripsina afegint medi DMEM amb un 10% d' FBSi, es recullen i es centrifuguen les cèl·lules a 1000 rpm durant 3 min. Un cop centrifugades, les cèl·lules es dilueixen 1:10 i es sembren.

1.3 AÏLLAMENT DE CÈL·LULES EPITELIALS D'ENDOMETRI MURÍ I ESTABLIMENT DE CULTIUS EN DUES DIMENSIONS (2D). I EN TRES DIMENSIONS (3D)

Per a l' aïllament de cèl·lules epitelials d' endometri murí i el seu posterior establiment en cultius tridimensionals, s' utilitzen femelles d' entre 3 i 4 setmanes d' edat. Primerament, es sacrifiquen les femelles requerides per dislocació cervical, se n' extreu l' úter, que és bicorn, i es talla cada branca en 3-4 trossos de 4mm aproximadament. Aquests trossos es netegen amb HBSS i es digereixen amb 1% de tripsina diluïda en HBSS, durant 1 hora a 4°C, i durant 45 minuts a temperatura ambient. La tripsina s' inactiva afegint medi DMEM amb un 10% de FBSi. En aquest moment, es pot procedir ja a l' obtenció de les cèl·lules epitelials de la llum de l' úter. Amb aquesta finalitat, s' aplica una lleu pressió amb una fulla de bisturí sobre els trossos d' úter parcialment digerits, obtenint així, una làmina de cèl·lules. Aquesta làmina epitelial es recull i es neteja dues vegades amb PBS. Posteriorment, es disgrega mecànicament passant les cèl·lules obtingudes a través d' una punta de pipeta p1000, 50 cops. A continuació, les cèl·lules, que es troben formant agregats de 4-8 cèl·lules, es resuspenen en medi DMEM/F12 suplementat amb 1mM d' hepes, 1% de penicil·lina/estreptomicina, 0,1% d' amfotericina B i 2% de DCC, i es planten, en primer lloc, en dues dimensions. Aquestes cèl·lules es cultiven durant 24 hores a 37°C en una atmosfera humida i al 5% de CO₂.

L' endemà, es planten les cèl·lules endometrials en tres dimensions. Primerament, les cèl·lules epitelials d' endometri de ratolí, que es troben creixent en dues dimensions, es netegen amb PBS i es disgreguen amb tripsina al 0,25% d' EDTA durant 5 minuts a 37°C. Tot seguit, la digestió s' atura amb l' adició de medi DMEM suplementat amb 10% FBSi. Es recullen les cèl·lules i se centrifuguen a 800 rpm durant 5 minuts. Posteriorment, es netegen amb PBS dues vegades, i es disgreguen mecànicament fins a formar agregats cel·lulars de 2 a 8 cèl·lules. Qualsevol intent d' individualitzar les cèl·lules provoca una dràstica disminució de la viabilitat cel·lular. Tot seguit, les cèl·lules es resuspenen en medi DMEM/F12 suplementat amb 1mM d' hepes, 1% de penicil·lina/estreptomicina, 0,1% d' amfotericina B i 3% de Matrigel®, i es planten a una concentració final de 4x10⁴ agregats cel·lulars/ml, sobre un llit de Matrigel®, prèviament polimeritzat. Al dia següent, es canvia el medi per medi nou igual a l' anterior però suplementat també amb 5 ng/ml d' EGF, una dilució 1:100 d' ITS i 3% de Matrigel®. A partir d' aquest moment, el medi es canvia cada 2-3 dies emprant cada vegada aquest darrer medi suplementat.

1.4 AVALUACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ MITJANÇANT L'ASSAIG D'INCORPORACIÓ DE BRDU

La BrdU (*Bromodeoxyuridine*) és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina que s' empra molt comunament per detectar cèl·lules que proliferen. Així, les cèl·lules que incorporen la BrdU enlloc de la timidina són aquelles que es repliquen.

Per dur a terme aquest assaig, cal afegir la BrdU al medi de cultiu a una concentració final de 4µg/ml durant 16 hores. Passat aquest temps, els cultius es fixen amb paraformaldehid (PFA) fred al 4% durant 20 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es fan tres rentats amb PBS. Posteriorment, es desnaturalitza el DNA amb HCl 2M durant 30 minuts a 37°C. Aquest pas permet que l' anticòs primari sigui capaç de reconèixer la BrdU. Passats els 30 minuts, s' afegeix tetraborat sòdic 0,1M durant 2 minuts per tal de neutralitzar el HCl. Seguidament, el cultiu es torna a rentar tres vegades amb PBS i s' hi afegeix una solució de bloqueig (5% HS, 5% FSBi, 0,2% glicina i 0,1% de tritó X-100 tot dissolt en PBS) durant una hora. Passada aquesta hora, es fan tres rentats més amb PBS i s' incuben les cèl·lules amb l' anticòs primari de ratolí anti-BrdU (ref. M0744, dilució 1/100, Dako) durant 16 hores. Finalment, es retira l' anticòs primari, es renten els pous tres cops més amb PBS i s' incuba amb l' anticòs secundari de cabra anti-ratolí Alexa Fluor 546 (ref. A11003, dilució 1/500, Life Technologies) i Hoechst durant 3-5 hores. Transcorregut aquest temps, ja es pot visualitzar la tinció de la BrdU utilitzant un microscopi confocal.

1.5 ANÀLISIS DE LA MIDA GLANDULAR DELS ESFEROIDES

Un altre sistema per a avaluar la proliferació cel·lular emprada en aquest treball és la mesura dels diàmetres glandulars dels cultius primaris tridimensionals. Això és possible utilitzant un software d' anàlisi d'imatge (Image J version 1.46r; NIH Bethesda, MD). Per a fer-ho és necessari obtenir fotos del cultiu susceptible d' anàlisi en format 8-bit i quantificar, com a mínim, el diàmetre de 150 glàndules per condició.

1.6 RECOMPTE DE MORT APOPTÒTICA PER TINCIÓ DE HOECHST I QUANTIFICACIÓ DE CASPASA 3 ACTIVA

El reactiu Hoechst 33258 és un compost fluorescent que s' uneix al DNA i que es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. El Hoechst té la qualitat de tenyir tant cèl·lules vives com cèl·lules fixades, ja que és capaç de travessar la membrana plasmàtica i nuclear de les cèl·lules vives.

Per a dur a terme el recompte de cèl·lules amb caspasa 3 activa, les cèl·lules seran fixades en PFA fred al 4% durant 20 minuts. Després es renten tres cops amb PBS i es permeabilitzen en solució de permeabilització (PBS al 2% BSA, 1% de tritó X-100 i 2% de FBS) durant una hora a temperatura ambient. Un cop les cèl·lules s' han permeabilitzat s' hi posa l' anticòs primari anti-caspasa 3 activa (ref. 9661 dilució 1/100, Cell Signaling) i s' incuba durant 16 hores a 4°C. Transcorregudes les 16 hores, es fan 3 rentats amb PBS i s' incuba amb l' anticòs secundari de conill Alexa Fluor 488 (ref. 11008, dilució 1/500, Invitrogen) i Hoechst durant 3-5hores. Passat aquest temps, ja es pot visualitzar la tinció de caspasa 3 activa emprant un microscopi confocal. Per comptabilitzar la mort apoptòtica, es consideren aquelles cèl·lules que presenten activació de la caspasa 3 juntament amb la condensació de la cromatina nuclear.

1.7 PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS

1.7.1 TRANSFECCIÓ AMB POLIETILENAMINA (PEI)

Degut a que la major part de les membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, és molt difícil que les molècules també amb càrrega negativa, com ho són els àcids nucleics, puguin travessar-les. Els lípids catiònics, com la polietilenamina, condensen el DNA plasmídic, neutralitzant així les càrregues negatives i protegint-lo de l' acció de les DNAses. Aquests agregats de DNA plasmídic i PEI, presenten, doncs, una alta afinitat de transfecció essent un mètode útil per a introduir material genètic dins línies cel·lulars.

La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics. Es dilueixen 5µl de PEI 1x (10µM) per cada µg de DNA, en una solució salina estèril (NaCl 150µM). El DNA també

és diluït en aquesta solució de NaCl en el mateix volum que està diluït el PEI. Un cop es tenen les dues barreges per separat, s'afegeix la solució de PEI damunt la solució del DNA i es vorteja durant uns 60 segons. La barreja es deixar reposar 20 minuts a temperatura ambient, temps durant el qual es formen els complexos de PEI i DNA. La solució de transfecció s'afegeix damunt la placa de cultiu gota a gota. Entre 3-4 hores després de la transfecció es canvia el medi pel propi medi de cultiu de la línia cel·lular en qüestió.

1.7.2 PRODUCCIÓ I CONCENTRACIÓ DE LENTIVIRUS EN CÈL·LULES HEK 293 T

Ja que per a infectar cultius primaris és necessària una gran quantitat de partícules lentivirals, es necessari partir de tres plaques p100 de cèl·lules HEK 293T a una concentració aproximada de 35×10^5 cèl·lules per placa per a cada tipus de lentivirus que es vulgui obtenir.

L'endemà de ser plantades les cèl·lules, es canvia el medi cel·lular per un medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum, i es mantenen les cèl·lules a l'incubador a 37°C al 5% de CO₂ en atmosfera humida, almenys una hora.

Durant el transcurs d'aquesta hora, es prepararà la barreja de transfecció. Es transfectaran un total de 30µg de DNA per placa, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 1:1:1. És a dir, 10µg de plàsmid lentiviral, 10µg del plàsmid empaquetador psPAX2 i 10µg del plàsmid PMD2G que codifica per l'embolcall víric. Cal un total de 100µl de PEI per a transduir 30µg de DNA. Tant el DNA com el PEI es resuspenen en solució NaCl 150mM estèril. Posteriorment, s'afegeix la solució del PEI sobre la del DNA i es vorteja 60 segons. La barreja es deixa reposar 20 minuts, després dels quals s'afegirà gota a gota 1ml d'aquesta barreja a cada placa de HEK 293T i es deixarà a l'incubador durant 3-4 hores. Per a infectar cultius primaris, els virus requereixen ser concentrats, per a fer-ho es fa servir una columna de concentració VIVASPIN 20 i es centrifuga el sobrenedant cel·lular durant 2 hores a 4000 rpm, obtenint en la columna el virus ja concentrat i llest per infectar.

1.7.3 INFECCIÓ DE CULTIUS PRIMARIS AMB LENTIVIRUS

Un cop obtingut el cultiu de cèl·lules epitelials d'endometri murí en dues dimensions, i transcorregudes 4 hores en repòs en l'incubador a 37°C en atmosfera humida al 5% en CO₂, s'afegeix al pou que es vol infectar una desena part del medi concentrat de partícules lentivirals així com una concentració final de 8µg/ml de *Polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma)*. Per a

ser correctament infectades, les cèl·lules epitelials han de restar en contacte amb els virus durant 16-18 hores i, posteriorment, s' haurà de reemplaçar el medi cel·lular pel seu propi medi de cultiu fresc i lliure de virus.

2. ANIMALS D' EXPERIMENTACIÓ

2.1 CONSIDERACIONS PRÈVIES

Per a dur a terme aquest treball s' han utilitzat com animals d' experimentació ratolins de laboratori allotjats en instal·lacions de barrera. Els animals han estat sotmesos a procediments lliures de patògens i s' han mantingut en condicions de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, una humitat relativa del $50\pm 5\%$, amb cicles de 12 hores de llum/foscor i un accés *ad libitum* a menjar i aigua.

Tots els estudis *in vivo* realitzats amb aquests animals, s' han regit per les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, del 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals emprats per a experimentació animal i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, del 30 de juliol, de la Generalitat de Catalunya, pel qual es regula la utilització d' animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.*
- En el marc de la legislació europea, la Directiva 63/2010/UE, que deroga a la Directiva 86/609/CEE, del 22 de setembre del Consell d' Europa sobre la protecció dels vertebrats utilitzats amb finalitats experimentals i d' altres finalitats científiques.

Finalment, tots els procediments amb ratolins s' han realitzat sota la supervisió del personal del centre, i sempre, respectant les directrius legals i ètiques vigents. A més, els estudis han estat degudament aprovats pel Comitè Ètic d' Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

2.2 SOQUES DE RATOLINS EMPRADES

2.2.1 RATOLINS CAG-CRE:ER^T

Aquests animals CAG-Cre:ER^T (Cre:ER^T) (B6.CGTg(CAG-cre/Esr1)5Amc/J) foren generats al laboratori del Dr. Andrew P. McMahon utilitzant la tècnica de la injecció nuclear, on el material genètic s'injecta en el pronucli d'un oòcit fecundat. El nostre laboratori va adquirir aquests ratolins mitjançant la companyia The Jackson Laboratory.

Aquesta soca de ratolí expressa la Cre recombinasa induïble per Tamoxifè sota el control del promotor de la CAG adherit al *enhancer* del citomegalovirus (CMV). El transgent generat expressa la proteïna de fusió formada per la Cre recombinasa i una forma mutada del domini d'unió a lligand del receptor d'estrògens murí (ER^T), el qual impedeix la unió amb el propis estrògens del ratolí. La proteïna de fusió Cre:ER^T es manté amb localització citoplasmàtica en condicions normals, però quan s'injecta Tamoxifè a l'animal, aquesta proteïna és capaç de translocar al nucli i actuar com a recombinasa sobre les seqüències LoxP.

La colònia Cre:ER^T es manté en heterozigosi, i els animals Cre:ER^{T+/-} presenten un fenotip sa i normal, amb capacitat reproductiva idèntica a la dels animals no transgènics.

2.2.2 RATOLINS PTEN FLOXED (PTEN^{F/F})

Els ratolins Pten^{ff} (C,129S4-Pten^{tm1Hwu}/J) foren generats pel doctor Hong Wu, usant la tècnica d'electroporació de cèl·lules embrionàries (ESC) i posterior injecció en blastocists. El nostre grup va adquirir aquests ratolins a través de l'empresa The Jackson Laboratory.

Aquests ratolins tenen seqüències LoxP flanquejant l'exó 5 de Pten, el qual codifica per al domini amb activitat fosfatasa de la proteïna. Per tant, si es creua aquest ratolí amb una soca de ratolí que expressi la Cre recombinasa aquests animals perdran l'exó 5 de Pten i, en conseqüència, l'expressió d'aquesta proteïna.

Això permetrà desenvolupar ratolins deficients en Pten en varis teixits o moments del desenvolupament segons la Cre recombinasa usada en cada cas.

Aquesta colònia es manté sempre amb homozigosi pel $Pten^{f/f}$, aquest animals presenten un fenotip normal, tant de creixement, comportament així com de reproducció; així com uns nivells normals de la proteïna PTEN si no han estat creuats amb cap animal que expressi la Cre recombinasa.

2.2.3 RATOLINS CAG-CRE:ER^TPTEN^{F/F}

Aquests ratolins CAG-Cre:ER^TPTEN^{f/f} (Cre:ER^TPTEN^{f/f}) foren generats per la Dra. Cristina Mirantes l'any 2013 a partir del creuament d' animals Cre:ER^{T+/-} i PTEN^{f/f}.

Per induir la deleció de Pten en aquests ratolins, se' ls hi subministra una injecció única de tamoxifè a una dosi de 0,5mg/kg quan tenen aproximadament un mes de vida. Entre dues i quatre setmanes post-injecció, aquests ratolins desenvolupen EIN, hgPIN i hiperplàsia de tiroïdes, degut a la pèrdua de Pten.

2.2.4 RATOLINS SMAD3^{+/-}

Aquests ratolins Smad3^{+/-} provenen del laboratori del Dr. Akihiko Yoshimura (Keio University School of Medicine). Els ratolins Smad3^{+/-} presenten una pèrdua en un al·lel de l' exó 8 del gen Smad3. Es van posar a creuar ratolins heterozigots per a obtenir tres genotips diferents Smad3^{+/+}, Smad3^{+/-} i Smad3^{-/-}. Els ratolins de tots els genotips presenten característiques fenotípiques i reproductives normals menys els ratolins Smad3^{-/-}. Aquests Smad3^{-/-}, presenten una baixa taxa de reproducció i un defecte en el desenvolupament així com en la regulació del seu sistema immunitari la qual cosa dificulta l' obtenció i la supervivència d' aquests animals.

2.2.5 RATOLINS SMAD2 FLOXED (SMAD2^{FL/FL})

La soca de ratolí Smad2^{f/f} va ser cedida pel Dr. Akihiko Yoshimura (Keio University School of Medicine). Presenten l' exó 6 d' Smad2 flanquejat per dos locusP, això permet que al creuar aquest animal amb qualsevol altra soca que expressi una Cre recombinasa la proteïna SMAD2 deixi de ser activa.

2.2.6 RATOLINS CAG-CRE:ERTSMAD2^{F/F}

Els ratolins CAG-Cre:ER^TSmad2^{f/f} (Cre:ER^TSmad2^{f/f}) s' han generat durant aquest treball mitjançant el creuament d' animals Cre:ER^{T+/-} i Smad2^{f/f}. Per induir la pèrdua d' Smad2 en aquests ratolins, se' ls subministra una única dosi de Tamoxifè 0,5mg/kg al voltant de les 4-5 setmanes de vida.

2.3 GENOTIPATGE I SEXATGE

Tots els ratolins emprats s' han deslletat i sexat als 21 dies de vida, punt en el qual són genotipats. Per aquest fi, els ratolins són adormits amb isofluorà al 2% per via aèria, marcats mitjançant codi de talls en les orelles (per a la seva identificació individual) i se' ls hi practica una petita biòpsia a la cua, tallant-ne un tros inferior als 5mm de llargada.

Tot seguit, les cues es digereixen en un tampó de genotipatge (100 mM Tris pH 8,5; 200 mM NaCl, 5 mM EDT i 0,2% SDS) i proteïnasa K a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich). La digestió es realitza durant aproximadament 2-3 hores a 56 °C i agitant-se entre 750-800 rpm. Un cop digerides, s' inactiva la proteïnasa K a 95°C durant 5 minuts i es descarten les restes de la cua no disgregades per centrifugació. Es recull el sobrenedant i, tot seguit, es precipita el DNA amb etanol absolut fred. Per últim, es resuspèn el DNA amb aigua milliQ.

Un cop extret el DNA de cadascuna de les cues tallades, es pot procedir a realitzar la PCR (*polymerase chain reaction*). Finalment, els productes de la PCR s' analitzen mitjançant separació electroforètica en un gel d' agarosa al 3% i les bandes es visualitzen per tinció amb *Safe View Nucleic Acid Stain* (NBS Biologicals).

Les PCRs de genotipatge s' han fet emprant la GoTaq Polymerase (Promega, Madison USA) i usant diversos primers per a cada gen. *Primer Pten^{fl/fl} forward* 5'-CAA GCA CTC TGC GAA CTG AG-3' i *reverse* 5'- AAG TTT TTG AAG GCA AGA TGC-3'; *Primer Cre-^{ERT+/-} forward* 5'- ACG AAC CTG GTC GAA ATC GT GCG-3' i *reverse* 5'- CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG-3'; per l' Smad3^{-/-} i l' Smad3^{+/+} s' ha utilitzat un *primer forward* comú 5'-CCACTTCATTGCCATATGCCCTG-3' i un Smad3^{+/+} *reverse* 5'-CCCGAACAGTTGGATTACACA-3' o l' Smad3^{-/-} *reverse* 5'-CCAGACTGCCTTGGGAAAAGC-3'; per l' Smad2^{fl/fl} s' ha utilitzat un *primer forward* 5'-CCCGAACAGTTGGATTACACA-3' i un *reverse* 5'-CCAGACTGCCTTGGGAAAAGC-3'.

Els protocols de genotipatge són els següents:

SMAD2	Mida de la banda	Temps	Graus	Nº de cicles	Temps	Graus
		5'	95 °C	1		
				40x	30''	95 °C
					45''	58 °C
					45'	72 °C
		7'	72 °C	1		
		∞	4 °C	1		
Floxejat (SMAD2^{fl/fl})	400bp					
Heterozigot (SMAD2^{fl/+})	400bp i 350bp					
Salvatge (SMAD2^{+/+})	350bp					

PTEN	Mida de la banda	Temps	Graus	Nº de cicles	Temps	Graus
		3'	94 °C	1		
				35x	30''	94 °C
					1'	60 °C
					2'	72 °C
		2'	72 °C	1		
		∞	4 °C	1		
Floxejat (PTEN^{fl/fl})	328bp					
Heterozigot (PTEN^{fl/+})	328bp i 156bp					
Salvatge (PTEN^{+/+})	156bp					

Cre:ER^T	Mida de la banda	Temps	Graus	Nº de cicles	Temps	Graus
		2'	94 °C	1		
				32x	45"	94 °C
					45"	65 °C
					45"	72 °C
		5'	72 °C	1		
		∞	4 °C	1		
Cre^{+/-}	350bp					
Cre^{-/-}	No banda					

SMAD3	Mida de la banda	Temps	Graus	Nº de cicles	Temps	Graus
		3'	95 °C	1		
				33x	45"	94 °C
					45"	60 °C
					45'	72 °C
		10'	72 °C	1		
		∞	4 °C	1		
Knock Out (SMAD3^{-/-})	250bp					
Heterozigot (SMAD3^{+/-})	400bp i 250bp					
Salvatge (SMAD3^{+/+})	400bp					

3. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

3.1 PCR A TEMPS REAL QUANTITATIVA

3.1.1 EXTRACCIÓ DE RNA

Les extraccions de RNA es realitzen emprant el kit comercial *RNAeasy Total RNA kit* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Els extractes de RNA es quantifiquen usant el NanoDrop® (ND-1000 UV/Vis Spectrofotometer, Nanodrop Technologies) i es guarden congelats a -80°C.

3.1.2 SÍNTESI DE CDNA

A partir del RNA extret en el pas anterior, es sintetitza a través d'una reacció de transcripció inversa o retrotranscripció (RT), el cDNA. Primerament, cal sotmetre 500 ng del RNA a 90°C durant 2 minuts, per tal de desfer possibles dímers o bucles que s'hagin generat en la seva estructura. Un cop això s'ha realitzat, es duu a terme la reacció de síntesi de cDNA usant l'enzim retrotranscriptasa del kit Taqman® (Applied Biosystems), i seguint les instruccions del fabricant. Les condicions de la reacció de retrotranscripció són: 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts a 95°C. Un cop sintetitzat, el cDNA es guarda a -20°C fins que es vulgui utilitzar o bé, es pot emprar directament per a la tècnica de la PCR a temps real (RT-PCR).

3.1.3 RT-PCR

La tècnica de PCR a temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom que el termociclador CFX96™ (BioRad) llegeix i quantifica. El programa que s'utilitza comença per 10 minuts a 95°C i després, consta de 40 cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Les sondes emprades s'adquireixen a Applied Biosystems. Com a control endogen d'expressió s'empra el gen de la GAPDH.

Els resultats s'obtenen en forma de nombre de Ct (*cycle threshold*), que és el cicle de PCR en què comença el creixement exponencial del producte de la PCR, i per tant, de la síntesi de la

mostra analitzada. Així, com més gran és el valor de Ct obtingut, menor és el nivell d'expressió del gen estudiat. La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ del gen GusB}$$

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ condició experimental} - \Delta Ct \text{ control}$$

A partir d'aquests càlculs, el nivell relatiu de mRNA de la condició experimental respecte al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Amb aquests valors es calcula la mitjana de cada mostra (es realitzen triplicats) i l'error estàndard.

En tots els experiments realitzats, s'inclou també, per a cada sonda, un control negatiu amb aigua i un control negatiu de la retrotranscripció RT, per descartar la presència de DNA genòmic contaminant.

Les sondes usades en aquest treball són: GAPDH, Mm99999915_g1; PTEN, Mm00477208_m1; Smad2, Mm00487530_m1; Smad3, Mm01170760_m1; BIM, Mm00437796_m1; c-myc, Mm00487804_m1; Smad7, Mm00484742_m; PAI1, Mm00435858_m1; Id1, Mm00775963_g1 i Ciclina D1 Mm00432359_m1.

El producte de cDNA també es va utilitzar com a plantilla per a posteriors amplificacions de PCR per a membres apoptòtics i anti-apoptòtics de la família Bcl-2. Els *primers* es van dissenyar per ser complementaris a les seqüències de ratolí publicades fins al moment i per incloure-hi tantes variants conegudes com fos possible. S'han utilitzat GAPDH i β -actina com a control. Les seqüències de *primers*, les mides dels productes i les condicions de PCR van ser les següents:

GAPDH: *Forward* (Fw): TGGCCTTCCGTGTTCTAC, *Reverse* (Rv): GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA, llargada (L): 178bp i temperatura (T): 63°C; **β -actin:** Fw GGCTGTATTCCCCTCCATCG, Rv; CCAGTTGGTAACAATGCCATGT, (L): 154bp (T): 64°C; **BIM:** Fw GACAGAACCGCAAGGTAATCC, Rv; ACTTGTCACAACTCATGGGTG, (L): 215bp (T): 62°C; **BMF:** Fw CAGAGACTCTTTTACGGCAACG, Rv; ACTGGTCTGCAATACTGAAG, (L): 157bp (T): 62°C; **NOXA:** Fw CTCAGGAAGATCGGAGACAAAGT, Rv; GAGTTGAGCACACTCGTCCTT, (L): 156bp (T): 63°C; **BAK:** Fw CAACCCCGAGATGGACAACCT, Rv; CGTAGCGCCGGTTAATATCAT, (L): 101bp (T): 62°C; **BAK:** Fw CAACCCCGAGATGGACAACCT, Rv; CGTAGCGCCGGTTAATATCAT, (L): 101bp (T): 62°C; **BAX:** Fw TGAAGACAGGGCCTTTTTCG, Rv; AATTCGCCGAGACTCG, (L): 140bp (T): 62°C; **PUMA:** Fw TGTATCTGCAGCCTTTTCG, Rv; ACGGGCGACTCTAAGTGCT, (L): 222bp (T): 61°C; **BIK:** Fw GAGCCTGTGAGAGACGTGG, Rv; CGAGTCTGTGTATAGCAATCCCA, (L): 148bp (T): 63°C and **BAD:** Fw AGGGATGGAGGAGGAGCTTA, Rv; CCCACCAGGACTGGATAATG, (L): 212bp (T): 62°C.

3.2 IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

3.2.1 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Quan s'ha finalitzat el tractament dels cultius cel·lulars, les cèl·lules es netegen amb PBS fred i es fixen amb Paraformaldehid al 4% durant 20 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es fan tres rentats més amb PBS intentant traure' l dels pous amb la màxima cura possible.

Prèviament a la incubació amb l' anticòs primari, la mostra es deixarà a temperatura ambient i durant una hora, amb la solució de bloqueig (PBS al 2% HS, 2% BSA i 0.2% Tritó X-100). Durant aquesta hora es donen dos processos: la BSA i el Sèrum de cavall bloquegen els llocs d' unió inespecífica de l' anticòs i el Tritó permet la permeabilització de les membranes donant accés als anticossos a reconèixer els seus antígens específics.

L' anticòs primari s' incuba durant 16 hores a 4°C, transcorregut aquest temps, es fan tres rentats més amb PBS i s' incuba amb l' anticòs secundari i el Hoeschst 33258 (16 hores a 4°C pels cultius en 3 dimensions i 1 hora a temperatura ambient pels cultius amb 2 dimensions) a les fosques, ja que l' anticòs secundari està marcat amb fluorescència. Passat aquest temps d' incubació, es fan tres rentats més amb PBS i ja es poden guardar les mostres a 4° C i sense entrar en contacte amb la llum fins a la seva observació al microscopi Confocal Olympus FV-1000.

3.2.2 WESTERN BLOT

3.2.2.1 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL EN SDS

Les extraccions proteiques usades en aquesta tesi han estat aconseguides a partir de cultius cel·lulars creixent en placa i/o de teixits procedents de ratolí.

És important realitzar l' extracció proteica de forma ràpida i eficient, per evitar l' alteració i la degradació de la mostra, de manera que reflecteixi l' estat fisiològic amb la major fidelitat possible. Pel que fa als cultius cel·lulars, després de cada tractament, les cèl·lules es renten amb PBS fred i, es recullen en el tampó de lisis. En el cas dels teixits procedents de ratolí, en primer lloc, se sacrifica l' animal per dislocació cervical i, seguidament, se n' extreuen els teixits d'

interès. Aquests teixits es renten amb PBS, es tallen en diversos fragments i, ràpidament, es congelen amb nitrogen líquid. Quan ja estan congelats, es poden guardar a -80°C o bé processar-los directament. Per a extreure'n la proteïna, es talla un petit fragment d'uns 4 mm de cada mostra de teixit congelat, i es submergeixen en $50\mu\text{l}$ d'urea 5M amb perles de vidre (Sigma-Aldrich). Posteriorment, es disgrega la mostra emprant el disruptor FastPrep FP120 (Thermo Savant) durant 45 segons màxima intensitat i, tot seguit, es bull la mostra durant 5 minuts a 95°C . Un cop tenim la mostra bullida, s'hi afegeixen $75\mu\text{l}$ de tampó d'extracció proteica, es torna a bullir. Un cop bullida amb el buffer de lisis, es centrifuga 5 minuts a 7.000 rpm i el sobrenedant serà el nostre extracte proteic d'interès.

El tampó d'extracció proteica (buffer de lisis) és una solució de lisi desnaturalitzant que conté 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) i 2% de SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Sigma-Aldrich). Aquest tampó és capaç de trencar les interaccions entre les proteïnes i permetre l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més a més, el detergent SDS desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims presents a la mostra, incloses fosfatases i proteases, que podrien danyar l'extracte.

Finalment, se soniquen les mostres durant uns 45 segons al 15% de potència abans de quantificar-les.

3.2.2.2 QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE LOWRY

Degut a que el número de cèl·lules, la quantitat de teixit de cada condició i l'eficiència de l'extracció proteica pot variar entre una mostra i una altra, és imperatiu quantificar la quantitat de proteïna que conté cada mostra per tal de facilitar la posterior interpretació dels resultats. Ja que, si la quantitat de proteïna present en el gel és diferent entre condicions serà impossible extreure conclusions fiables dels resultats, ja que no es podrà discernir si les diferències observades es deuen al tractament estudiat o a l'efecte de la càrrega. És per aquest motiu, que s'utilitza el mètode de Lowry per a determinar la quantitat de proteïna total present a cada una de les mostres, emprant els reactius comercialitzats per Bio-Rad, i comparant-les amb una recta patró de concentració proteica de BSA (albúmina sèrica bovina) coneguda. Per aquest fi, en una placa M96, s'afegeixen $5\mu\text{l}$ de cadascuna de les diferents concentracions de proteïna que constitueixen la nostra recta patró i $3\mu\text{l}$ de cada mostra proteica experimental. Un cop les mostres són al seu pou, es barregen els reactius A i S en proporció 50:1, i s'afegeixen $25\mu\text{l}$ d'aquesta barreja a cadascun dels pous, on prèviament s'hi havia afegit mostra o recta patró. A continuació, s'afegeixen $200\mu\text{l}$ del substrat fluorogènic (reactiu B), i s'incuba durant 10 minuts

a temperatura ambient i protegit de la llum. Transcorregut aquest temps, es llegeix l'absorbància de la placa a 595 nm. Els valors d'absorbància obtinguts per a les mostres s'extrapolen als de la recta patró, determinant així, la concentració proteica de cadascuna de les mostres.

3.2.2.3 ELECTROFORESI EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Quan es disposa dels extractes proteics i les mostres s'han quantificat, les mostres es preparen agafant la mateixa quantitat de proteïna per a les diferents condicions que es volen comparar i s'hi afegeix també de càrrega 5x (10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM β -mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8 i blau de bromofenol). A més, s'igualen els volums de cada mostra usant el mateix tampó de lisi i es bullen 5 minuts a 95°C per acabar de desnaturalitzar les proteïnes. Així doncs, ja es disposa de les mostres per dur a terme la separació proteica per electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS. Aquests gels són desnaturalitzants i permeten la separació de barreges proteiques complexes en funció del seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (BioRad), que conté 39% d'acrilamida i un 1% de bis-acrilamida. La polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) com a iniciador i persulfat d'amoni (Sigma-Aldrich) al 0,05 % com a catalitzador.

En aquesta tesis s'han emprat gels discontinus, formats per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior o gel apilador es carreguen les mostres, i serveix per concentrar el front de proteïnes de tal manera que totes entrin a la vegada al gel separador. El gel apilador es troba constituït per un percentatge baix d'acrilamida (5%) preparada en tampó 125 μ M Tris-HCl a pH 6,8. La part inferior del gel, el gel separador és on realment se separen les proteïnes segons el seu pes molecular. Es prepara usant tampó 375 μ M Tris-HCl a pH 8,8, i el seu percentatge d'acrilamida dependrà del pes molecular de les proteïnes que es vulguin detectar, oscil·lant entre el 7 i el 15%.

Un cop els gels estan polimeritzats, s'hi carreguen les mostres (preparades segons la descripció anterior) i es deixen migrar a un voltatge constant de 120 V en un tampó de migració (25 mM Tris 25; 1,44% de glicina i 0,1% de SDS) en el sistema MiniProtean® de BioRad. És important carregar també, en un dels carrils, un marcador de pes molecular (Page Ruler, ThermoFisher Scientific), per tal disposar d'una referència sobre el pes molecular de les proteïnes detectades.

3.2.2.4 TRANSFERÈNCIA DE PROTEÏNES

Un cop es disposa de les proteïnes separades en el gel, es transfereixen a una membrana de PDVF (Immobilon-P, Millipore). El mètode emprat per la transferència és, novament, el sistema MiniProtean® de BioRad, on es forma un sandvitx amb el gel, la membrana, dos papers Watman i dues espongetes. Aquest sandvitx es col·loca en una solució de transferència (25 mM Tris 25 i 192 mM glicina a pH=8,3) juntament amb un bloc de gel per tal d'evitar els sobreescalfaments, i es deixen transferir les proteïnes des del gel cap a la membrana durant 1 hora a un voltatge constant de 70V.

En finalitzar transferència i per evitar possibles unions inespecífiques en la membrana, aquesta es bloqueja amb llet en pols descremada al 5% en tampó TBS-T (20 mM Tris a pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,1% de Tween 20) durant una hora a temperatura ambient.

3.2.2.5 IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

Un cop bloquejada la membrana, es fan 2 rentats de 5 minuts amb TBS-T i s'incuba la membrana 16 hores a 4°C amb l'anticòs primari d'interès. La dilució que conté l'anticòs primari es prepara en una solució de TBS-T amb 3% de BSA i 0,02% d'azida sòdica, que evita contaminacions i permet la reutilització de l'anticòs.

Passades les 16 hores d'incubació, es recupera l'anticòs primari i es guarda a 4°C fins al seu proper ús. Abans d'incubar amb l'anticòs secundari, es fan tres rentats de 15 minuts amb TBS-T a la membra, i s'incuba amb la dilució adequada d'anticòs secundari en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Per acabar, la membrana es renta tres vegades més amb TBS-T.

Quan es té la membrana incubada i netejada amb TBS-T, es pot procedir a la visualització per immunodetecció de la proteïna d'interès. Per això, l'anticòs secundari es troba conjugat a peroxidasa, que permet la detecció de la senyal. En aquest sentit, la membrana s'incuba durant 3 minuts amb el reactiu comercial Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Aquest reactiu associa la catàlisi de l'aigua oxigenada a la oxidació de luminol, tot produint un increment de la quimioluminiscència. Finalment, la membrana es exposada al sistema de documentació *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad) i s'analitza amb el programa informàtic associat, *Image Lab*.

3.3 CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES

En el camp de l'enginyeria genètica, un vector és una molècula de DNA usada per a introduir una seqüència específica de DNA dins una cèl·lula on es mantindrà i es replicarà. Per aquest fi, normalment s'usen plàsmids o genomes virals. Els plàsmids són petites molècules de DNA circular extracromosòmic contingudes en molts bacteris. Se solen replicar de forma independent del cromosoma principal bacterià i hi poden haver múltiples còpies d'aquest plàsmid en una mateixa cèl·lula. Per contra, els virus són entitats infeccioses les quals contenen àcids nucleics que codifiquen per la seva pròpia estructura, però no tenen la maquinària enzimàtica pròpia d'una cèl·lula. És per aquest motiu, que els virus necessiten replicar-se envaint cèl·lules eucariotes.

3.3.1 SUBCLONATGE D' SHRNAI EN VECTOR FSVSI

Primerament, es digereix el vector amb enzims que permetin crear extrems compatibles amb els del nostre insert d'interès. En el cas específic del nostre FSVsi, s'utilitzaran els enzims de restricció Age I i BamHI. Quan ja s'hagi digerit el vector, aquest s'ha de netejar de possibles sals, fragments de DNA i dels enzims de restricció presents en la solució. Per a dur a terme aquesta neteja, s'usa el kit comercial de purificació de DNA a partir de gels d'agarosa de Qiagen.

Quan ja es disposa de l'insert i del vector obert, es du a terme la reacció de lligació, per la qual s'utilitza l'enzim T4 Lligasa de Roche i una proporció molar 1:3 de plàsmid respecte a l'insert. Aquesta barreja es transforma en la soca bacteriana competent *E. Coli Stb13* mitjançant xoc tèrmic. Un cop realitzada aquesta transformació, s'ha d'analitzar quines colònies de bacteris han estat capaces d'internalitzar el vector amb l'insert i descartar aquelles que no. Això es durà a terme mitjançant una anàlisi per PCR de diferents colònies utilitzant uns primers que s'uneixen al plàsmid, concretament a la regió que flanqueja l'insert. Amb aquesta anàlisi s'obtindrà, per tant, dos fragments diferents de DNA, un de 250 bp on el plàsmid contindrà l'insert i un de 200 pb on el plàsmid haurà relligat.

En el cas del nostre sistema, el vector FSVsi, provoca una disminució de l'expressió del gen diana de forma eficient. El FSVsi és un vector que s'expressa en mamífers per a dirigir la síntesis de transcrits de siRNA sota el promotor U6. A més, un avantatge d'aquest vector és que conté una variant de Venus YFP sota el control del promotor V40. L'èxit d'aquesta estratègia de

subclonatge rau en trobar una seqüència adient d' uns 21 nucleòtids que pertanyin al gen diana amb la qual es dissenyen els dos primers, *Forward* i *Reverse*. L' anellament d' aquests primers es realitza en una solució 50mM d' Hepes a un pH de 7,4 en 100 mM de NaCl, utilitzant una concentració de 3 µg/µl de cada primer. Aquest protocol d' anellament dels primers va disminuint la temperatura de 94 °C a 25 °C de forma progressiva.

Els primers diana dels shRNA usats en aquest treball i que han estat clonats en l' FSV són:
Smad2.1: 5'- GGTGTTCAATCGCATACTAT-3'; Smad2.2: 5'- CGGTTAGATGAGCTTGAGAAA-3';
Smad3.1: 5'-CTGTCCAATGTCAACCGGAAT-3'; Smad3.2: 5'-CATCCGTATGAGCTTCGTCAA-3'.

3.4 IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA

En aquest treball es va realitzar una immunoprecipitació de cromatina de cultius endometrials epitelials en tres dimensions. Conseqüentment, un cop finalitzats els tractaments corresponents a l' experiment que es volia analitzar, es *crosslinkuen* les cèl·lules durant 15 minuts a temperatura ambient, afegint 1/10 volums d' una solució a l' 11% de formaldehid. Quan ha transcorregut aquest temps, es bloqueja el paraformaldehid afegint glicina durant 15 minuts. Posteriorment, es fan dos rentats amb PBS fred i s' hi afegeix solució de lisis. Els lisats es divideixen en volums de 100µl per tub i es soniquen seguint 4 cicles de sonicació de 30 segons i 20 segons de pausa al 20% d' amplitud. Es repeteix aquest protocol de sonicació 3 vegades (sempre en gel). Un cop completada la sonicació es recull el sobrenedant i es pot congelar a -80°C (guardant 10µl de lisat total que s' usará posteriorment com a extracte total de cada mostra). Amb paral·lel a aquest procés, es conjuga l' anticòs d' interès a les *beads* que usarem per la immunoprecipitació. Quan l' anticòs ja ha estat conjugat, es neteja amb solució de bloqueig i es recullen les *beads*. Un volum aproximat de 100µl s' afegeixen a la solució que conté les *beads* i s' incuba durant 12 hores a 4°C en un rotor giratori. Transcorregut aquest temps, les *beads* es recullen, s' incuben i es renten amb solucions de baix i d' alt contingut en sals, seguidament d' un rentat amb una solució LiCl de rentat i finalment amb solució TE (Tris i EDTA). Un cop rentades, les *beads* es centrifuguen i es resuspenen amb solució d' elució. Aquesta solució s' incuba durant 15 minuts a 65°C. Seguidament, s' afegeix solució d' elució a l' extracte total de cada mostra. Aquest extracte i el pellet, s' incuben a 65°C durant 16 hores. Els lisats es centrifuguen i els sobrenedants es transfereixen a tubs nous. Els sobrenedants digereixen i s' incuben a 37°C durant 12 hores amb solució TE suplementat amb RNaseA, subseqüentment es digereixen amb proteïnasa K i s' incuben dues hores a 55°C. Seguidament

es procedeix a l'extracció de DNA, afegint-hi fenol/cloroform/isoamil alcohol en un tub o s'hi adicionaran les nostres mostres, centrifugant-les posteriorment a màxima velocitat durant 10 minuts a temperatura ambient. Quan hagin transcorregut aquests 10 minuts, la fase aquosa es canvia a un tub nou on precipitem el DNA afegint-hi NaCl, glicogen i EtOH 100%. S'incuben les mostres a -20°C durant 4 hores i després es tornen a centrifugar a màxima velocitat. El pellet obtingut es neteja en una solució aquosa al 80% EtOH, es tornen a centrifugar les mostres a màxima velocitat i el pellet es resuspèn amb solució TE i s'incuba a 65°C durant 15 minuts. El DNA immunoprecipitat es va analitzar per qPCR.

Els *primers* usats per la PCR van ser: Promotor de Pten -1/-500 (F TCGGAAAGCCGGAGGGGAG, R GTGTCTCCCGCGTGGGTCA); Promotor de Pten -501/-986 (F TGACCCACGCGGGAGACAC, R GGCCTGGGAGGGCTCAAAG); Promotor de Pten -987/-1459 (F CTTTGAGCCCTCCCAGGCC, R CAACCGTGGGAGAAGAGGC).

4. HISTOLOGIA I IMMUNOHISTOQUÍMICA

4.1 HISTOLOGIA BÀSICA

Un cop sacrificats els animals, se n'extreuen els òrgans d'interès els quals es fixen amb formol durant 16 hores a 4°C. Transcorregut aquest temps, els òrgans es col·loquen en cassets, es deshidraten i s'inclouen en parafina. Amb la finalitat d'estudiar la histologia de cada teixit, es fan talls de cada bloc de parafina de 5µm i es tenyeixen amb hematoxilina i eosina (H-E). Dos patòlegs revisen i avaluen de manera independent i a cegues la histologia de cadascun dels teixits seguint criteris preestablerts.

4.2 IMMUNOHISTOQUÍMICA

Després d' incloure els teixits en parafina, es pot recórrer a l' anàlisi immunohistoquímic de les mostres, si esdevé útil estudiar determinats marcadors específics. Així, es realitzen talls de 3µm dels blocs de parafina i s' assequen durant 1 hora a 65°C. Posteriorment, es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació dels teixits. El següent pas consisteix en el desemmascarament antigènic, el qual permet recuperar i exposar antígens emmascarats durant la preparació de la mostra. Amb aquesta finalitat, s' incuben els portaobjectes amb un tampó comercial que conté Tris/EDTA 50X a pH 9, en un mòdul de pretractament PT-LINK (Dako) durant 20 minuts a 95°C. A continuació, es bloqueja la peroxidasa endògena de les mostres incubant-les amb una solució d' H₂O₂ al 3% per reduir el soroll de fons que s' obté amb el cromogen usat. Tot seguit, es realitzen tres rentats amb PBS i s' incuba la mostra amb l' anticòs primari durant 16 hores a 4°C. Posteriorment, es fan tres rentats més amb PBS i s' incuba la mostra amb l' anticòs secundari 1 hora a temperatura ambient. Si la senyal és suficientment forta, s' utilitza un anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa (HRP) i s' incuba durant 30 minuts. Per contra, si és necessari amplificar la senyal, s' emprava un anticòs secundari conjugat a biotina durant 30 minuts i, finalment, s' incuba la mostra 15 minuts més amb estreptavidina unida a la peroxidasa (HRP), a temperatura ambient. Per acabar, s' aplica el cromogen diaminobenzimida (DAB, Dako) per rebel·lar la reacció.

5. TAULA D' ANTICOSSOS

ANTICÒS	COMPANYIA	DILUCIÓ PER A WB	DILUCIÓ PER A IMMUNOFLUORESCÈNCIA	DILUCIÓ PER A IMMUNOHISTOQUÍMICA
CLEAVED-CASPASE 3	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.9661.	1:500	1:250	-
CASPASE 9	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.9501.	1:2000	-	-
PTEN	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.9188.	1:1000	-	-

P-AKT (SER473)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.4060.	1:2000	-	-
SMAD2/3	BD Biosciences (San Jose, CA). Ref.610842.	1:500	1:250	1:100
P-SMAD2 (SER465/467)/ SMAD3 (SER423/425)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.8828.	1:100	-	-
SMAD4	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 7966.	1:100	1:100	1:100
TGF-B1 (V)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 146.	-	-	1:200
TBRI (V-22)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 398.	-	1:100	1:200
TBRII (L-21)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 400.	-	1:100	1:200
TBRII (C16)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 220.	-	1:250	1:200
CYCLIN D1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 20044.	1:1000	-	-
A-TUBULIN	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ref.T5168.	1:10000	1:500	-
LDH (LACTATE DEHYDROGE NASE)	Rockland Immunochemic als INC. (Limerick, PA). Ref.100-1173.	1:1000	-	-

HISTONE H1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 8030.	1:2000	-	-
PTEN	Dako-Agilent Technologies (Denmark). Ref.M3627.	-	-	1:100
P-AKT (SER473)	Dako-Agilent Technologies (Denmark). Ref.M362801- 8.	-	-	1:20
PAN-AKT	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ref.sc- 1618.	1:4000	-	-
E- CADHERINA	BD Biosciences (San Jose, CA).BD. Ref.610181.	1:1000	1:100	-
LAMININA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ref.L9393.	-	1:100	-
GM-130	BD Biosciences (San Jose, CA).BD. Ref.610822.	-	1:250	-
ZO-1	Zymed laboratories (San Francisco, CA). Ref.61-7300.	-	1:100	-
PHALLOIDIN	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ref.P5282.	-	1:1000	-
CITOKERATIN E	Abcam (Cambridge, UK). Ref.9377.	-	1:100	-
VIMENTINE	BD Biosciences (San Jose, CA).BD. Ref.550513.	1:1000	1:250	-

Materials i mètodes

PP70S6K	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.9205.	1:1000	-	-
P70S6K	Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Ref.9202.	1:1000	-	-
PERK	Biologend (San Diego, CA). Ref.675502	1:1000	-	-
BRDU	Dako-Agilent Technologies (Denmark). Ref. M0744.	-	1:100	-

RESULTATS

1. ESTUDI DELS EFECTES DEL TGF-B EN CULTIUS TRIDIMENSIONALS D' ENDOMETRI

EL TGF-B INDUEIX MORT APOPTÒTICA EN LES CÈL·LULES EPITELIALS ENDOMETRIALS POLARITZADES

La senyalització del TGF- β en cèl·lules epitelials provoca diferents respostes com ara la detenció de la proliferació, la diferenciació o l'apoptosi cel·lular. No obstant això, els efectes del TGF- β en les cèl·lules epitelials de l'endometri uterí en condicions fisiològiques i patològiques estan pobrament definides. Per a demostrar una putativa funció del TGF- β en la regulació de la fisiologia endometrial, es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica del TGF- β 1 i dels receptors T β RI i T β RII en seccions de teixit d'endometri normal. L'anàlisi immunohistoquímica amb un anticòs contra T β RI i dos anticòssos contra T β RII va demostrar que els receptors del TGF- β s'expressen tant en cèl·lules epitelials com en cèl·lules estromals de l'endometri. Per contra, l'expressió del TGF- β 1 només es va detectar en el compartiment estromal (Figura 27 A). A continuació, es va analitzar la resposta de les cèl·lules endometrials normals al tractament per TGF- β . Amb aquesta finalitat, es van establir cultius tridimensionals (3D) de cèl·lules epitelials d'endometri murí de tipus salvatge. En condicions de cultiu en 3D, les cèl·lules epitelials de l'endometri desenvolupen estructures glandulars polaritzades que s'assemblen a glàndules endometrials uterines *in vivo* (Figura 27 B).

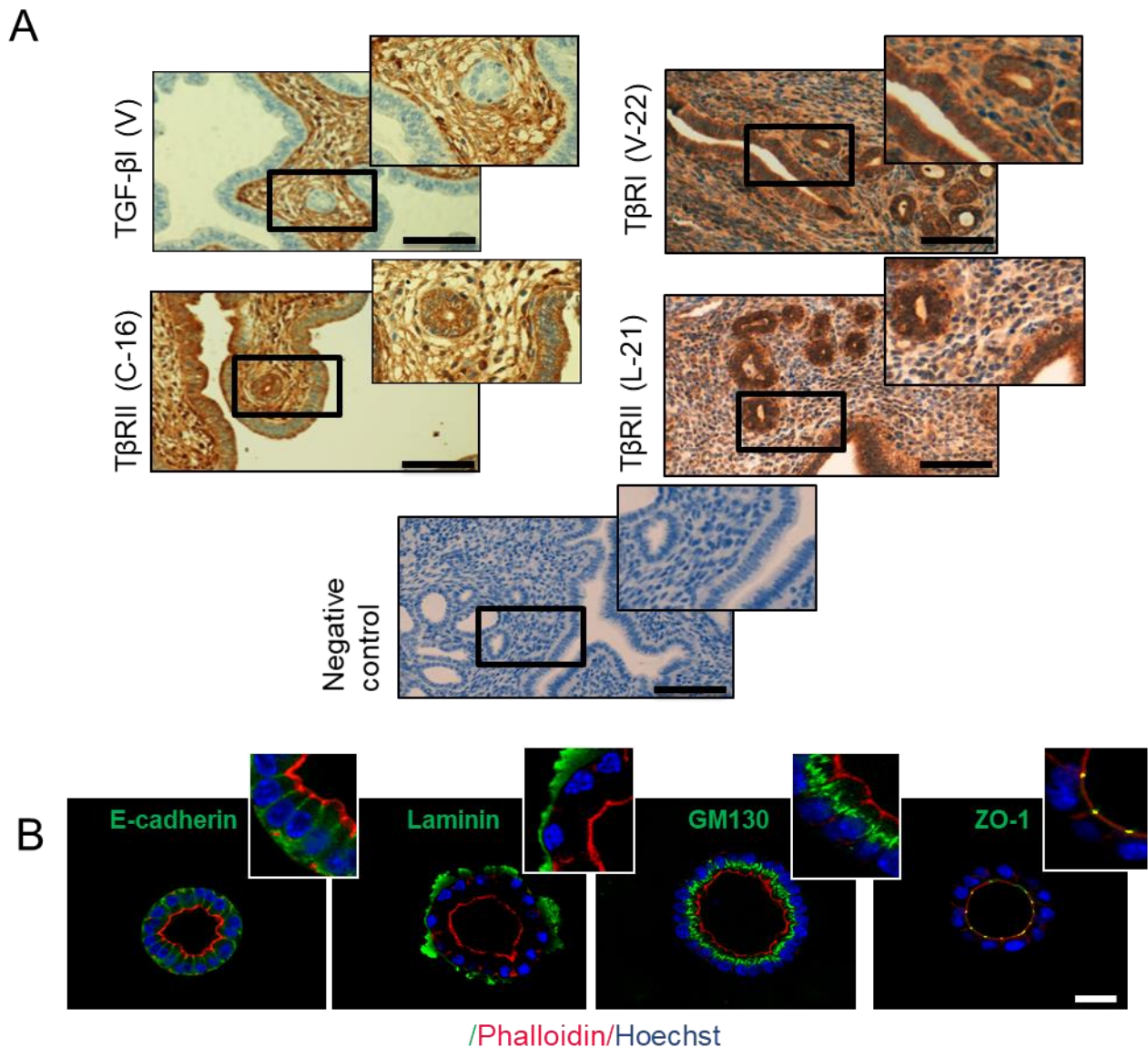


Figura 27. Marcadors de polaritat cel·lular i expressió del patró TGF- β /T β RI/T β RII en cèl·lules epitelials d'endometri. (A) Immunohistoquímica per a T β RI (anticòs V-22), T β RII (dos anticossos diferents, C-16 i L-21) i TGF- β 1 (anticòs V) en seccions de teixit endometrial inclòs en parafina amb formalina de ratolins control (ampliació= 20x; n =6 ratolins). Barra d'escala: 100 μ M. (B) Immunofluorescència dels marcadors de polaritat cel·lular E-cadherina, Laminina, GM130 i ZO-1 (verd) i faloidina (vermella) en cultius 3D de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí. Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Barres d'escala: 25 μ m.

Resultats

Aquests cultius proporcionen un bon sistema per a estudiar les respostes autònomes de les cèl·lules al TGF- β (Núria Eritja, Dolcet, and Matias-Guiu 2013). En primer lloc, vam assegurar que l'expressió dels T β RI i T β RII es conservava en cultius 3D de cèl·lules epitelials de l'endometri. A continuació, es van exposar els cultius 3D de cèl·lules epitelials endometrials de ratolí a l'estímul per TGF- β durant 12, 24 o 36 hores. El tractament amb TGF- β va provocar un augment dels nuclis que mostraven condensació de la cromatina i fragmentació nuclear compatible amb la mort cel·lular apoptòtica d'una forma dosi i temps depenent. L'apoptosi induïda per TGF- β es va confirmar també mitjançant l'anàlisi d'immunofluorescència de la Caspasa-3 escindida (Figura 28 A i B) i per l'anàlisi de transferència de *Western blot* de Caspasa-3 i Caspasa-9 tallades (Figura 28 C). La mort progressiva de les estructures glandulars en 3D també es va observar i es va controlar mitjançant microscòpia de *time lapse*.

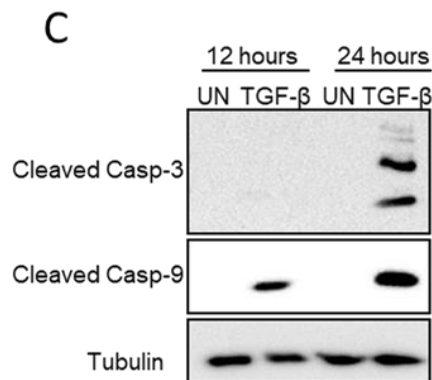
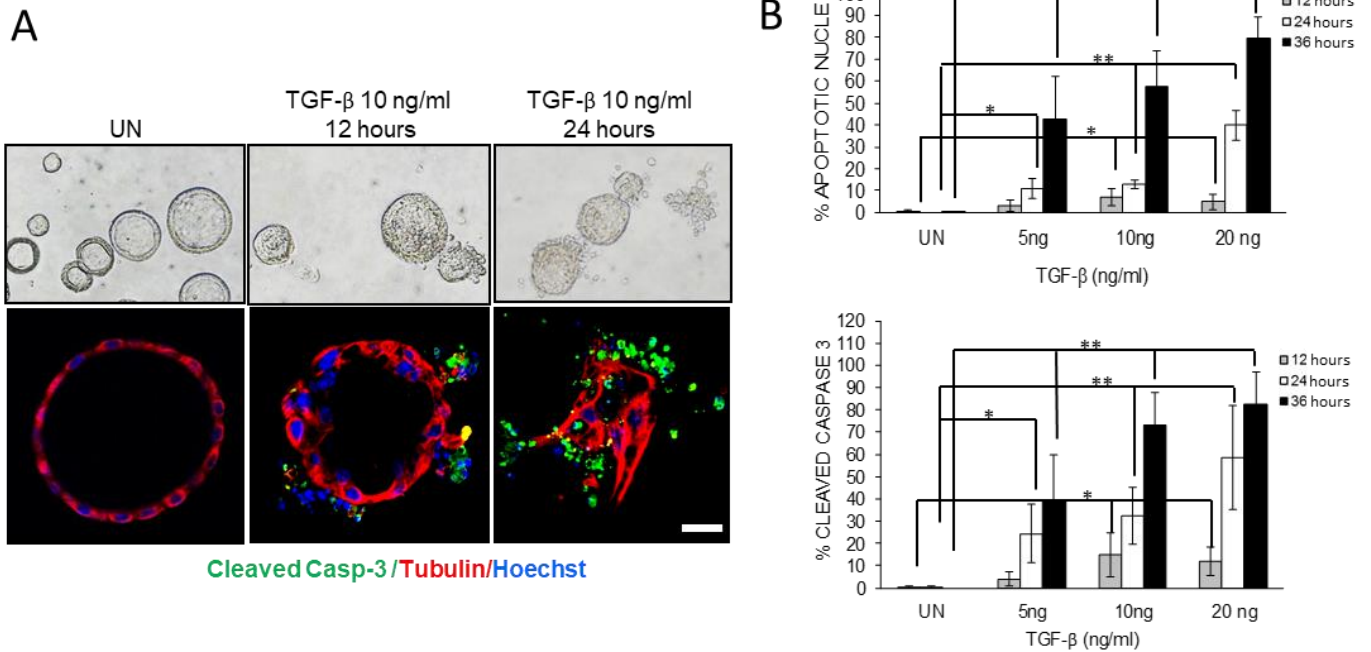


Figura 28. El TGF- β provoca apoptosi en cèl·lules d'epiteli endometrial polaritzades. (A) Imatges representatives de contrast de fases (panell superior) i de doble immunofluorescència per caspasa-3 escindida i tubulina (panell inferior) corresponent a cultius 3D d'endometri cultivats durant 8-10 dies i després tractats amb 10 ng/ml de TGF- β pels temps indicats. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per a mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Les dades són de $n=3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25 μ m. **(B)** Quantificació dels nuclis que mostren morfologia apoptòtica (gràfic superior) quantificació de les cèl·lules que mostren tinció per a la caspasa-3 activa (gràfic inferior) en cultius 3D tractats amb les dosis indicades de TGF- β i per als temps indicats. Els valors són les mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ per a un ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Les dades corresponen a tres experiments independents cadascun amb $n=200-300$ cèl·lules comptades per condició). **(C)** Anàlisi per Western blot de caspasa-3 escindida i caspasa-9 trencada a partir de lisats de cultius 3D tractats amb 10 ng/ml de TGF- β pels temps indicats. Es mostra una imatge representativa de $n=3$ rèpliques biològiques. La membrana es va tornar a immunoblotar per tubulina mostrant una càrrega igual de proteïnes entre les diferents condicions.

Aquests resultats demostren que el TGF- β provoca la mort cel·lular apoptòtica de cèl·lules epitelials endometrials polaritzades. Per investigar encara més el mecanisme molecular de la funció pro-apoptòtica del TGF- β sobre les cèl·lules endometrials polaritzades, es realitzà una anàlisi de l'expressió per RT-qPCR dels gens reguladors de l'apoptosi en cultius 3D exposats a TGF- β durant 16 hores. Entre tots els membres pro-apoptòtics i anti-apoptòtics dels gens de la família Bcl-2 analitzats (Figura 29), vam trobar que augmentava l'expressió de les proteïnes pro-apoptòtiques BH3, BIM, BMF i NOXA (Figura 30).

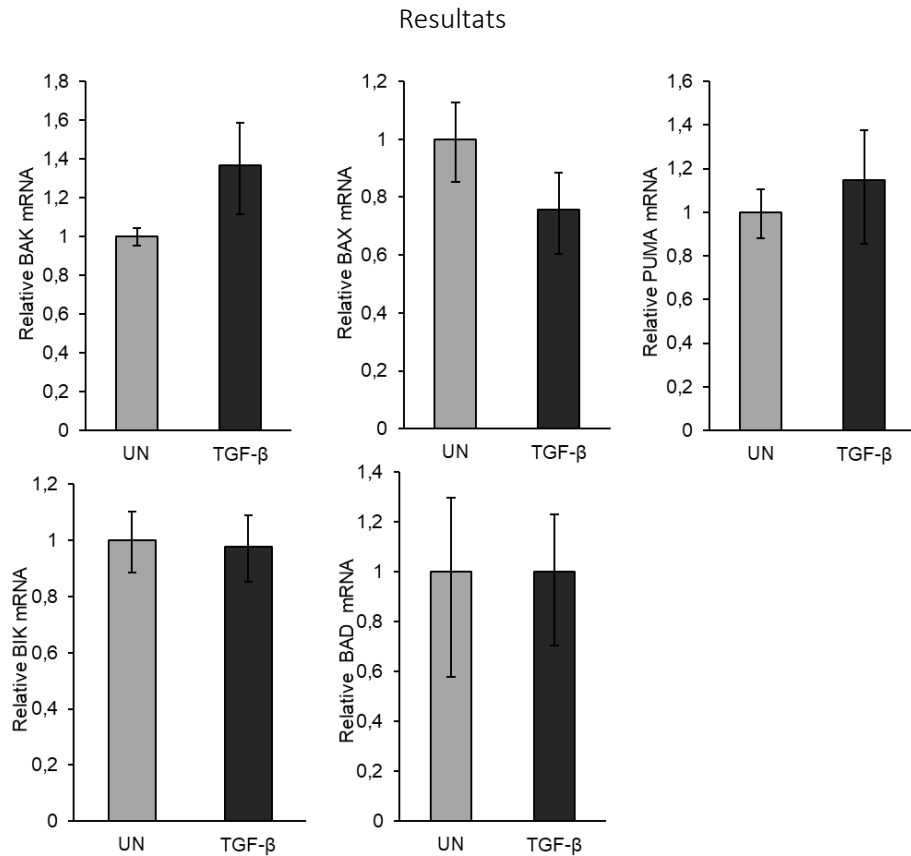


Figura 29. Anàlisi de l'expressió d' mRNA dels gens apoptòtics. Anàlisi d' RT-qPCR que mostra l'expressió de l' mRNA de BAK, BAX, PUMA, BIK i BAD en cultius 3D tractats durant 16 hores amb 10 ng/ml de TGF- β . Les dades són de n =3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són les mitjanes \pm s.e.m.. No s'observen diferències significatives per a l'anàlisi del test t.

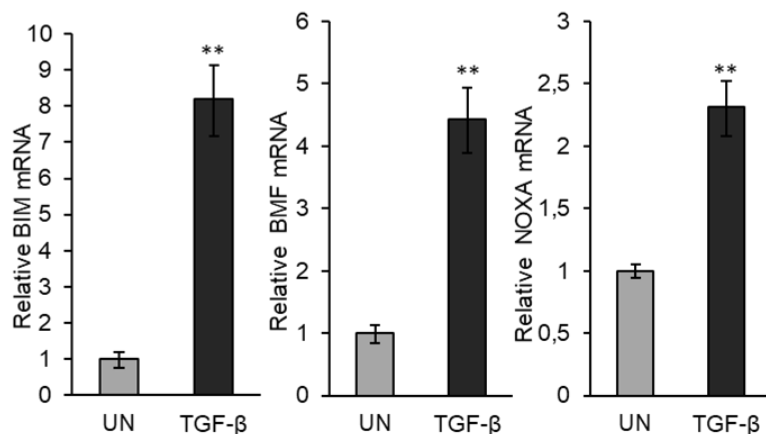


Figura 30. Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió d' mRNA de BIM, BMF i NOXA en cultius 3D tractats durant 16 hores amb 10 ng/ml de TGF- β . Els resultats es plasmen com a expressió d' mRNA respecte a la condició de cultiu 3D no tractada (UN). Les dades són de n =3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són les mitjanes \pm s.e.m. **P <0,01, per a l'anàlisi t-test.

L'addició de l'ABT-263 mimètic de *BH3-only* als cultius 3D va provocar un augment de les cèl·lules apoptòtiques en la mateixa mesura que el tractament per TGF- β , el que suggereix que la regulació dels *BH3-only* BIM, BMF o NOXA participa en la regulació de l'apoptosi induïda pel TGF- β (Figura 31).

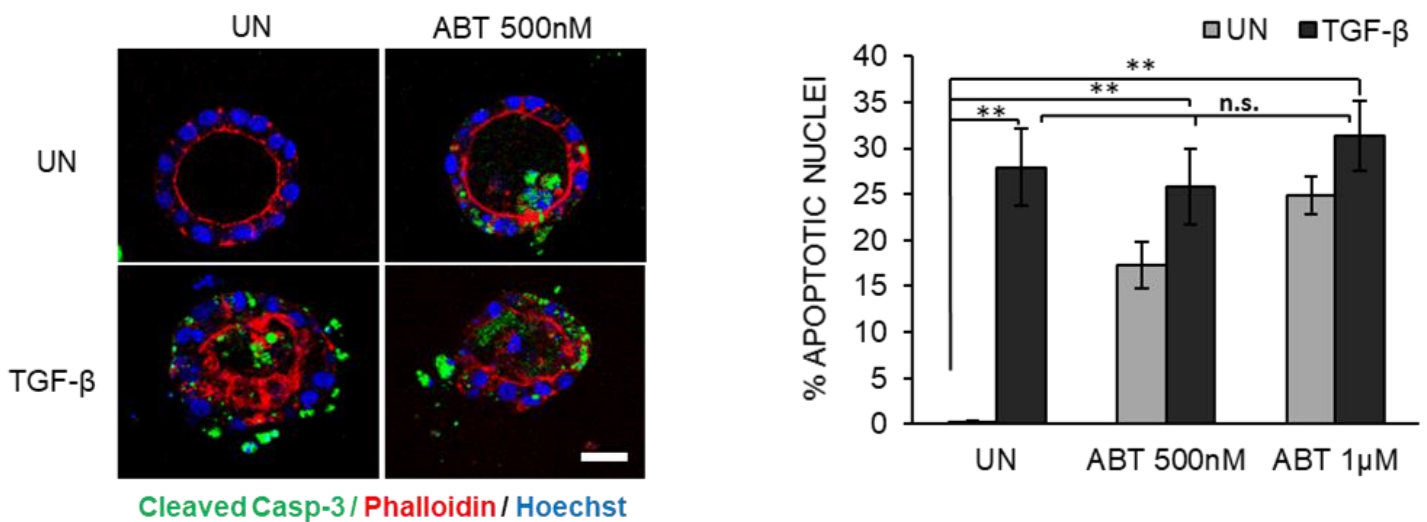


Figura 31. L'ABT-263 provoca apoptosis en cèl·lules d'epiteli endometrial polaritzades. Imatges representatives de la tinció de caspasa-3 activa, Hoechst i faloidina (esquerra) i la quantificació (dreta) de cèl·lules que presenten caspasa-3 tallada en cultius 3D tractats amb les dosis indicades de mimètic de *BH3-only*, ABT-263 en combinació o no (UN) amb TGF- β durant 24 hores. Barres d'escala: 25 μ m. Els valors dels gràfics són la mitjana i les barres d'error representen una mitjana de \pm s.e.m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s. (no significatiu) es van calcular mitjançant una anàlisi ANOVA unidireccional seguit de la prova de Bonferroni. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb $n = 200-300$ cèl·lules comptades per condició).

LA DEFICIÈNCIA D' SMAD3 IMPEDEIX L' APOPTOSIS INDUÏDA PEL TGF- β I AUGMENTA LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

L' activació dels factors de transcripció R-Smad és la principal via de transducció de la senyal activada per TGF- β . No obstant això, el paper de les R-Smads en la senyalització pro-apoptòtica provocada per TGF- β no és completament coneguda i s' han proposat diversos mecanismes Smad-dependents i Smad-independents que podrien explicar aquesta mort apoptòtica tot i que de moment no existeix un concens acceptat (Heldin, Landström, and Moustakas 2009; Pardali and Moustakas 2007a). Per aquest motiu ens vam proposar estudiar quins components de la via del TGF- β actuaven en la mort per apoptosi induïda en les cèl·lules endometrials. Primer de tot, es van estimular amb TGF- β cultius tridimensionals els quals van sofrir una ràpida translocació nuclear d' Smad2/3 (Figura 32 A). Per a determinar el paper d' aquesta translocació en l' apoptosi provocada per TGF- β , es van infectar cèl·lules endometrials de tipus salvatge amb lentivirus que contenien shRNA dirigits contra Smad2 (FSV-Smad2.1 i FSV-Smad2.2) (Figura 33 A) o contra Smad3 (FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2) (Figura 32 B). Deu dies després de la infecció, els cultius 3D es van exposar al TGF- β . Curiosament, els shRNA d' Smad3 (Figura 32 B) van provocar una disminució significativa de les cèl·lules que presentaven immunotinció positiva per a la caspasa-3 activa després del tractament amb TGF- β . La quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques per glàndula va revelar que la inhibició d' Smad3 induïda per l' shRNA va donar lloc a un bloqueig gairebé complet de l' apoptosi provocada pel TGF- β (Figura 32 C). Per altra banda, la inhibició d' Smad2 usant shRNA o cultius Smad2 *knock-out* no va tenir efectes sobre el nombre de cèl·lules apoptòtiques després del tractament amb TGF- β (Figura 33 B), fet que suggeria una no implicació de la proteïna Smad2 en la mort provocada pel TGF- β . Per descartar suposats efectes inespecífics de l' shRNA, vam establir cultius endometrials 3D de ratolins *knock-out* per Smad3 (Smad3 $-/-$). Aquests cultius van resultar ser resistents a l' apoptosi induïda pel tractament amb TGF- β , tal i com succeïa amb els shRNA d' Smad3, ja que es bloqueja l' augment de cèl·lules que presenten immunofluorescència positiva per a la caspasa-3 activa després de l' estimulació amb TGF- β (Figura 32 D). La quantificació de les cèl·lules apoptòtiques va demostrar que els cultius Smad3 $-/-$ eren completament resistents a l' apoptosi induïda per TGF- β (Figura 32 E). Aquests resultats suggereixen que tant l' ablació genètica, com el descens per l' ús de l' shRNA d' Smad3 impedeixen la regulació de l' expressió de l' mRNA de BIM induïda pel TGF- β . (Figura 32 F) la qual estava augmentada en les cèl·lules apoptòtiques tal i com s' ha descrit en l' apartat previ.

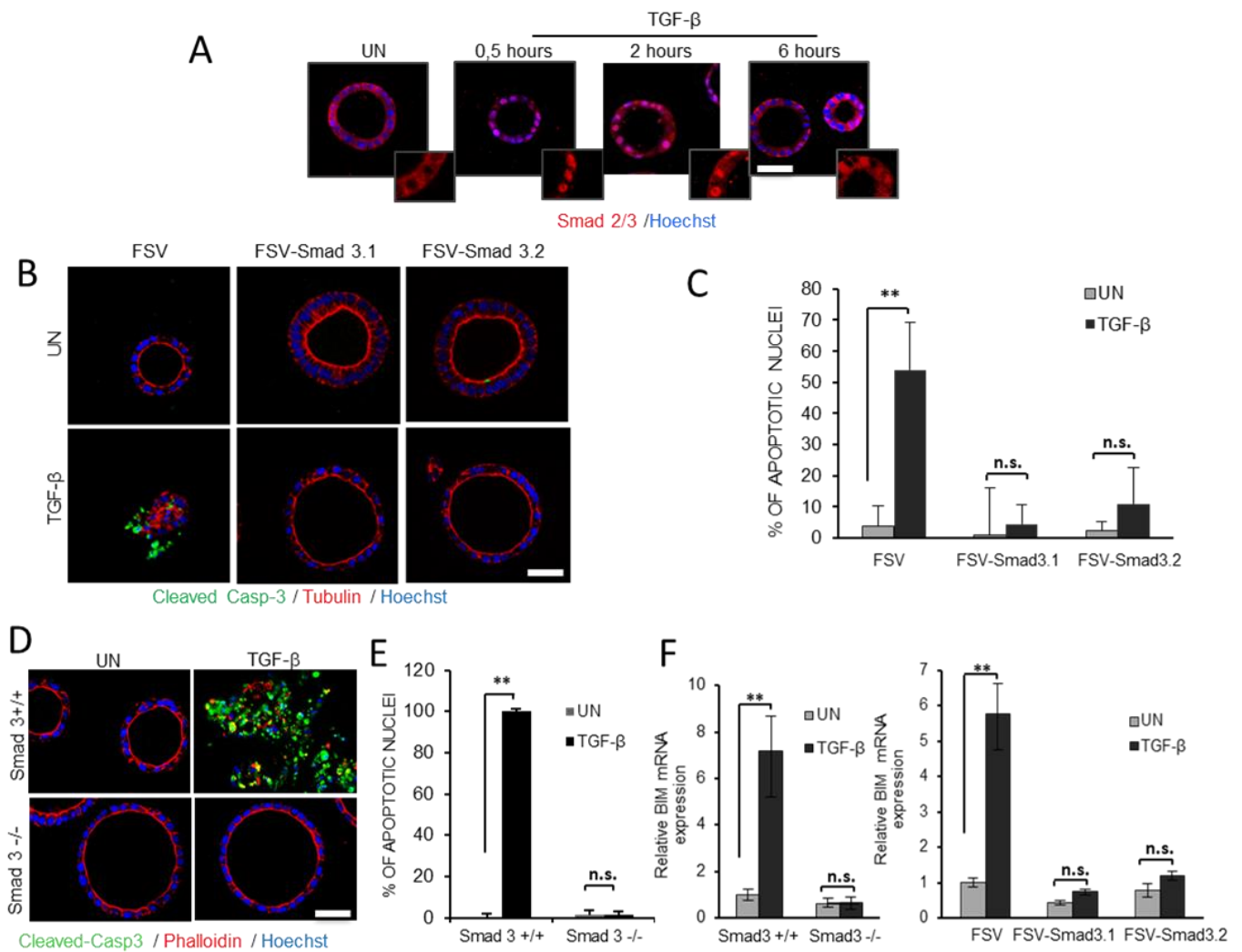
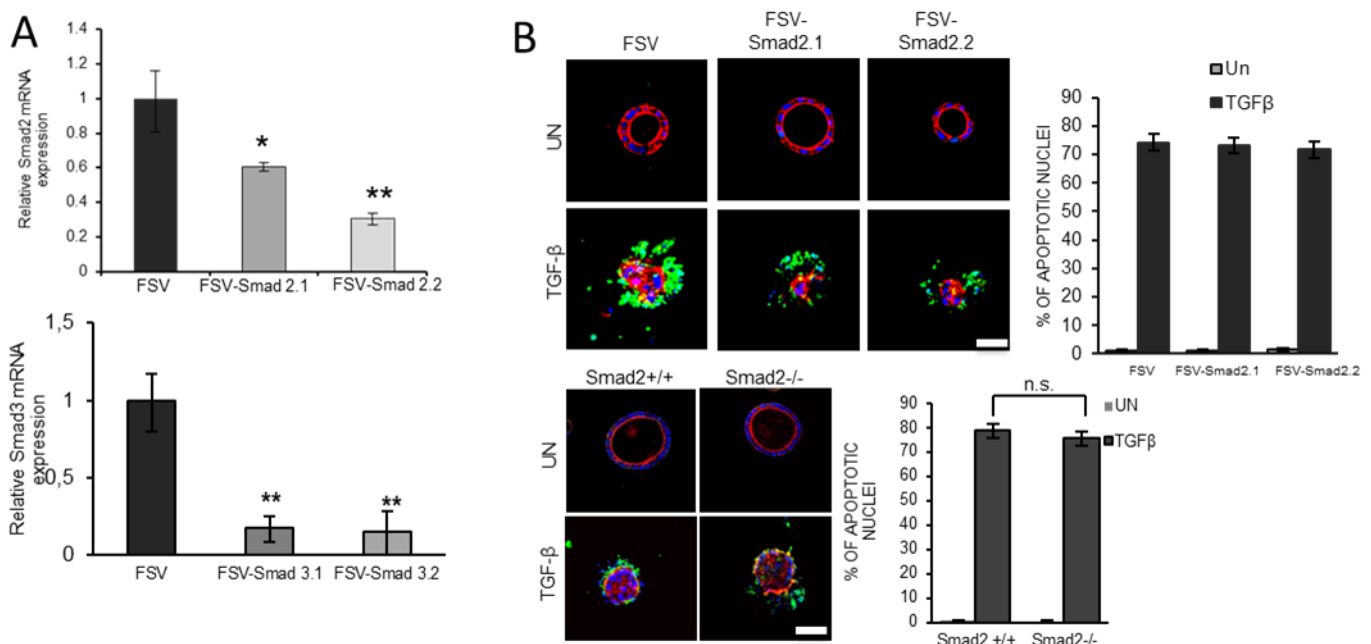


Figura 32. La deficiència d' Smad3 provoca resistència a l'apoptosi induïda per TGF- β . (A) Imatges representatives de immunofluorescència per a Smad2/3 de cultius 3D sense tractar (UN) o tractats amb TGF- β (10ng/ml). Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst. Les dades corresponen a n= 4 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25 μ m. (B) Immunofluorescència de Caspasa-3 escindida en cultius 3D endometrials infectats amb els lentivirus portant l' shRNA Smad3 (FSV-shRNA3.1 o FSV shRNA3.2) i sense tractar (UN) o tractats amb 10ng/ml de TGF- β durant 36 hores. Els cultius es van immunotenyir amb tubulina per a mostrar les estructures glandulars. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Barres d'escala: 25 μ m. (C) Quantificació de les cèl·lules positives per a la caspasa-3 tallada en les mateixes condicions de cultiu. Les dades provenen de n= 3

Resultats

rèpliques experimentals (cultius 3D independents, cadascun amb $n = 180-200$ cèl·lules per condició) i els valors són \pm s.e.m. $**P < 0,01$, analitzat emprant un ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Barres d'escala: $25 \mu\text{m}$. **(D)** Imatges representatives i quantificació de cultius 3D d' *Smad3* $+/+$ i *Smad3* $-/-$ de cultius no tractats (UN) o tractats amb 10ng/ml de *TGF- β* durant 36 hores i immunotenyits per a caspasa-3 escindida. Els cultius també es van immunotenyir amb la faloidina per mostrar les estructures glandulars. Els nuclis es van contrarestar amb Hoechst per dilucidar la morfologia nuclear apoptòtica. Barres d'escala: $25 \mu\text{m}$. **(E)** Quantificació de les cèl·lules positives per a caspasa-3 activa en les mateixes condicions de cultiu. Les dades provenen de $n = 3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents, cadascun amb $n = 180-200$ cèl·lules comptades per condició) i els valors són \pm s.e.m. $**P < 0,01$, per anàlisi t-test. **(F)** Anàlisi de RT-qPCR per a l'expressió de l' mRNA BIM en cultius 3D d' *Smad3* $+/+$ i *Smad3* $-/-$ o en cultius 3D infectats amb l' shRNA d' *Smad3* (FSV-*Smad3.1* i FSV-*Smad3.2*) que no van ser tractats (UN) o tractats amb *TGF- β* (10 ng/ml) durant 16 hores. Les dades són de



$n = 3$ rèpliques experimentals (preparats d' mRNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. $**P < 0,01$, per a l' anàlisi t-test.

Figura 33. La deficiència de *Smad2* no té cap efecte sobre l' apoptosi induïda per *TGF- β* . (A) Anàlisi d' RT-qPCR de l' expressió d' mRNA d' *Smad2* i *Smad3* en cultius 3D de 8 a 10 dies després de la infecció amb lentivirus portant *Smad2* shRNA (FSV-*Smad2.1* i FSV-*Smad2.2*) o *Smad3* shRNA (FSV-*Smad3.1* i FSV-*Smad3.2*). Les dades són de $n = 3$ repeticions experimentals (preparacions d' mRNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. $*P < 0,05$ i $**P < 0,01$, mitjançant una

prova de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' ANOVA unidireccional. **(B)** Imatges representatives i quantificació de l'immunotinció de caspasa-3 activa realitzada en cultius 3D d' *Smad2* +/+ i *Smad2* -/- o en cultius infectats durant 8-10 dies amb lentivirus que contenen l' *shRNA* d' *Smad2* (FSV-*Smad* 2.1 i FSV-*Smad* 2.2) i després tractats amb 10 ng/ml de TGF- β durant 36 hores. Les dades són de n= 3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). No s'observen diferències significatives en l'assaig de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' ANOVA unidireccional. Barra d'escala =25 mm.

També es va veure que el tractament de les cèl·lules deficientes en *Smad3* amb l' ABT-263, mimètic de *BH3-only*, induïa apoptosi tant en les cèl·lules deficientes per a *Smad3* com en cèl·lules de tipus salvatge (Figura 34 A), evidenciant que la capacitat de morir per apoptosi en les cèl·lules deficientes per *Smad3* restava intacta.

L' observació acurada dels cultius 3D va evidenciar un marcat augment de la mida glandular en cultius infectats amb *shRNA* d' *Smad3* o cultius *Smad3* -/- per damunt dels seus homòlegs de tipus salvatge (Figura 34 B). La mesura del perímetre glandular va confirmar un augment de la grandària de les glàndules tant en cultius 3D *Smad3 knock-out* com *Smad3 knock-down* (Figura 34 B), el que suggereix que la deficiència d' *Smad3* millora la proliferació de les cèl·lules epitelials de l' endometri. Per a demostrar aquesta hipòtesi, es mesuraren els nivells d' expressió d' mRNA de la ciclina D1 i es van realitzar assajos d' incorporació de BrdU. Els cultius 3D *Smad3* -/- o aquells cultius infectats amb l' *shRNA3.2* mostren un augment significatiu de l' expressió de ciclina D1 (Figura 34 C) i el nombre de cèl·lules que incorporen BrdU (Figura 34 D). En canvi, la deficiència d' *Smad2* no va tenir efectes sobre l' expressió de la ciclina D1 (Figura 35 A), ni tampoc en la quantitat de cèl·lules que van incorporar BrdU (Figura 35 B) així com tampoc va afectar a la mida glandular (Figura 35 C). Tots aquests resultats recolzen la hipòtesi que la deficiència d' *Smad3* augmenta la proliferació de les cèl·lules epitelials polaritzades en cultius tridimensionals mentre que *Smad2* no sembla jugar-hi un paper important.

Resultats

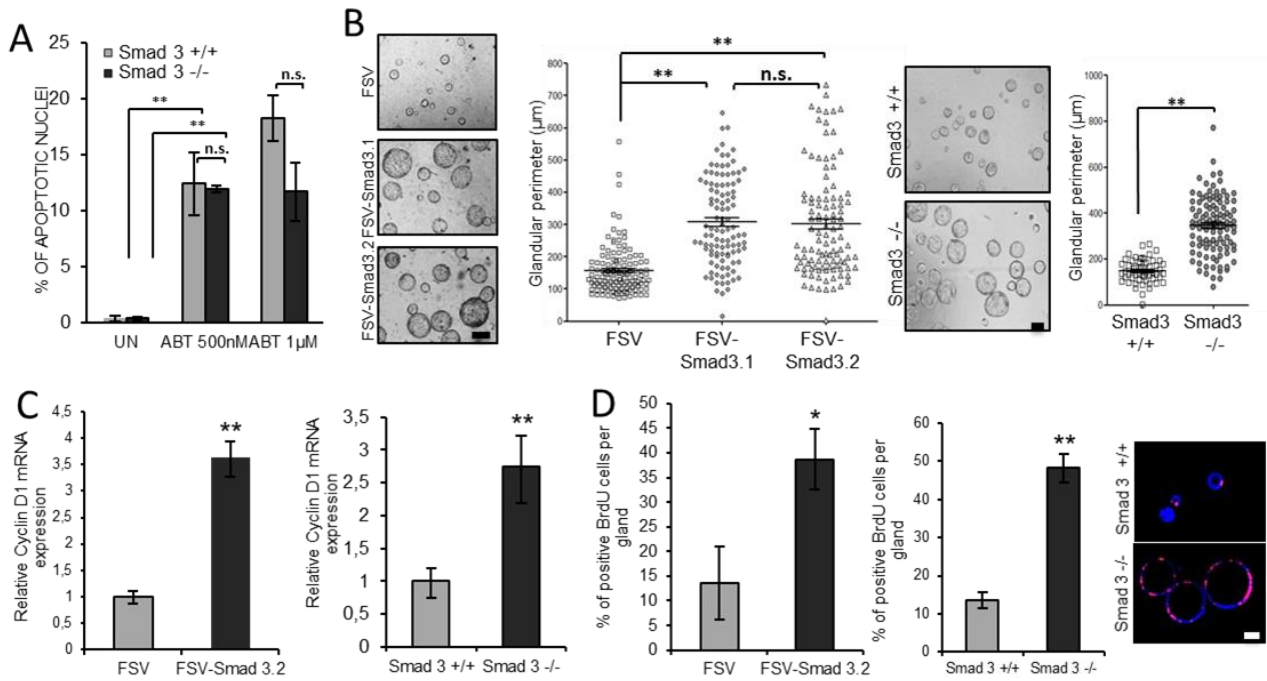


Figura 34. La deficiència d' Smad3 augmenta la proliferació cel·lular. (A) Quantificació de les cèl·lules positives per a caspasa-3 activa de cultius 3D endometrials Smad3 +/+ i Smad3 -/- no tractats (UN) o tractats amb ABT-263. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen mitjana \pm s.e.m. $<P < 0,01$ per ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb $n = 150$ cèl·lules comptades per condició). **(B)** Imatges representatives de contrast de fases i mesures del perímetre glandular de cultius 3D infectats amb l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2) o cultius 3D de cèl·lules Smad3 +/+ i Smad3 -/-. Tots els experiments es van realitzar almenys 3 vegades (perímetre glandular d' FSV, FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2 $n = 77$; perímetre glandular d' Smad3 +/+ i Smad3 -/- $n = 90$). Les barres d'error representen una mitjana de \pm s.e.m. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. n.s. no-significatiu; $** P < 0,01$ per a l' anàlisi t-test. Barres d'escala: $50\mu\text{m}$. **(C)** Anàlisi de RT-qPCR de l' expressió de l' mRNA de ciclina D1 a partir de cultius 3D infectats amb l' Smad3 shRNA (FSV-Smad3.2) o 3D de cèl·lules Smad3 +/+ i Smad3 -/-. Les dades són de $n = 3$ rèpliques experimentals (preparats d' mRNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. $**P < 0,01$, per a l' anàlisi t-test. **(D)** Esquerra, quantificació de les cèl·lules positives per a BrdU en cultius 3D infectats amb l' shRNA Smad3 (FSV-Smad3.2) o 3D a partir de cèl·lules Smad3 +/+ i Smad3 -/-. Dreta, imatges representatives de les cèl·lules positives per a BrdU procedents de cultius 3D Smad3 +/+ i Smad3 -/-. Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Barra d'escala= $25\mu\text{m}$. Les dades

provenen de $n = 3$ rèpliques experimentals i els valors són de \pm s.e.m. $^{**}P < 0,01$, per l'anàlisi t-test.

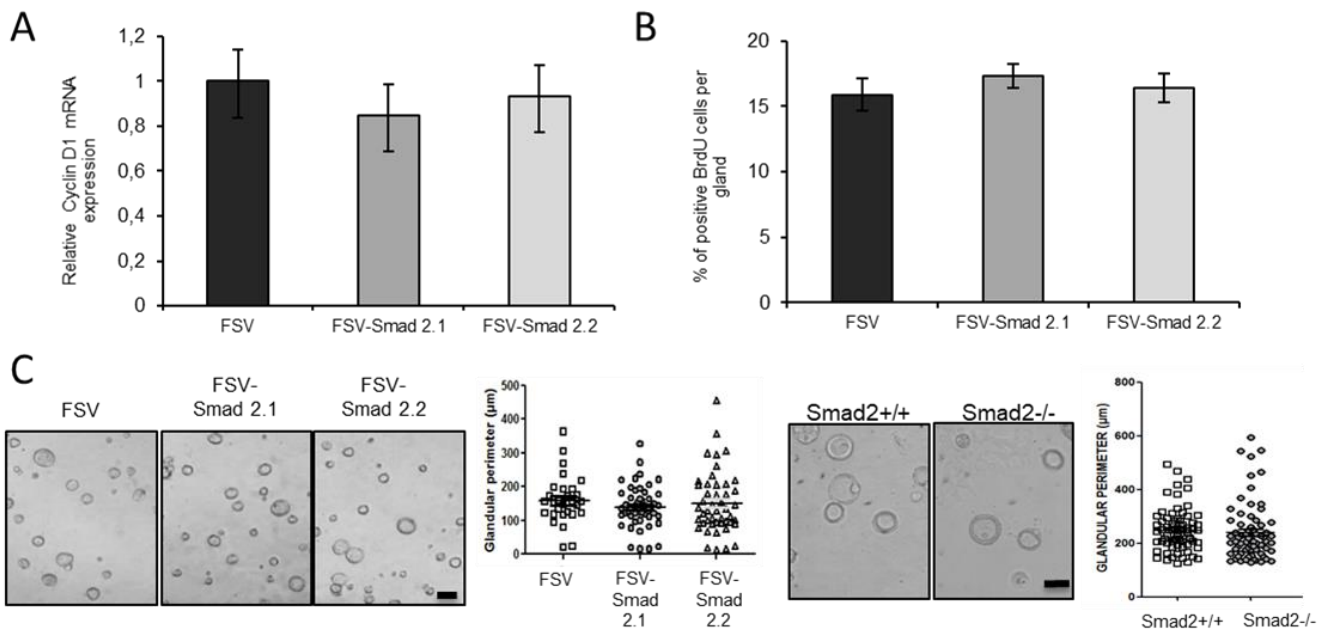


Figura 35. La deficiència d' Smad2 no té cap efecte sobre la proliferació cel·lular. (A) Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de l' mRNA de ciclina D1 en cultius 3D de 8 a 10 dies posteriors a la infecció amb lentivirus que contenen l' shRNA d' Smad2 (FSV-Smad 2.1 i FSV-Smad 2.2). Les dades són de $n = 3$ repeticions experimentals (preparacions d' mRNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m.. No hi ha diferències significatives observades través de la prova de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' ANOVA unidireccional. **(B)** Quantificació de les cèl·lules que mostren immutació positiva per a BrdU de 8 a 10 dies després de la infecció amb lentivirus que contenen els shRNA d' Smad2 (FSV-Smad 2.1 i FSV-Smad 2.2). Els valors són mitjanes \pm s.e.m.. No s' observen diferències significatives per a l'assaig de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' un ANOVA unidireccional. **(C)** Imatges representatives de contrast de fases i mesurament del perímetre de les glàndules de cultius 3D Smad2 +/+ i Smad2 -/- o cultius 3D infectats durant 8-10 dies amb lentivirus portant l' shRNA d' Smad2 (FSV-Smad 2.1 i FSV-Smad 2.2). Barres d'escala: 75μm. Els valors són mitjanes \pm s.e.m.. No s'observen diferències significatives a l'assaig de comparació múltiple de Tukey post-hoc d'ANOVA unidireccional.

2. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DEL TGF- β I LA VIA PI3K/AKT EN LA CARCINOGENÈSIS ENDOMETRIAL

SMAD3 REGULA L' EXPRESSIÓ DE PTEN I L' ACTIVACIÓ DE LA VIA PI3K/AKT

La via de senyalització PI3K/Akt juga un paper fonamental en la regulació de la supervivència i la proliferació cel·lular. Les alteracions d' aquesta via són freqüents en càncer d' endometri i altres malalties (Song, Salmena, and Pandolfi 2012). Per aquests motius, hem volgut investigar si la senyalització de TGF- β /Smad3 podria estar regulant l' activació de la via PI3K/Akt i modular així la supervivència i la proliferació cel·lular. Per a provar aquesta hipòtesi, es va realitzar una anàlisi per *Western Blot* de l' expressió de PTEN i de la fosforilació d' Akt en les cèl·lules deficientes per Smad3. Com s' observa en la figura 36 A les cèl·lules Smad3^{-/-} mostren una marcada disminució de l' expressió de la proteïna PTEN sobre els seus homòlegs de tipus salvatge. Aquesta reducció correlaciona amb un augment de la fosforilació d' Akt (Figura 36 A). De la mateixa manera, la reducció d' Smad3 emprant shRNA va provocar una disminució de l' expressió de la proteïna PTEN i un augment de la fosforilació d' Akt (Figura 37 A). A continuació, vam analitzar si la disminució dels nivells de proteïna PTEN podria ser causada per una regulació transcripcional de PTEN dependent d' Smad3. Per a això, vam mesurar els nivells d' mRNA de PTEN per RT-qPCR en les cèl·lules de teixit endometrial deficientes per Smad3. L' anàlisi de quatre animals diferents, *knock-out* per Smad3, va mostrar una dràstica reducció dels nivells d' mRNA de PTEN en les cèl·lules epitelials d' endometri procedent d' animals Smad3^{-/-} en comparació amb les dels seus germans de tipus salvatge (Figura 36 B). D' igual manera, els shRNA d' Smad3, però no els shRNA d' Smad2, reduïren els nivells d' mRNA de PTEN (Figura 37 B). Per aprofundir més en el paper de la senyalització de TGF- β /Smad3 en la regulació de l' expressió de PTEN en les cèl·lules endometrials, vam mesurar els nivells d' mRNA de PTEN en cultius 3D salvatges tractats amb TGF- β o TGF- β més l' inhibidor del receptor de TGF- β (T β RI) SB431542 per a diferents períodes de temps. L' anàlisi d' RT-qPCR va revelar un augment significatiu de l' mRNA de PTEN en resposta al TGF- β , el qual fou completament anul·lat pel tractament amb SB431542 (Figura 36 C). Tanmateix, el tractament de cultius 3D amb SB431542 va bloquejar eficaçment la translocació nuclear induïda per TGF- β d' Smad2/3 (Figura 37 C). Per tal d' analitzar si l' augment en els nivells d' mRNA de PTEN induït per TGF- β era conseqüència d' un augment en els nivells de transcripció d' aquest gen o bé degut a un augment de l' activitat traduccional; es van tractar cultius 3D amb l' inhibidor de la transcripció: actinomicina

D o l' inhibidor de la traducció, la cicloheximida. Els resultats obtinguts demostren que els nivells d' mRNA de PTEN van ser inhibits per l' actinomicina D, però no per l' inhibidor de la traducció, la cicloheximida (Figura 37 D), donant encara més suport a la nostra hipòtesis de que la senyalització TGF- β /Smad pot regular la transcripció de Pten.

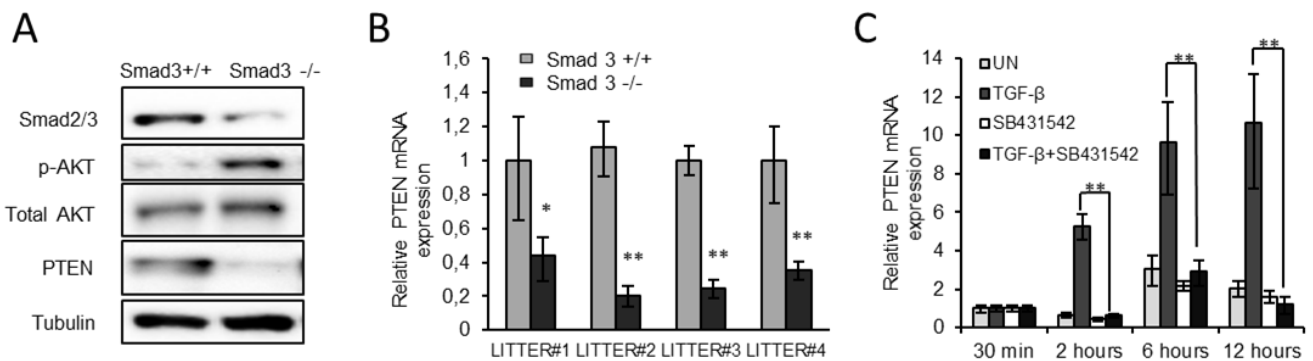


Figura 36. Smad3 regula l' expressió de PTEN. (A) Anàlisi de transferència Western blot d' Smad2/3, PTEN i p-AKT de cultius 3D a partir de cèl·lules Smad3 +/+ i Smad3 -/-. Les membranes es van tornar a incubar per AKT total i tubulina per a mostrar una càrrega igual de proteïnes entre les diferents condicions. Es mostra una imatge de Western blot representativa de n =4 (respectivament) rèpliques biològiques. **(B)** Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió d' mRNA de Pten en cultius 3D a partir de quatre ratolins amb genotips Smad3 +/+ i Smad3 -/- a les 4 setmanes de vida. Les dades són de n =4 rèpliques experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. *P <0,05 i ** P <0,01, per a l' anàlisi t-test. **(C)** Anàlisi d' RT-qPCR que mostra l'expressió de l' mRNA de Pten en cultius 3D tractats per als temps indicats amb 10 ng/ml de TGF- β sol o TGF- β més SB431542. Les dades són de n =3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ** <P <0,01, per a l' anàlisi t-test.

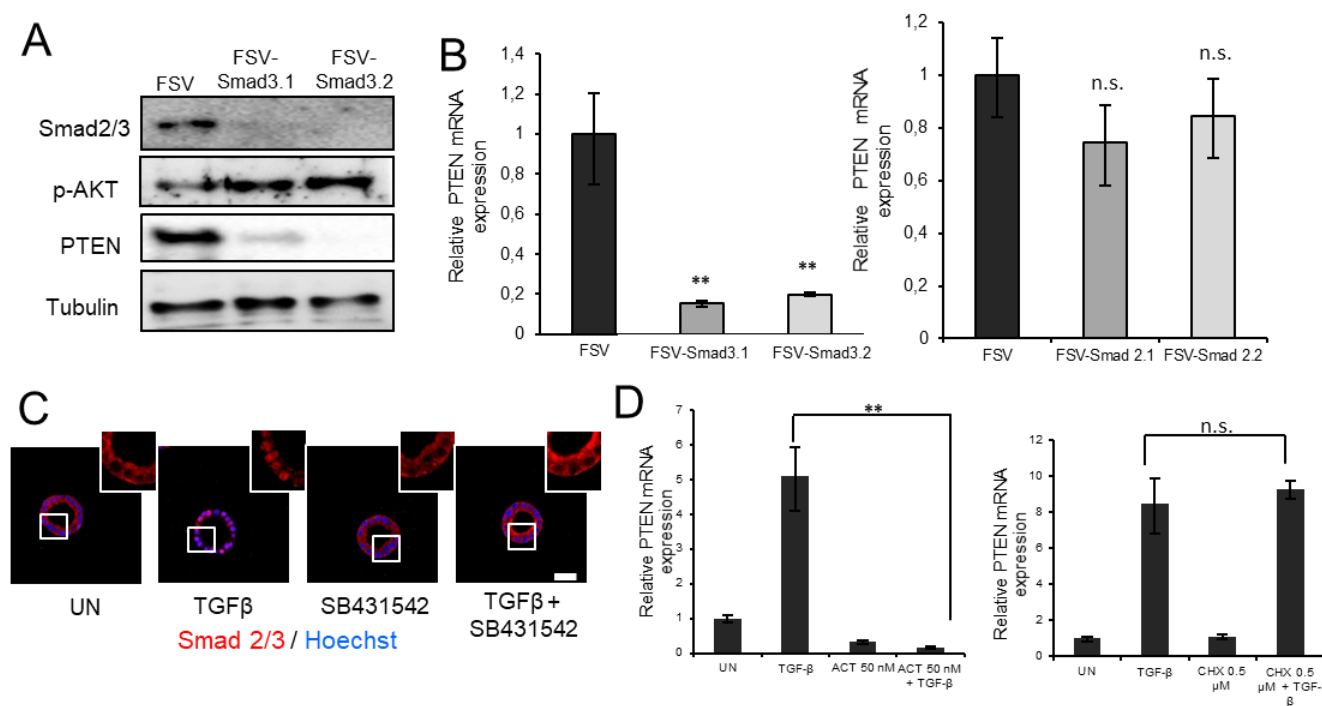


Figura 37. Smad3 controla l'expressió de PTEN. (A) Anàlisi Western blot de cultius 3D infectats amb l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2). Les cèl·lules infectades amb l' shRNA d' Smad3 mostren una disminució de la proteïna PTEN i un augment de la AKT fosforilada en comparació amb els seus controls. Es mostra una imatge representativa de $n = 3$ i $n = 4$ (respectivament) rèpliques biològiques. (B) RT-qPCR de l' expressió d' mRNA de Pten en cultius 3D infectats amb l' shRNA Smad2 (FSV-Smad2.1 i FSV-Smad2.2) o Smad3 (FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2). Les dades són de $n = 3$ repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ** $P < 0,01$, mitjançant una prova de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' un ANOVA unidireccional. n.s., indica canvis no significatius. (C) Imatges representatives d' immunofluorescència per Smad2/3 en cultius 3D pre-incubats amb $10 \mu\text{M}$ de SB431542 durant 2 hores i estimulats amb TGF- β durant 30 minuts. Barres d'escala = $25 \mu\text{m}$. (D) RT-qPCR de l'expressió d' mRNA de Pten en cultius 3D tractats durant 6 hores amb TGF- β (10 ng/ml) sol o TGF- β més 50 nM d'actinomicina D (gràfica esquerra) o bé TGF- β sol o TGF- β més $0,5 \text{ mM}$ de cicloheximida (gràfic dret). Les dades són de $n = 3$ repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ** $P < 0,01$, per anàlisi test-t.

Per a proporcionar una evidència directa que Pten era un gen diana de l'activitat transcripcional d' Smad2/3, vam realitzar una anàlisi de CHIP del promotor de Pten en cultius 3D estimulats o bé no tractats amb TGF- β . Per tal de poder identificar els putatius llocs d'unió d' Smad2/3 al promotor de Pten, vam analitzar tres segments seqüencials de 500 pb que comprenien des de la posició -1 fins a la posició -1500 del promotor de Pten. El tractament amb TGF- β va provocar un augment dramàtic de la immunoprecipitació depenent d' Smad2/3 dels tres segments promotors de Pten, la qual cosa suggereix que el TGF- β induïx la unió d' Smad2/3 al promotor de Pten (Figura 38 A). Cal esmentar que les mostres no estimulades també mostren una unió basal d' Smad2/3 al promotor de Pten. Per demostrar que l'expressió de PTEN induïda per TGF- β era depenent d' Smad3, es van mesurar els nivells d' mRNA de PTEN en cultius deficientes per Smad3 estimulats amb TGF- β (Figura 38 B). Seguint en el mateix sentit, l'anàlisi per *Western blot* dels cultius 3D salvatges tractats amb TGF- β va confirmar un augment significatiu dels nivells de proteïna PTEN, que es correlacionava amb una disminució de la fosforilació de l' Akt (Figura 38 C).

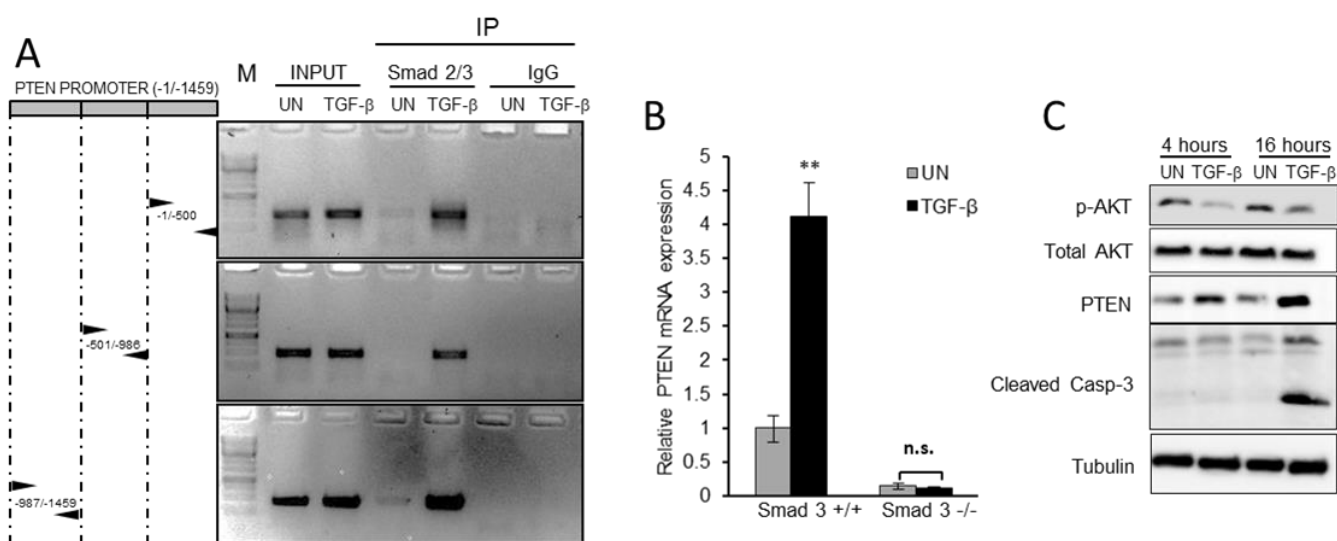


Figura 38. Smad3 regula l'expressió de PTEN. (A) ChIP de la unió d' Smad2/3 al promotor de Pten. Els lisats cel·lulars dels cultius 3D no tractats (UN) o TGF- β (30 minuts) van ser sotmesos a immunoprecipitació (IP) amb l' anticòs d' Smad2/3 o amb l' anticòs control (IgG). Els immunoprecipitats van ser analitzats per PCR convencional usant primers per amplificar tres segments consecutius de ~ 500 pb del promotor de Pten (-1 / -500, -501 / -986, -987 / -1459). (B) Anàlisi d' RT-qPCR de l' mRNA de Pten en cultius 3D de cèl·lules epitelials Smad3 +/+ i Smad3 -/- tractades durant 12 hores amb 10 ng/ml de TGF- β o sense tractar (UN). Les dades són de n = 3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m.

****P <0,01, per l' anàlisi t-test. (C) Anàlisi d'expressió proteica per transferència Western blot de p-AKT, PTEN i caspasa-3 escindida en lisats cel·lulars de cultius (UN) no tractats o cultius tractats durant 4 o 16 hores amb TGF- β (10 ng/ml). Es mostra una imatge representativa de n =3 rèpliques biològiques independents. Les membranes es van tornar a immunodetectar amb els anticossos d' AKT total i tubulina per a mostrar una càrrega igual de proteïnes entre les diverses condicions experimentals.**

Finalment, vam intentar investigar si la regulació de l' expressió de PTEN dependent d' Smad3 observada en els experiments *in vitro* tenia lloc *in vivo*. Per a respondre a aquesta pregunta, es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica de PTEN i p-Akt en seccions de teixits d' úter de ratolins Smad3+/+ i Smad3-/- . Com hem observat anteriorment en cultius 3D, les seccions en sèrie de quatre úters diferents de ratolins Smad3-/- van mostrar una disminució significativa de la immunotinció de PTEN i un augment de la tinció de p-Akt en comparació amb els úters dels seus germans de tipus salvatge (Figura 39). Totes aquestes evidències *in vitro* i *in vivo* que donaven suport a la hipòtesi que la regulació de l' expressió de PTEN, en el teixit endometrial, era dependent d' Smad3 ens van animar a seguir investigant si aquest mecanisme també podia tenir lloc en altres cèl·lules o teixits. Per aquest motiu, vam analitzar l' expressió d' mRNA de PTEN en el cor, la melsa, la tiroide i el fetge de ratolins Smad3-/- i Smad3+/+ . Es va observar que les melses i les tiroïdes provinents d' animals Smad3-/- , però no el cor ni el fetge, mostraven una reducció significativa de l' expressió de PTEN en comparació amb els seus germans Smad3+/+ (Figura 40 A). Per tal d' estudiar l' increment de Pten induït pel TGF- β en un altre sistema cel·lular, es van tractar cultius 3D de cèl·lules HEK-293T humanes amb TGF- β i se' n mesurà l' expressió d' mRNA de PTEN. De la mateixa manera que en els cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d' endometri murí, el tractament amb TGF- β va augmentar l' expressió de l' mRNA de PTEN en les cèl·lules HEK-293T (Figura 40 B). Tots aquests resultats suggereixen que l' expressió de Pten induïda per Smad3 pot ser un mecanisme molecular que opera en diferents teixits i/o òrgans.

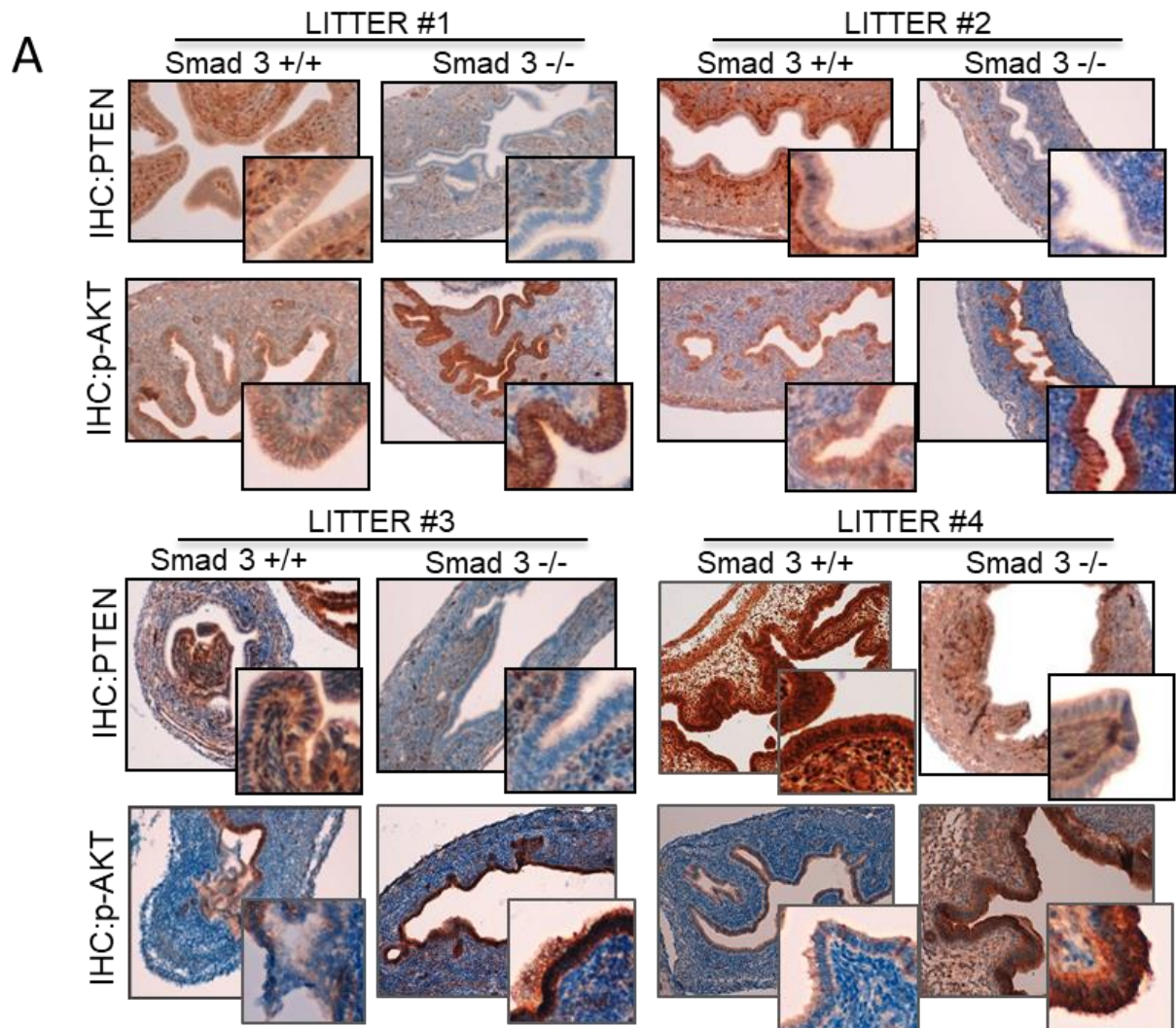


Figura 39. *Smad3* regula l'expressió de *PTEN*. (A) Imatges representatives d'immunohistoquímica de *PTEN* i d'*AKT* forforilada realitzades en seccions seriades de teixit endometrial a partir de quatre ratolins independents amb els genotips *Smad3* +/+ i *Smad3* -/- de 4 setmanes de vida (imatges 20x i ampliacions; n = 6 *Smad3* +/+ i n = 4 *Smad3* -/- ratolins).

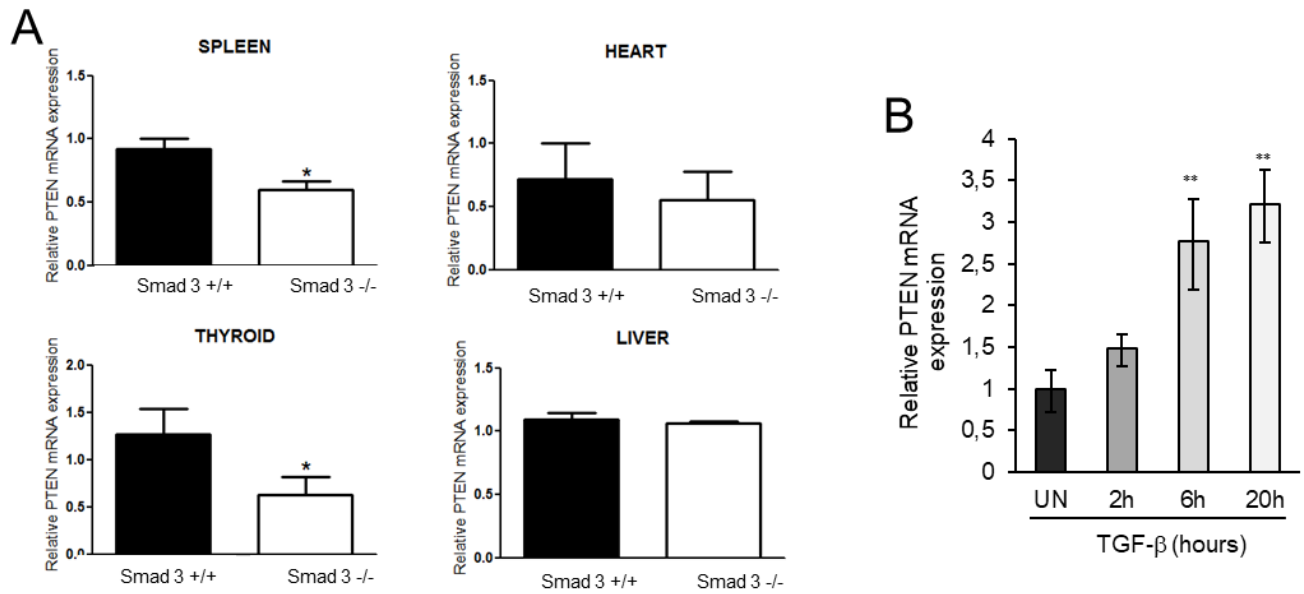


Figura 40. Smad3 controla l'expressió de PTEN. (A) L'anàlisi RT-qPCR revela una disminució significativa de l'expressió de l'mRNA de Pten a la tiroide i a la melsa, però no en el fetge o el cor en ratolins Smad3 -/- en comparació amb ratolins Smad3 +/+. Les dades són de n = 3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ** $P < 0,05$, per anàlisi de test t. **(B)** L'anàlisi RT-qPCR revela un augment significatiu de l'expressió d'l mRNA de Pten en cultius 3D de cèl·lules HEK-293T tractades pels temps indicats amb TGF- β . Les dades són de n = 3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ** $P < 0,01$, mitjançant la prova de comparació múltiple de Tukey post-hoc d'un ANOVA unidireccional.

L' EXPRESSIÓ DE PTEN CONTROLADA PER SMAD3 REGULA LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR I LA MORT APOPTÒTICA INDUÏDA PEL TGF- β A TRAVÉS D' UN MECANISME DEPENDENT DE LA VIA PI3K/AKT

Els resultats obtinguts prèviament ens van conduir a la hipòtesi que la regulació de Pten i la consegüent reducció de la fosforilació d' Akt podrien regular la proliferació cel·lular i la sensibilitat a l' efecte pro-apoptòtic del TGF- β . Per a determinar el paper de l' activació de la via PI3K/Akt en la regulació de la proliferació cel·lular i a l' apoptosi induïda per TGF- β , es van infectar cèl·lules endometrials amb l' shRNA d' Smad3 i es van tractar amb l' inhibidor comercial de la PI3K, el LY294002. L' addició de LY294002 va frenar l' augment del perímetre glandular en les cèl·lules infectades amb l' shRNA d' Smad3, el que indica que l' activitat de la PI3K és necessària per a l' augment de la mida glandular (Figura 41 A). També es van analitzar els efectes de la inhibició de la PI3K sobre l' apoptosi induïda per TGF- β . El tractament de cultius tridimensionals Smad3-/- amb LY294002 més TGF- β va provocar un marcat augment de les cèl·lules que presentaven immunodetecció positiva per a la caspasa-3 activa i de les cèl·lules que presentaven una morfologia apoptòtica (Figura 41 B). Es van obtenir resultats similars amb cultius 3D infectats amb lentivirus que contenien l' shRNA d' Smad3 quan van ser sotmesos al tractament amb l' inhibidor de la PI3K, LY294002, més TGF- β (Figura 42 A i B). Aquests resultats indiquen que la inhibició de la via PI3K mitjançant el tractament amb LY294002 restaura la sensibilitat dels cultius 3D deficients per Smad3 a l' apoptosi provocada pel TGF- β , el que suggereix que la sobre-senyalització de la via PI3K/Akt causada per la deficiència d' Smad3 inhibeix la funció pro-apoptòtica de TGF- β .

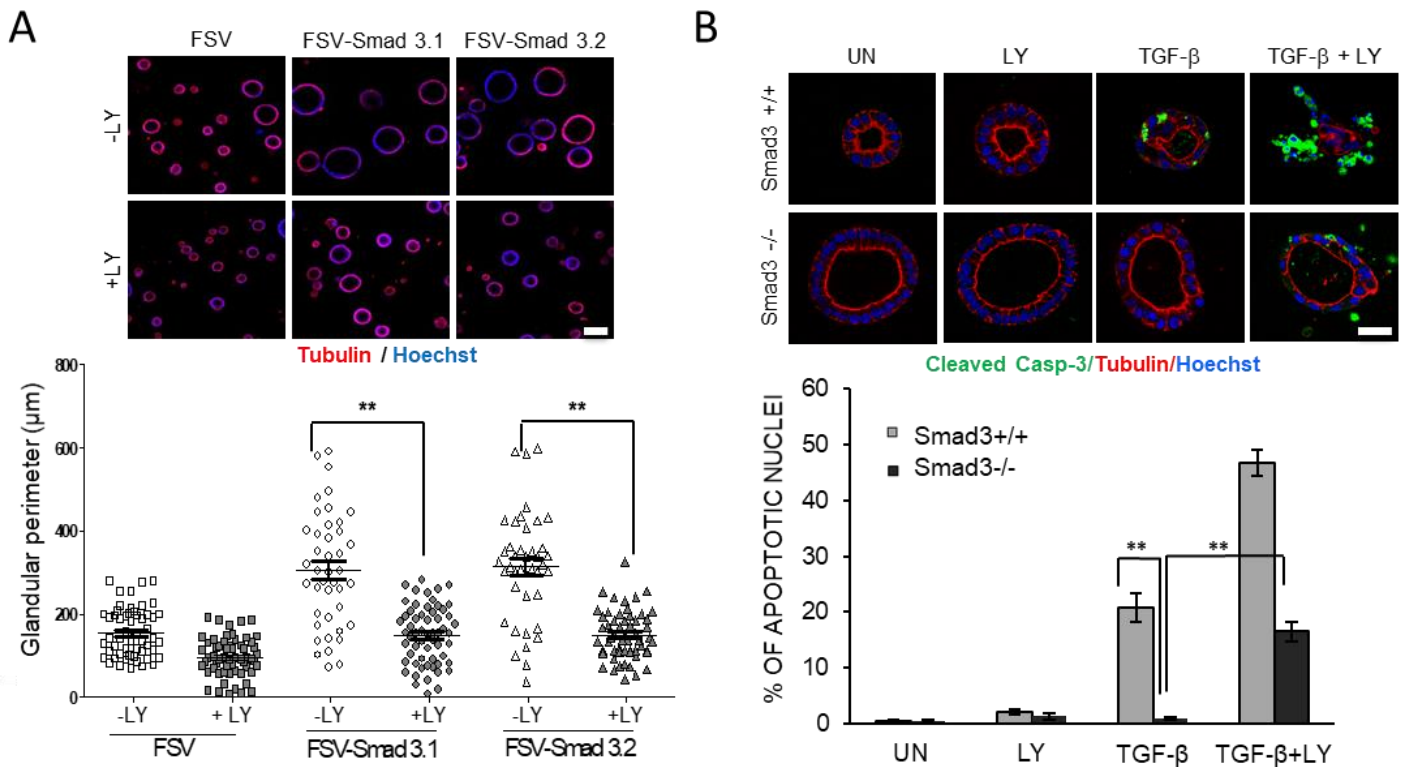


Figura 41. La inhibició de la via PI3K/Akt regula l'apoptosi induïda per TGF- β . (A) Cultius 3D infectats amb l' shRNA Smad3 (FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2) i tractades (+ LY) o no (-LY) amb 10 μ M de LY294002. El panell superior mostra imatges representatives de cultius 3D immunoexposats a l' anticòs de tubulina i Hoechst per mostrar estructures glandulars en les condicions indicades. La part inferior, mostra una quantificació del perímetre glandular. Tots els experiments es van realitzar almenys 3 vegades (perímetre glandular de FSV, FSV-Smad3.1 i FSV-Smad3.2). Les barres d'error representen una mitjana \pm s.e.m.. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. ** $P < 0,01$ per l' anàlisi t-test. Barres d'escala: 50 μ m. (B) Imatges representatives de la tinció de caspasa-3 tallada, Hoechst i tubulina (panell superior) i quantificació (gràfic inferior) de cèl·lules positives per a la caspasa-3 activa en cultius Smad3 +/+ i Smad3 -/- pretractats amb 10 μ M de LY294002 (+ LY) durant 2 hores sense combinació amb un tractament posterior o amb un tractament posterior amb TGF- β (10 ng/ml) durant 24 hores. Barres d'escala: 25 μ m. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen mitjana \pm s.e.m. ** $P < 0,01$ per un ANOVA bidireccional seguit per l'anàlisi post hoc de Bonferroni. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb $n = 150$ cèl·lules comptades per condició).

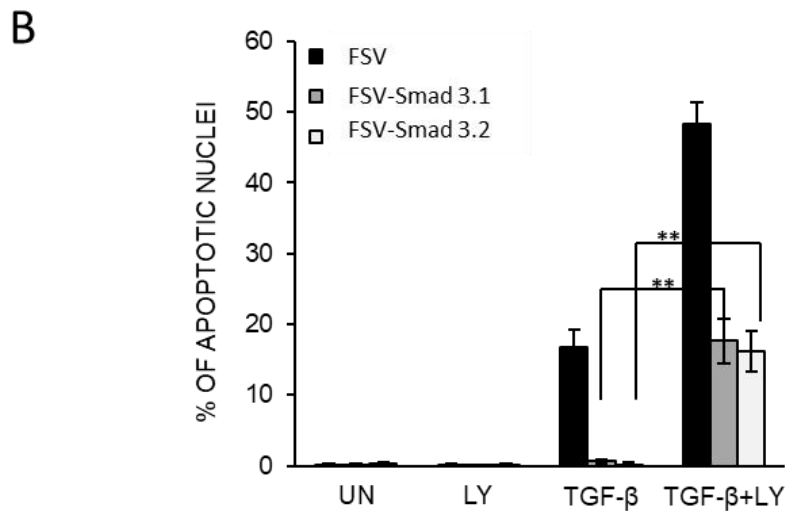
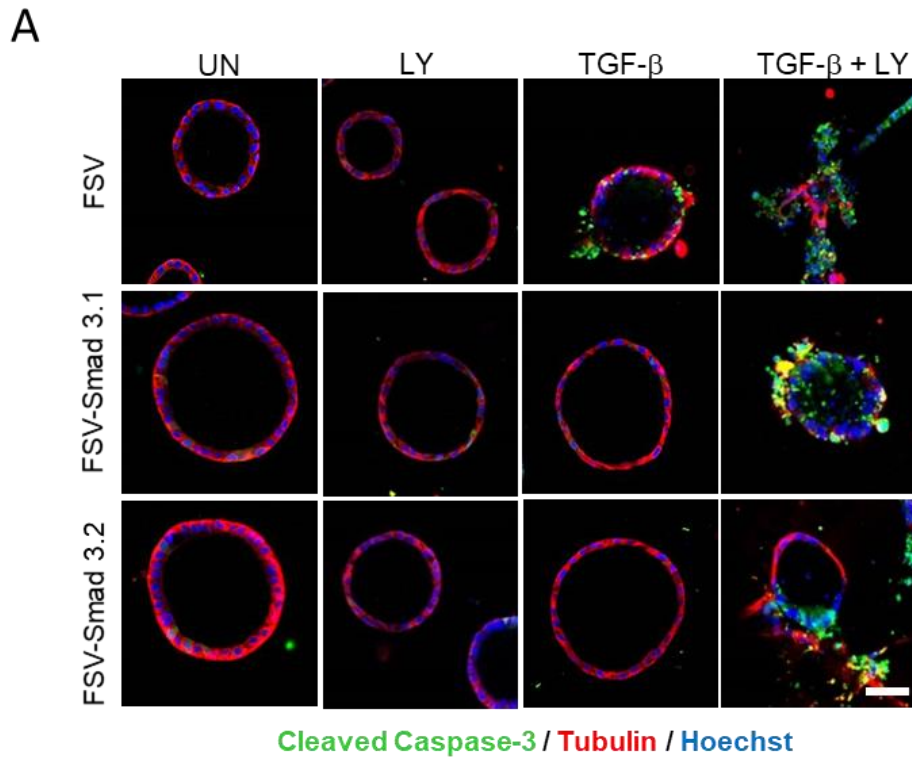


Figura 42. La inhibició de PI3K restaura l'apoptosi en les cèl·lules deficientes per Smad3. (A) Imatges representatives corresponents a la tinció de caspasa-3 activa / tubulina / Hoechst en cultius 3D infectats amb l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad 3.1 i FSV-Smad 3.2) o el vector buit (FSV) i estimulat amb TGF- β (10 ng/ml) o en combinació amb l'inhibidor de PI3K, el LY294002 (LY). Les dades són de $n=3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25 μ m. **(B)** Quantificació de la tinció positiva per a caspasa-3 tallada en les cèl·lules exposades al tractament descrit. Les dades són de $n=3$ rèpliques experimentals i els valors són de mitjanes \pm s.e.m. $***P < 0,01$, per a l'anàlisi t-test.

Per a proporcionar una evidència directa que l'activació de la senyalització PI3K/Akt, causada per la pèrdua de Pten, era important per regular la proliferació de les cèl·lules epitelials i la funció apoptòtica del TGF- β , vam analitzar els efectes del TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials deficientes en Pten. En aquest sentit, vam establir cultius endometrials 3D de ratolins portadors d'al·lels Pten *floxed* (Pten^{fl/fl}) i de la recombinasa Cre induïda per tamoxifè (Cre: ER^{+/-}). L'addició de tamoxifè a les cèl·lules epitelials d'endometri aïllades de ratolins Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} resulta en una deleció eficient de Pten i en un augment constitutiu de la fosforilació de l'Akt (Figura 43). El tractament amb TGF- β de cultius en 3D deficientes per Pten va provocar una supressió gairebé completa dels nuclis que mostraven una morfologia apoptòtica o una tinció positiva per a la caspasa-3 activa després de 72 hores de tractament amb TGF- β (Figura 44 A i B). A més a més, la deficiència en Pten també va provocar una marcada disminució de l'expressió basal i induïda per TGF- β del membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2, BIM (Figura 44 C) que com s'ha descrit prèviament, augmentava sota l'estímul del TGF- β en cultius 3D de tipus salvatge conduint a una mort apoptòtica. Finalment, també vam avaluar els efectes de la deficiència de Pten en la proliferació cel·lular. Els cultius 3D deficientes en Pten van mostrar un augment important del perímetre glandular (Figura 44 D) que es correlacionava amb un augment significatiu de les cèl·lules que incorporaven BrdU (Figura 44 E) i també amb un augment d'expressió de l'mRNA de la ciclina D1 (Figura 44 F). En definitiva, tots els resultats anteriors demostren que la pèrdua de Pten regula la proliferació de les cèl·lules epitelials d'endometri murí i la sensibilitat a la seva apoptosi induïda per TGF- β .

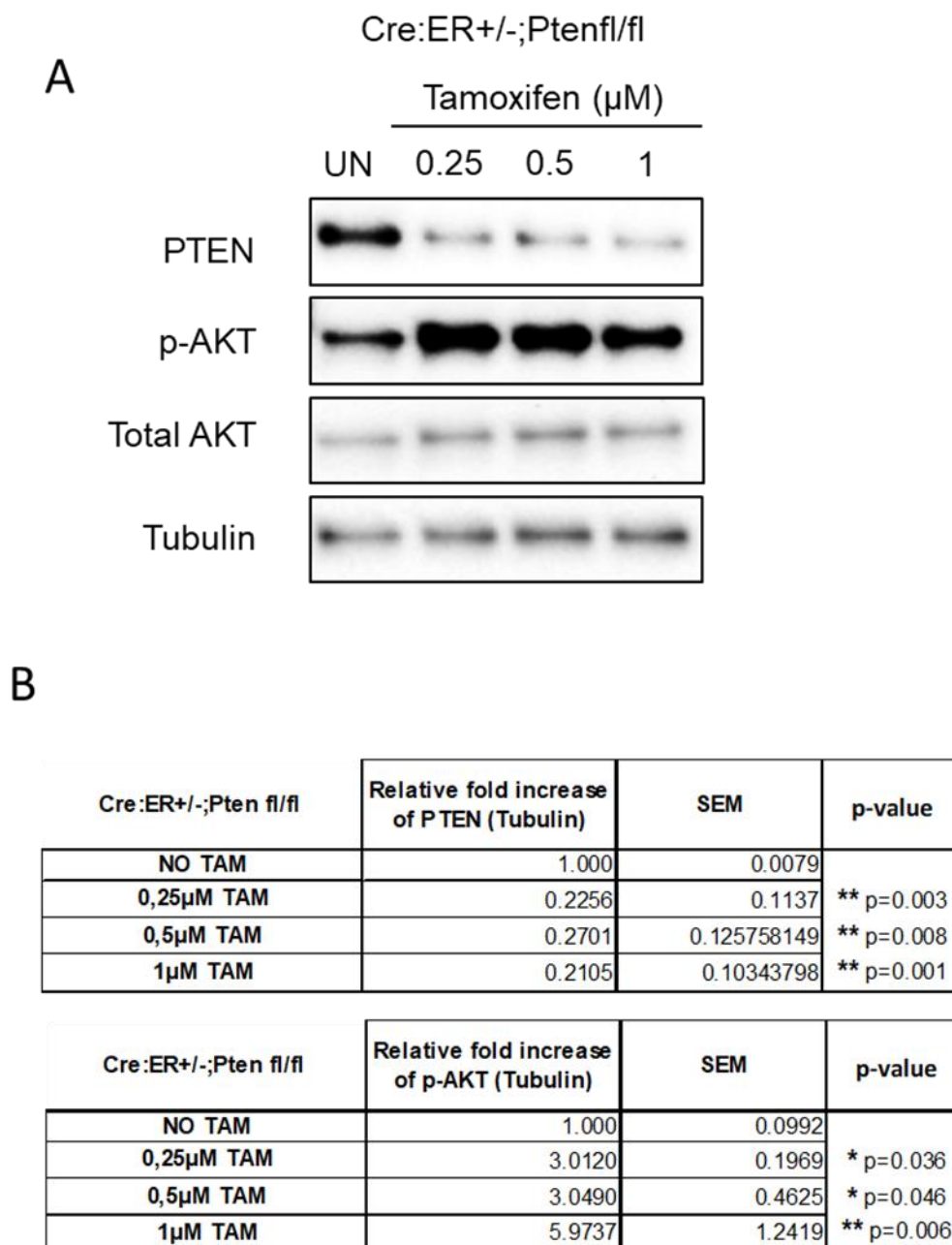


Figura 43. L'eliminació de *Pten* induïda pel tractament amb tamoxifè en ratolins *Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl}*. (A) Anàlisi de Western blot a partir de cultius 3D *Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl}* que mostra una eficaç supressió de *PTEN* i un augment posterior dels nivells de *p-Akt* després del tractament amb les dosis indicades de tamoxifè. Es mostra una imatge representativa de $n = 6$ rèpliques biològiques. (B) Les bandes immunodetectades per *PTEN* i *p-Akt* es van quantificar mitjançant una anàlisi densitomètrica emprant el programari ImageJ. Els valors relatius dels nivells de *PTEN* i *p-Akt* s'expressen usant la tubulina com a referència. Les dades són de $n = 6$ rèpliques experimentals i els valors són mitjanes \pm s.e.m. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, mitjançant una prova de comparació múltiple de Tukey post-hoc d' un ANOVA unidireccional.

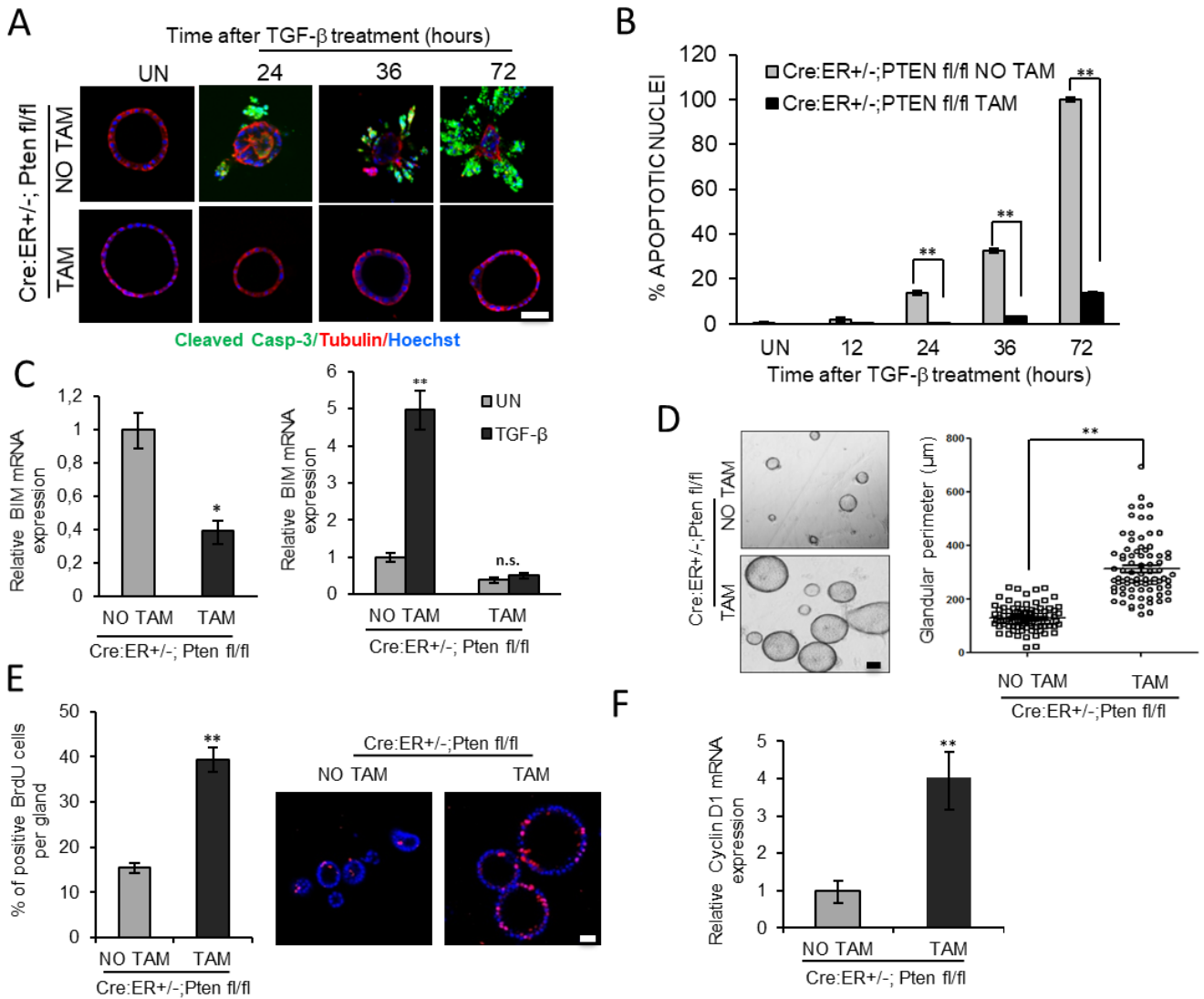


Figura 44. L'expressió de *Pten* regula l'apoptosi induïda per TGF- β i la mida glandular. (A) Imatges representatives d'immunofluorescència per a caspasa-3 tallada realitzada en cultius 3D *Cre:ER+/-;Pten^{fl/fl}* exposats (TAM) o no (NO TAM) al tamoxifè per a induir la supressió de *Pten*; i tractats o no (UN) amb TGF- β (10 ng/ml) per als temps indicats. Els cultius 3D també es tenyien amb tubulina i Hoechst per mostrar les estructures glandulars i la morfologia nuclear. Barres d'escala: 25 μ m. (B) Quantificació de les cèl·lules que presenten immunofluorescència positiva per a caspasa-3 activa. Les dades es mostren per a cinc experiments independents (cadascun amb n = 180 cèl·lules comptades per condició). (C) El gràfic esquerra mostra una anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de BIM en cultius 3D *Cre:ER+/-;Pten^{fl/fl}* tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per a induir la supressió de *Pten*. El gràfic dret mostra una anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de BIM

Resultats

en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) tractats amb tamoxifè i després sense tractar (UN) o tractats amb 10 ng/ml de TGF- β durant 16 hores. Les dades són de n =3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ****P <0,01, per a l' anàlisi t-test.** **(D)** Imatges representatives de contrast de fases i mesures del perímetre glandular de cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per a induir la supressió de Pten. Tots els experiments es van realitzar almenys 3 vegades. Les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. **** P <0,01 per l' anàlisi t-test.** Barres d'escala: 25 μ m. **(E)** Esquerra, gràfic que mostra la quantificació de les cèl·lules positives per BrdU en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per a induir la supressió de Pten. Dreta, imatges que mostren tincions representatives de cèl·lules positives per BrdU de les mateixes cultures. Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Barra d'escala = 5 μ m Les dades provenen de n =3 rèpliques experimentals i els valors són de mitjanes \pm s.e.m. ****P <0,01, per a l' anàlisi t-test.** **(F)** Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de l' mRNA de ciclina D1 en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten. Les dades són de n =3 rèpliques experimentals (preparats d' mRNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. ****P <0,01, per l' anàlisi t-test.**

LA DEFICIÈNCIA DE PTEN COMPORTA UNA FOSFORILACIÓ I UNA LOCALITZACIÓ NUCLEAR CONSTITUTIVA D' SMAD2/3

Diverses evidències suggereixen que la via de senyalització PI3K/Akt pot regular l'expressió i l'activació dels factors de transcripció Smad. Per tant, després d'haver demostrat que la pèrdua de Pten afecta la resposta pro-apoptòtica al TGF- β , vam investigar els efectes de la deficiència de Pten en la senyalització TGF- β /Smad. Primer de tot vam analitzar per *Western blot* quin era l'estat de la via TGF- β /Smad. L'anàlisi va revelar que la deficiència de Pten provoca un marcat increment de la fosforilació d' Smad2/3 causada per un augment de l'expressió d' Smad2/3 (Figura 45 A). Per analitzar la distribució subcel·lular d' Smad després de la supressió de Pten, es van tractar cultius Cre:ER^{+/+}-Pten^{fl/fl} tridimensionals amb tamoxifè per a induir la supressió de Pten i es va avaluar la localització d' Smad2/3 i d' Smad4 per immunofluorescència. En les estructures glandulars control per Pten (Cre:ER^{+/+}-Pten^{fl/fl} sense inducció de la supressió de Pten), l'addició de TGF- β va provocar una ràpida translocació nuclear d' Smad2/3. Sorprenentment, en els cultius 3D deficients en Pten, Smad2/3 es trobaven localitzats constitutivament al nucli, fins i tot en absència de l'estimulació pel TGF- β (Figura 40 B). Després de 6 hores del tractament amb TGF- β , les cèl·lules control per Pten van mostrar una localització citoplasmàtica d' Smad2/3. En canvi, en les cèl·lules deficients per Pten, Smad2/3 seguien localitzades en el nucli (Figura 45 B). La immunofluorescència d' Smad4 va mostrar una translocació nuclear dependent del tractament amb TGF- β , tant en cèl·lules de tipus salvatge com en cèl·lules *knock-out* de Pten; però, sorprenentment, Smad4 es va mantenir en el citoplasma de les cèl·lules deficients en Pten no estimulades amb TGF- β (Figura 45 C). Degut a que normalment Smad2/3 i Smad4 formen complexos per a entrar al nucli vam voler assegurar aquesta localització diferencial d' Smad2/3 i Smad4 en les cèl·lules deficients per Pten, per fer-ho vam realitzar un fraccionament nuclear i citosòlic de cultius Cre:ER^{+/+}-Pten^{fl/fl} 3D tractats o no amb tamoxifè per induir l'excisió de Pten. L'anàlisi per *Western blot* de la distribució d' Smad2/3 i Smad4 va demostrar que la pèrdua de Pten condueix a una translocació nuclear selectiva per a Smad2/3, però no per a Smad4 (Figura 45 D).

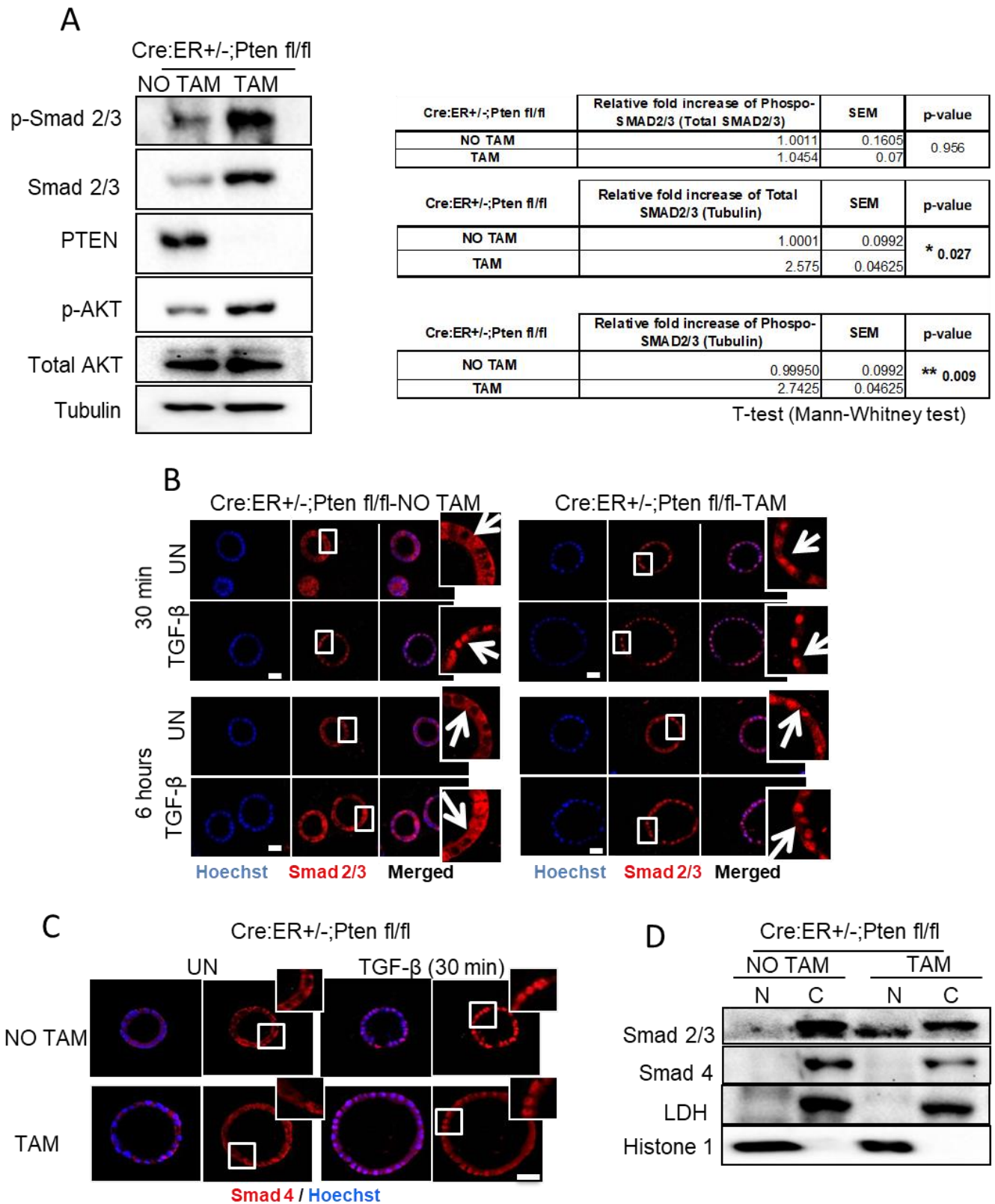


Figura 45. La deficiència de *Pten* condueix a la localització nuclear constitutiva d' *Smad3*. (A) Esquerra, anàlisi Western blot de p-Smad2/3, Smad2/3 i p-AKT en lisats de 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè. Les membranes també es van immunodetectar

amb l'anticòs de PTEN per a mostrar la seva deleció total després del tractament amb tamoxifè. Les membranes es van reblotar amb els anticossos d' Akt total i de tubulina per a mostrar una càrrega igual de proteïnes entre les diferents condicions. Es mostra una imatge representativa de $n = 3$ rèpliques biològiques. Dreta, Quantificació de la densitometria i anàlisi estadístic corresponent al Western blot que es mostra a l'esquerra de la imatge. Els valors són mitjanes \pm s.e.m. * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$, per l' anàlisi t-test. **(B)** Immunofluorescència d' Smad2/3 en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten i tractats amb 10 ng/ml de TGF- β durant 30 minuts, 6 hores o sense tractament (UN). Els cultius 3D es van tenyir amb Hoechst per a mostrar els nuclis. Les imatges ampliades es mostren enquadrades per a mostrar millor la localització cel·lular d' Smad2/3. Les fletxes indiquen la presència o absència de tincions nuclears. Barres d'escala: 25 μ m. Les dades són de $n = 3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents). **(C)** Immunofluorescència d' Smad4 en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} incubats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per a induir la supressió de Pten i després tractats amb 10 ng/ml de TGF- β durant 30 minuts o sense tractar (UN). Les imatges ampliades mostren la localització cel·lular d' Smad4. Les dades són de $n = 3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25 μ m. **(D)** Anàlisi Western blot d' Smad2/3 i d' Smad4 en fraccions nuclears (N) i citosòliques (C) cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè. Les membranes també van ser blotades amb histona H1 i LDH per demostrar un fraccionament nuclear i citosòlic correcte. Es mostra una imatge representativa de $n = 3$ rèpliques biològiques.

Un cop vàrem poder demostrar que la deficiència de Pten provoca una localització nuclear constitutiva d' Smad2/3 en cultius 3D, vam estudiar la localització d' Smad2/3 en endometris deficients per Pten *in vivo*. Amb aquesta finalitat, es varen realitzar immunohistoquímiques per a detectar Smad2/3 en seccions uterines obtingudes de ratolins Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} injectats o no amb tamoxifè. S' ha descrit anteriorment que l' administració d' una sola dosi de tamoxifè a ratolins Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl}, dona com a resultat un mosaic de deleció per Pten a l' endometri (Mirantes et al. 2013). En aquest model de ratolí, l' epiteli endometrial tumoral Pten-negatiu coexisteix amb les cèl·lules epitelials endometrials normals que conserven l' expressió de Pten. Aquest model permet l' estudi de l' expressió d' Smad2/3 en cèl·lules negatives per a la tinció de PTEN i PTEN positives en la mateixa secció uterina d' un sol ratolí. Tal i com s' observa a la figura 46 A les glàndules endometrials que mostren immunotinció negativa per PTEN presenten una

expressió nuclear d' Smad2/3, mentre que les glàndules que conserven l' expressió de PTEN mostren una tinció majoritàriament citoplasmàtica d' Smad2/3 (Figura 46 A). Com vam observar en l' anàlisi de *Western blot* d' Smad2/3 en cultius 3D deficients en Pten, l' anàlisi immunohistoquímica també va evidenciar un augment significatiu de la tinció global d' Smad2/3 en el teixit deficient en Pten. L' augment de la localització nuclear d' Smad2/3 en glàndules deficients per Pten es va validar també usant ratolins Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats o no amb tamoxifè (Figura 46 B). Per descartar la possibilitat que PTEN influís en l' expressió d' altres components de la senyalització del TGF- β , també vam realitzar anàlisis immunohistoquímiques d' Smad4 i del receptor del TGF- β Tipus II (T β RII) en seccions en sèrie de teixit endometrial. Smad4 i T β RII no van mostrar diferències en la seva expressió o localització entre les glàndules negatives per PTEN o PTEN positives (Figura 46 A).

Posteriorment, vam voler investigar si la deficiència de Pten suposava també una localització nuclear d' Smad2/3 en carcinomes endometrials humans. Per a detectar i estudiar l' associació entre la localització d' Smad2/3 i l' expressió de PTEN, vam realitzar anàlisis immunohistoquímiques en mostres de carcinoma d' endometri (CEE) procedents de teixits humans. Recolzant la nostra hipòtesis es va veure que els CEE de grau III que mostraven una disminució de l' expressió de PTEN presentaven un augment significatiu de la tinció nuclear per a Smad2/3 (Figura 46 C).

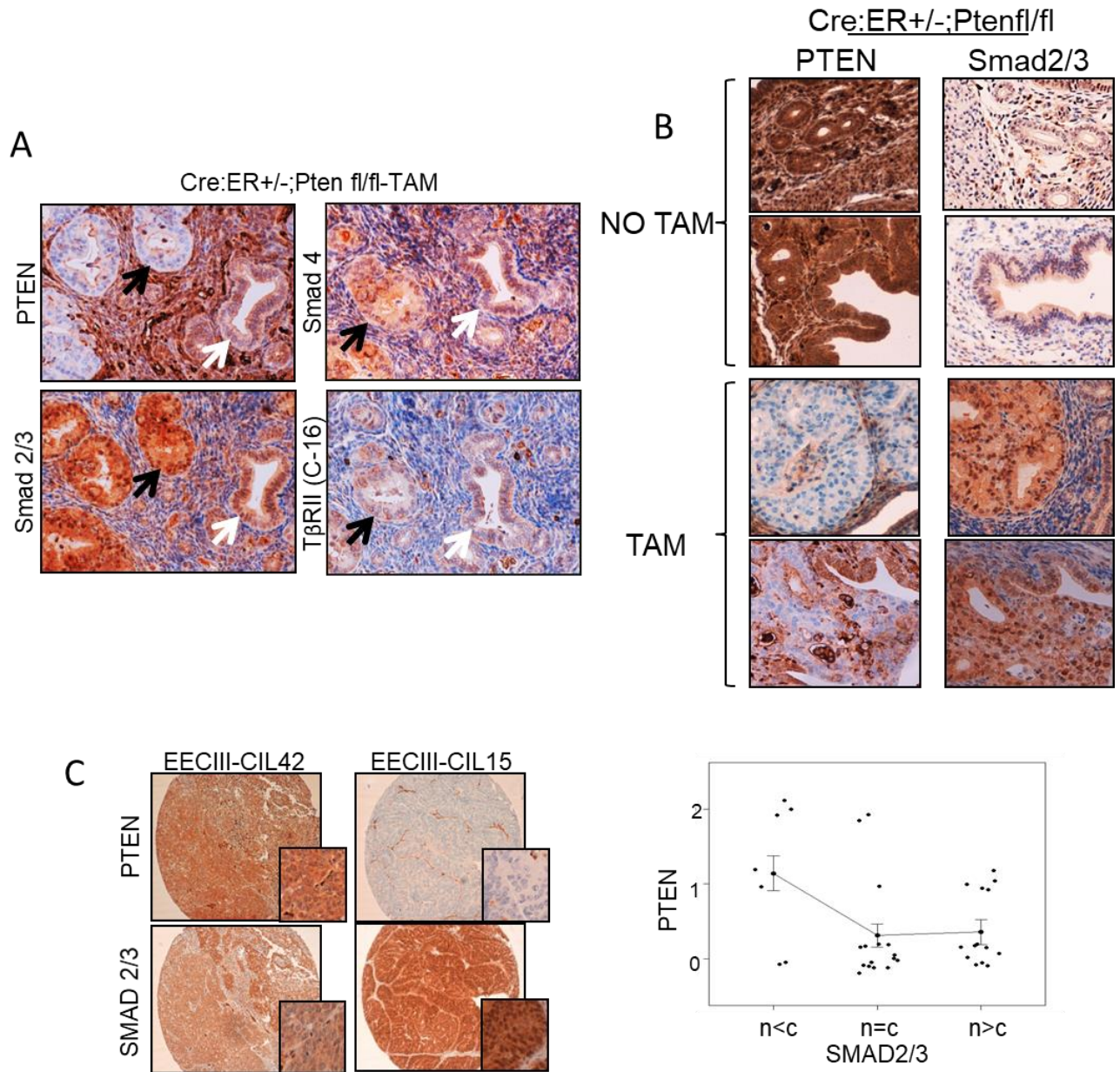


Figura 46. La deficiència de *Pten* condueix a la localització nuclear constitutiva d' *Smad3*. **(A)** Immunohistoquímica de *PTEN*, *Smad2/3*, *Smad4* i *TβRII* en seccions seriades de teixit endometrial obtingudes a partir de ratolins *Cre:ER+/-;Pten^{fl/fl}* de 12 setmanes; injectats amb tamoxifè per a induir la supressió de *Pten*. Els ratolins es van sacrificar 4 setmanes després de la injecció del tamoxifè. Les fletxes blanques indiquen la mateixa glàndula control per *PTEN* tenyida contra *PTEN*, *Smad2/3*, *Smad4* i *TβRII* (C-16) en seccions seriades. Les fletxes negres indiquen una glàndula deficient per *Pten* immunomarcada per *PTEN*, *Smad2/3*, *Smad4* i *TβRII* (C-16) en seccions seriades. (ampliacions 40x; n =10 ratolins *Cre:ER+/-;Pten^{fl/fl}* -TAM). **(B)** Immunohistoquímica de *PTEN* i d' *Smad2/3* en seccions de teixit endometrial de parafina fixades en formalina a partir de ratolins *Cre:ER+/-;Pten^{fl/fl}* de 12 setmanes injectats (TAM) o no (NO TAM)

amb tamoxifè per induir la supressió de Pten (4 setmanes). **(C)** Imatges representatives de immunohistoquímica per PTEN i Smad2/3 en seccions de teixit endometrial inclòs en parafina a partir de dos carcinomes endometrials humans de grau III. Anàlisi de la correlació dels valors d'expressió de PTEN i expressió Smad2/3 al nucli. "n<c" indica més expressió al citosol que al nucli, "n = c" indica expressió per igual en citosol que en nucli i "n > c" indica una expressió més alta al nucli que al citoplasma (gràfic inferior). L'expressió mitjana de PTEN també es mostra amb una línia. Les barres verticals representen un error estàndard. El diagrama evidencia una reducció de l'expressió de PTEN quan l'expressió d' Smad2/3 al nucli és més alta que en el citoplasma ($p = 0,02$) en $n = 37$ CEE de grau III (imatges i ampliacions de 20x).

LA LOCALITZACIÓ NUCLEAR D' SMAD3 BLOQUEJA LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR EN CÈL·LULES DEFICIENTS PER PTEN

Evidències recents suggereixen que la senyalització del TGF- β limita la tumorigènesi causada per la deficiència de Pten (Bjerke et al. 2014; Ding et al. 2011). Per tant, vam investigar si la translocació nuclear d' Smad2/3 causada per la pèrdua de Pten provocava l'activació o inhibició de les funcions supressores tumorals del TGF- β . Per avaluar aquesta hipòtesi, vam analitzar els efectes de la *down*-regulació d' Smad3 en cèl·lules endometrials deficients de Pten. Per aquest objectiu, cultius glandulars Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} van ser infectats amb lentivirus que contenen l' shRNA Smad3.2 i després tractats o no amb tamoxifè per induir l' excisió de Pten. En aquestes condicions, vam avaluar l' impacte de la *down*-regulació d' Smad3 en la incorporació de BrdU, l' expressió de l' mRNA de ciclina D1, la mida glandular i les respostes pro- apoptòtiques al TGF- β . La davallada d' Smad3 en les cèl·lules deficients en Pten (Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractat amb tamoxifè) va provocar un augment addicional de l' expressió de la incorporació de BrdU (Figura 47 A) i de la ciclina D1 (Figura 47 B), que va resultar en un augment del perímetre glandular (Figura 47 C i D). Per investigar més profundament els efectes de l' ablació de Pten sobre els gens diana de la via TGF- β /Smad3, vàrem mesurar l' expressió d' alguns gens regulats directament pel TGF- β com ho són Smad7, PAI-1, Id1, c-myc i ciclina D1 en cultius 3D deficients en Pten infectats o no amb l' shRNA d' Smad3. L' expressió de l' mRNA d' Smad7, PAI-1, Id1 i ciclina D1 es va veure incrementada significativament en els cultius 3D deficients en Pten. Tanmateix, en els cultius 3D deficients en Pten i amb baixa expressió d' Smad3, s' hi va observar un augment addicional de l' expressió d' Id1, c-Myc i ciclina D1 (Figura 48). Aquests resultats suggereixen que la

Resultats

presència d' Smad3 al nucli frena l' expressió d' aquests gens. Per contra, la deficiència d' Smad3 va provocar una reducció de l' expressió de l' mRNA d' Smad7 (Figura 48).

Els nostres resultats han demostrat que la deficiència de Pten o la deficiència d' Smad3 provoca el bloqueig de l' apoptosi induïda per TGF- β . Tanmateix, també hem observat que els cultius glandulars amb doble deficiència (Pten i Smad3) són també completament resistents a l' apoptosi induïda pel TGF- β (Figura 47 E). En conseqüència, l' augment de l' expressió de BIM causada pel TGF- β en cèl·lules de tipus salvatge va ser suprimida en les cèl·lules que presentaven una doble deficiència, per Pten i Smad3 (Figura 47 F). Aquests resultats reforcen la funció supressora tumoral de la localització nuclear d' Smad3 causada per la manca de Pten.

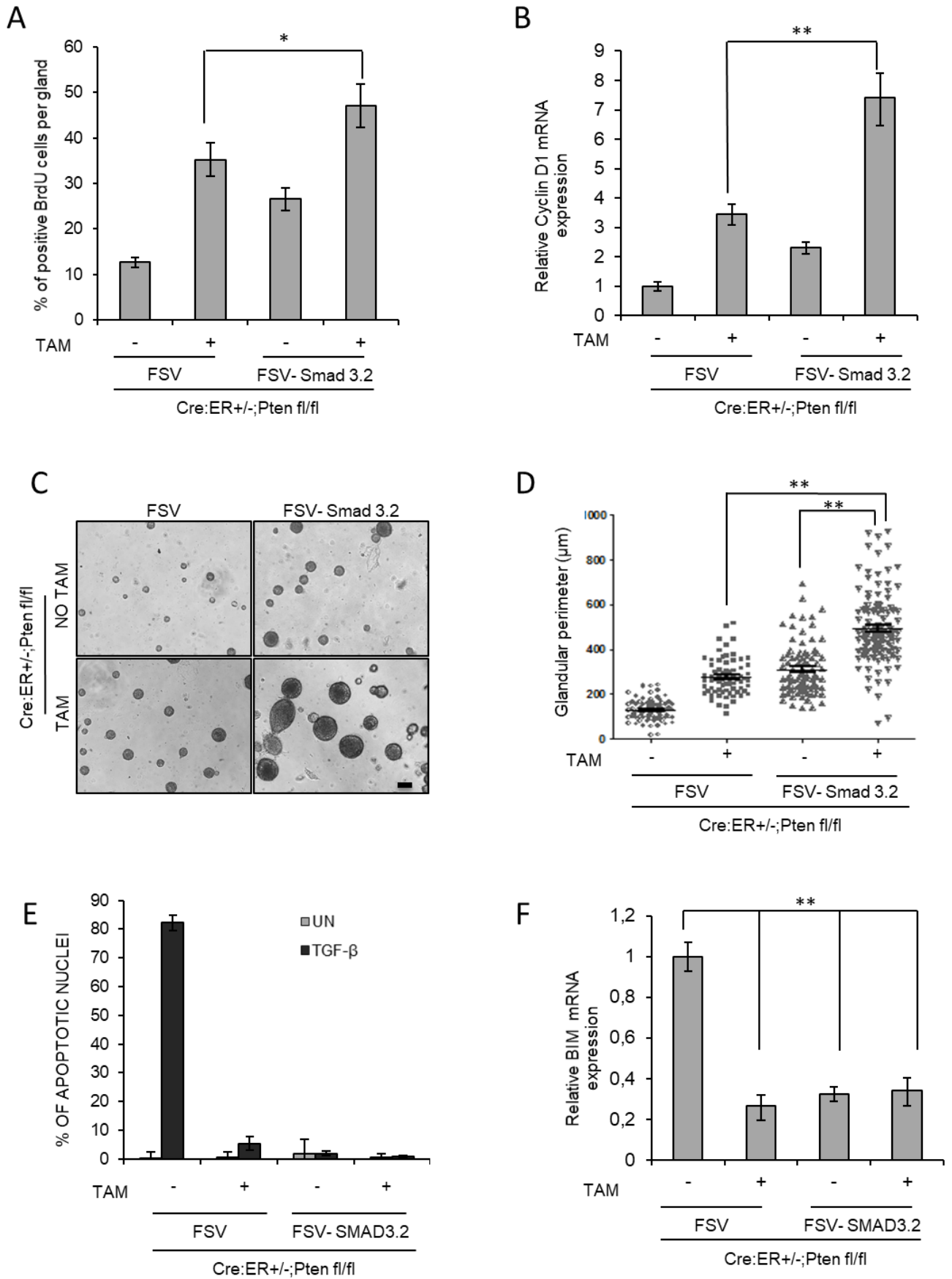


Figura 47. La localització nuclear d' Smad3 contraresta la proliferació cel·lular causada per la deficiència de Pten. (A) Quantificació del nombre de cèl·lules BrdU positives en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus contenint l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.2). Els valors són mitjanes i les barres d'error representen mitjana \pm s.e.m * P <0,05 per l' anàlisi de test t. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb n =200-300 cèl·lules comptades per condició). **(B)** Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de l' mRNA de ciclina D1 en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus amb l' shRNA de Smad3 (FSV-Smad3.2). Les dades són de n =3 rèpliques experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són mitjanes \pm s.e.m. **P <0,01 per test t. **(C)** Imatges representatives de contrast de fases i **(D)** mesures perimetrals de glàndules de cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus portadors de l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.2). Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m. ** P <0,01 per l' anàlisi t-test. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb n =150 glàndules mesurades per condició). Barres d'escala: 25 μ m. **(E)** Quantificació dels nuclis positius per a la tinció de caspasa-3 escindida en cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus amb l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.2) i després tractats amb 10 ng/ml de TGF- β durant 36 hores. Les dades són de n =3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents, cadascun compost per n =180-200 cèl·lules per condició). **(F)** Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de l' mRNA BIM de cultius 3D Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl} tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus amb l' shRNA d' Smad3 (FSV-Smad3.2). Les dades són de n =3 repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són les mitjanes \pm s.e.m. * P <0,05, ANOVA bidireccional seguit de la prova de comparació post hoc de Bonferroni.

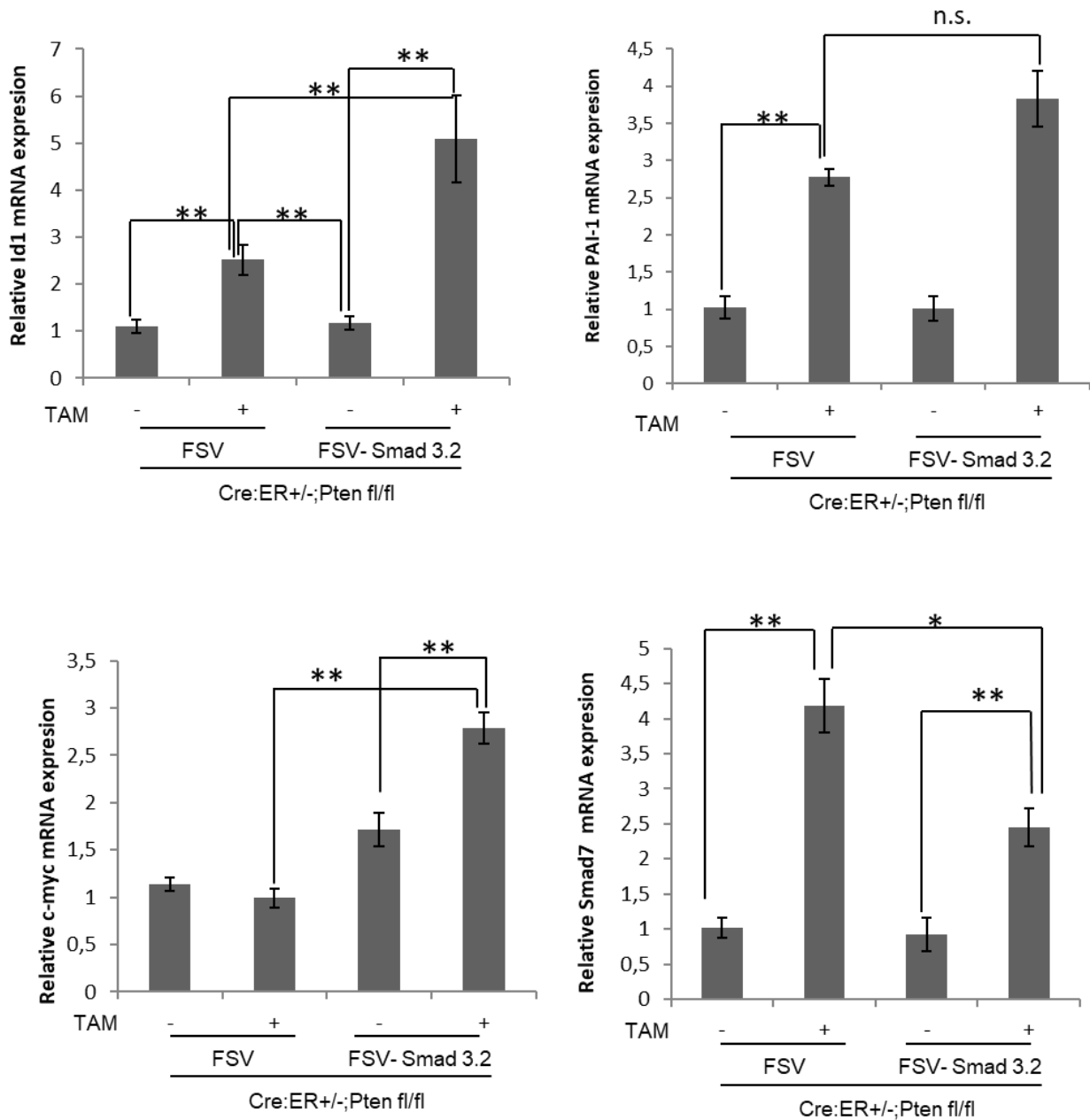


Figura 48. Anàlisi d' RT-qPCR de l'expressió de l' mRNA d' *Id-1*, *PAI-1*, *c-myc* i *Smad7* de cultius 3D *Cre:ER^{+/-}Pten^{fl/fl}* tractats (+) o no (-) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus control (VSV) o lentivirus portant l' shRNA d' *Smad3* (FSV-Smad3.2). Les dades són de $n = 3$ repeticions experimentals (preparacions d' RNA independents) i els valors són les mitjanes \pm s.e.m. * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$. Es va realitzar un ANOVA bidireccional seguit del test de comparació post hoc de Bonferroni.

L' ACTIVACIÓ DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ PI3K/AKT/MTOR PROVOCA LA LOCALITZACIÓ NUCLEAR D' SMAD2/3 DESPRÉS DE LA SUPRESSIÓ DE PTEN

A continuació, vam investigar el mecanisme molecular pel qual la deficiència de Pten podia causar la translocació nuclear constitutiva d' Smad3. Actualment, la regulació de l' activitat i de la localització d' Smad3 a través de la via de senyalització PI3K/Akt no s' entén completament, tot i això, s' han postulat diversos mecanismes regulatoris que podrien explicar la interacció entre ambdues vies (Guo and Wang 2009; L. Zhang, Zhou, and ten Dijke 2013). Entre els quals s' ha descobert recentment que la senyalització d' Akt pot promoure la localització dels T β Rs a la superfície de la membrana cel·lular, resultant en un augment de la senyalització autocrina del TGF- β i, per tant, en un augment de la translocació nuclear d' Smad3 (Budi, Muthusamy, and Derynck 2015). Per provar si aquest mecanisme pot explicar la localització nuclear constitutiva d' Smad2/3 posterior a l' ablació de Pten, vam analitzar la localització d' Smad2/3 per immunofluorescència en cultius 3D salvatges per Pten i deficients en Pten; ambdós tractats amb l' inhibidor dels T β Rs, l' SB431542. L' addició d' SB431542 no va poder restaurar la localització citosòlica d' Smad2/3 en les cèl·lules deficients per Pten (Figura 49 A), el que suggereix que, en el nostre sistema, l' activació dels T β Rs no participa en la translocació d' Smad3 després de la supressió de Pten. Aquests resultats es van confirmar a partir de l' anàlisi per CHIP de la unió d' Smad2/3 al promotor de Pten. L' addició d' SB431542 va bloquejar completament la unió d' Smad2/3 induïda per TGF- β al promotor de Pten, però no va poder revertir la unió constitutiva d' Smad2/3 al promotor de Pten en cèl·lules deficients en Pten (Figura 49 B).

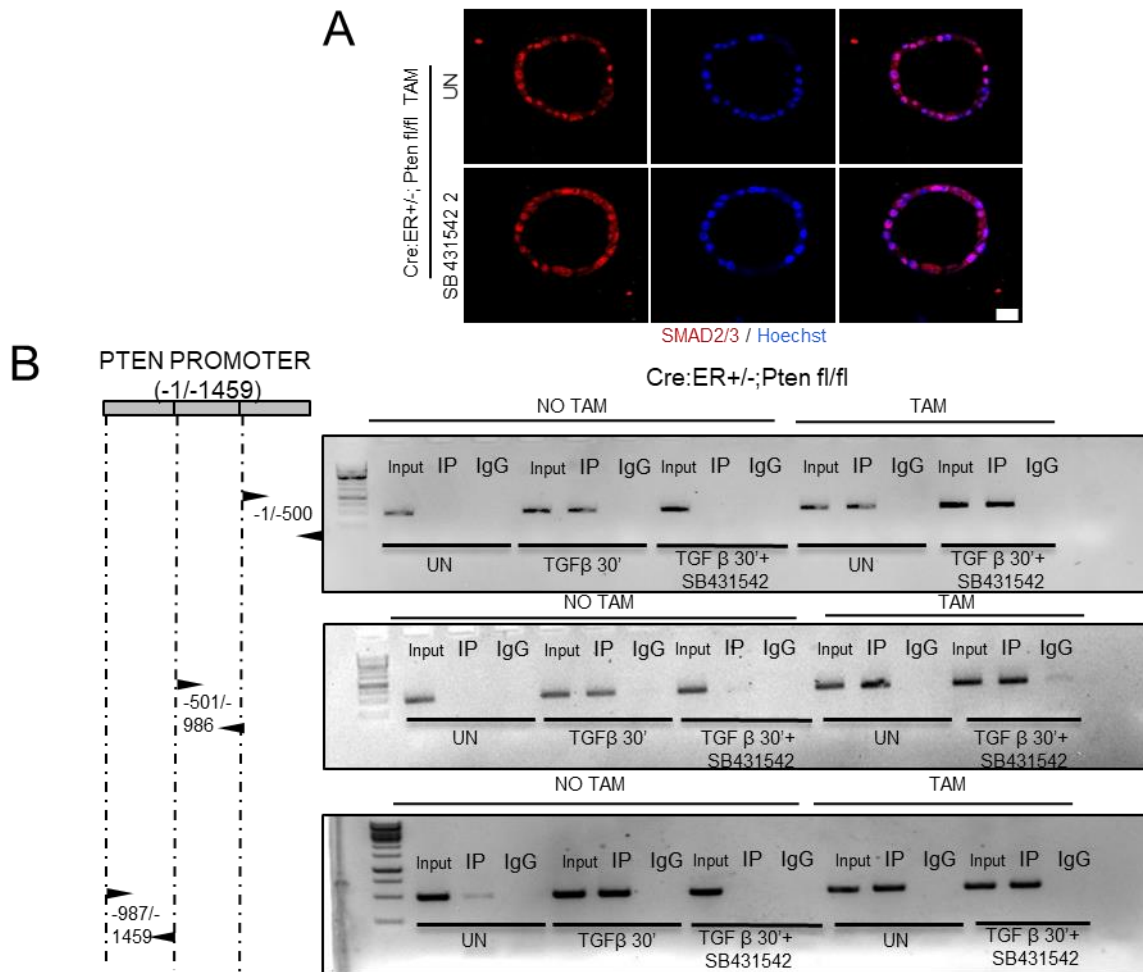


Figura 49. La localització nuclear d' Smad2/3 post-pèrdua de Pten, no és deguda a una senyalització autocrina de la via TGF- β . (A) Immunofluorescència per Smad2/3 en cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} incubats amb tamoxifè (TAM) per induir la supressió de Pten i tractats amb SB431542 o sense tractar (UN). Els cultius 3D es van tenyir amb Hoechst per mostrar els nuclis. Barres d'escala: 25 μ m. Les dades són de n =3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). (B) ChIP de la unió d' Smad2/3 al promotor de Pten. Els cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten, van ser pretractats o no, durant 2 hores amb SB431542 i després es van estimular durant 30 minuts amb TGF- β . Els lisats cel·lulars dels cultius 3D no tractats (UN) o tractats amb TGF- β van ser sotmesos a immunoprecipitació (IP) amb l' anticòs Smad2/3 o anticòs de control (IgG). Els immunoprecipitats van ser analitzats per PCR convencional usant primers per amplificar tres segments consecutius de ~ 500 pb del promotor de Pten (-1/-500, -501/-986, -987/-1459).

A més, l' anàlisi dels T β RI i T β RII a les seccions uterines a partir de ratolins Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} injectats amb tamoxifè no va revelar diferències en el seu patró d' expressió entre el teixit salvatge per Pten i el teixit deficient en Pten *in vivo* (Figura 50 A). Seguint amb el mateix propòsit, l' anàlisi d' immunofluorescència de l' expressió dels T β RI i T β RII als cultius 3D de ratolins Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats o no amb tamoxifè per induir la deleció de Pten, no va mostrar diferències en els seus patrons d' expressió (Figura 50 B).

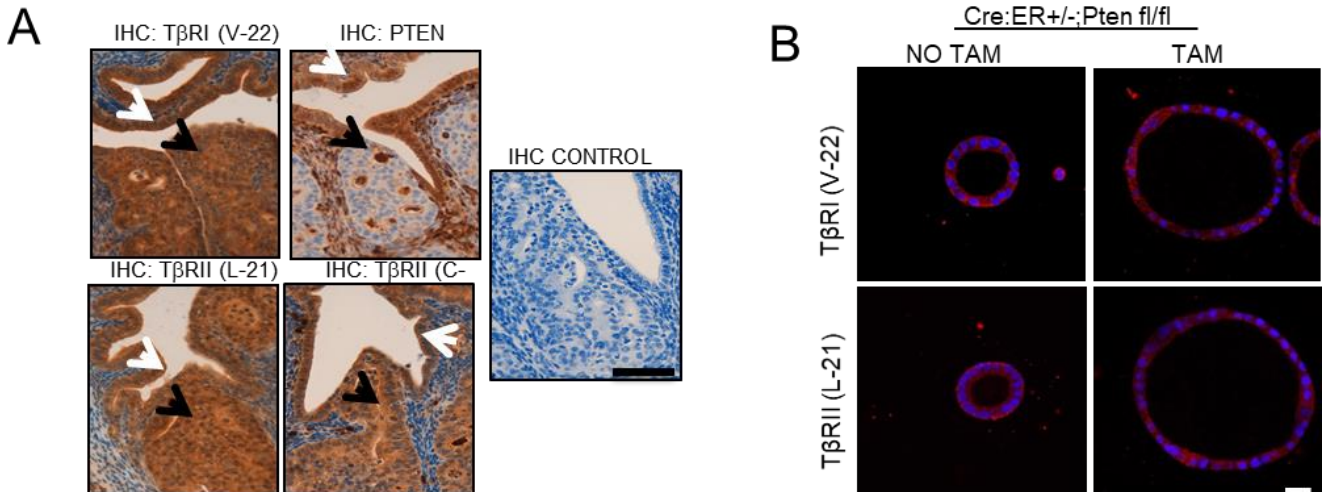


Figura 50. La pèrdua de Pten no causa diferències d' expressió en T β RI i T β RII. (A) Immunohistoquímica de T β RI (anticòs V-22) i T β RII (dos anticòssos diferents L-21 i C-16), de PTEN i un control negatiu sobre seccions seriades de teixit endometrial obtinguts a partir de la injecció de tamoxifè a ratolins Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} de 12 setmanes d'edat per induir la supressió de Pten. Es van sacrificar els ratolins 4 setmanes després de la injecció de tamoxifè. Les fletxes negres indiquen les glàndules deficientes per PTEN. Les fletxes blanques indiquen la glàndula positiva per PTEN. (ampliacions a 40x; n = 0 ratolins Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl}-TAM). Barra d'escala: 100 μ M. **(B)** Anàlisi per immunofluorescència del T β RI (anticòs V-22) i del T β RII (anticòs L-21) sobre cultius 3D Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten. Els cultius 3D es van contratenyir amb Hoechst per evidenciar els nuclis. Barres d'escala: 25 μ m. Les dades són de n = 3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents).

Per aprofundir en la connexió molecular entre l'eliminació de Pten i la translocació d' Smad2/3, es va disseccionar la via de senyalització PI3K/Akt. En primer lloc, per abordar directament si la deficiència en Pten era la responsable de la translocació constitutiva d' Smad2/3 al nucli, es va restaurar l'expressió de Pten en cultius 3D Pten *knock-out*. Amb aquesta finalitat, els cultius deficients per Pten van ser infectats amb lentivirus que codificaven pel cDNA de PTEN. L'expressió exògena de PTEN va provocar un augment de la localització d' Smad2/3 al citoplasma (Figura 51 A). A continuació, per demostrar que la translocació nuclear d' Smad2/3 era causada per una hiperactivitat de la via PI3K/Akt en les cèl·lules deficients en Pten, els cultius 3D es van tractar amb TGF- β més l'inhibidor de la PI3K LY294002 i la localització d' Smad2/3 es va avaluar per immunofluorescència. En cultius 3D de tipus salvatge (Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} sense tractament amb tamoxifè), el TGF- β va induir una ràpida translocació d' Smad2/3 però, curiosament, aquesta translocació no va ser inhibida per l'addició de l' LY294002. Aquests resultats suggereixen que la translocació d' Smad2/3 induïda per TGF- β a les cèl·lules amb deficiència per Pten era independent de l'activitat de la PI3K (Figura 51 B). Per contra, els cultius 3D de cèl·lules Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats amb tamoxifè varen mostrar tincions d' Smad2/3 nuclears, però, en aquest cas, la inhibició de la via PI3K/Akt per l' LY294002 va restaurar la localització citosòlica d' Smad2/3 (Figura 51 B i C). Cal destacar que el LY294002 no va tenir cap efecte sobre la translocació nuclear d' Smad2/3 en cèl·lules deficients en Pten estimulades amb TGF- β , per tant, sembla que la translocació nuclear d' Smad2/3 induïda per la manca de Pten i la translocació nuclear d' Smad2/3 induïda per TGF- β es donen per dos sistemes diferents. Aquests resultats suggereixen que la translocació nuclear d' Smad2/3 causada per la supressió de Pten depèn de l'activitat de la PI3K.

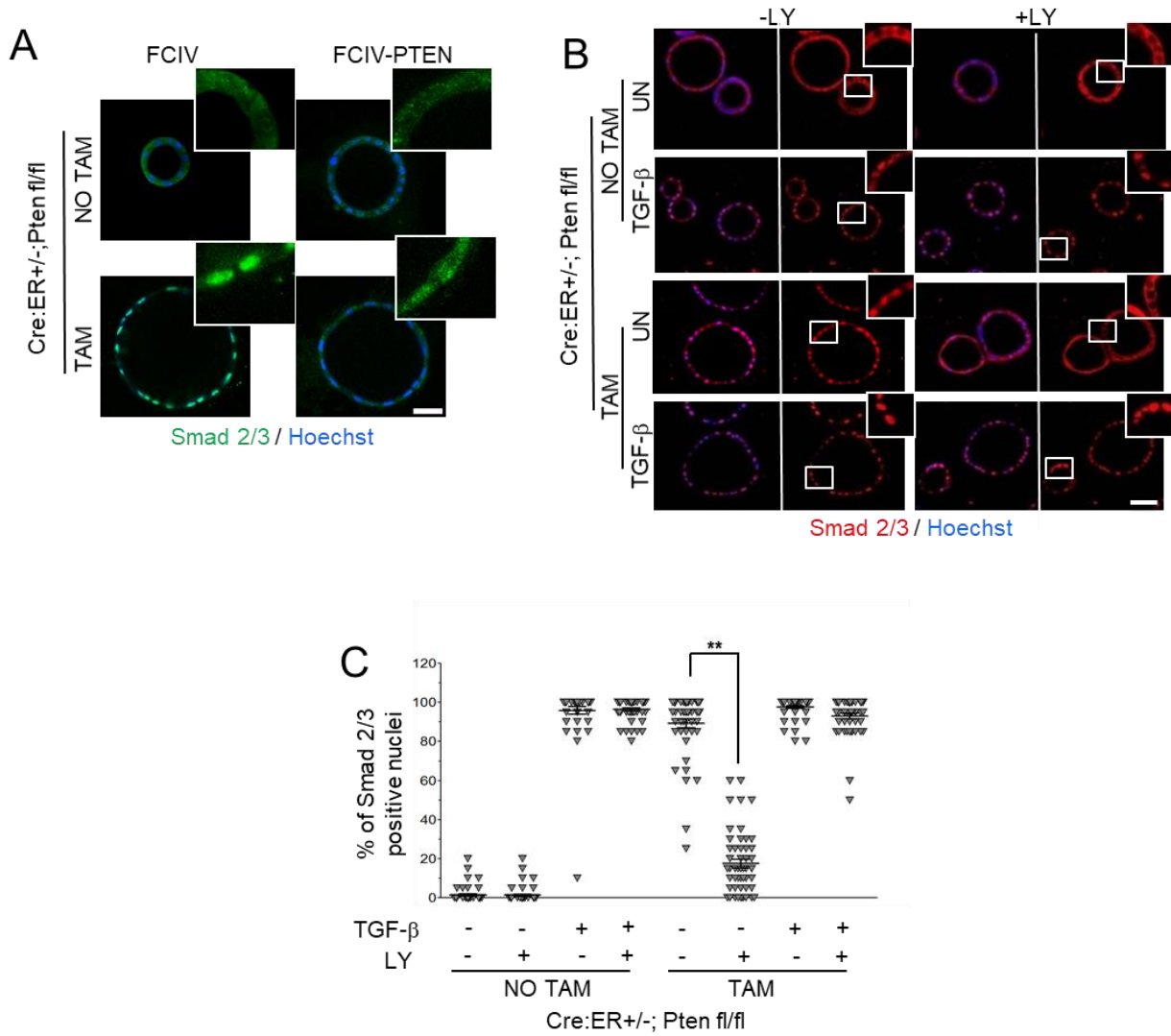


Figura 51. La inhibició de PI3K/AKT/mTORC1 restaura la localització citosòlica d' Smad2/3. (A) Imatges representatives d' immunofluorescència d' Smad2/3 de cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus portant el cDNA de Pten (FCIV-PTEN) o un vector buit (FCIV). Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Les dades són de n = 3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25µm. **(B)** Imatges representatives de la immunofluorescència d' Smad2/3 en cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (+ LY) o no (-LY) amb LY294002 i estimulats o no (UN) amb TGF-β amb a 10 ng/ml durant 30 minuts. Les imatges ampliades mostren la localització cel·lular d' Smad2/3. Dades de n = 3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25µm. **(C)** Quantificació dels nuclis que mostren un localització nuclear d' Smad2/3 en les condicions representades a (B). Els experiments es van realitzar tres cops de forma independent (cadascun amb n = 30 cèl·lules totals per glàndula comptades per condició).

A més, a part de l' Akt, la PI3K activa altres quinases (Bayascas 2008). Per demostrar que l' Akt era la quinasa responsable de la localització nuclear d' Smad2/3, vam infectar cultius 3D amb lentivirus que contenen una forma constitutivament activa d' Akt (CA-Akt) i vam analitzar la localització cel·lular d' Smad2/3 per immunofluorescència. L' expressió de CA-Akt va provocar un augment notable de les cèl·lules que presentaven localització nuclear d' Smad2/3 (Figura 52 A), el que suggereix que l' activitat de l' Akt té un paper fonamental en la regulació de la localització de les proteïnes Smad2/3.

Una vegada l' Akt és activada, és capaç de fosforilar molts altres substrats situats en esglaons inferiors de la via de senyalització (Manning and Cantley 2007), entre ells, mTOR complex1 (mTORC1). mTORC1 és un dels substrats d' Akt (Dibble and Cantley 2015) que s' ha demostrat que juguen un paper fonamental en el desenvolupament i progressió de tumors endometrials deficients en Pten. Per aquest motiu, ens vam preguntar si mTORC1 podia ser l' objectiu molecular de l' Akt que controlés la localització nuclear d' Smad2/3. Per abordar aquesta hipòtesi, es van tractar cultius 3D deficients en Pten amb dos inhibidors de mTOR: Rapamicina i Everolimus i es va analitzar la localització subcel·lular d' Smad2/3. La immunofluorescència per Smad2/3 va revelar que els dos inhibidors restauraren completament la localització citosòlica d' Smad2/3 en cultius 3D deficients en Pten (Figura 52 B). A més, els dos inhibidors també van impedir la translocació nuclear d' Smad2/3 en cultius 3D infectats amb CA-Akt (Figura 52 C). Per tant, aquests resultats suggereixen que mTORC1 és l' efector *downstream* d' Akt en el nostre sistema d' estudi.

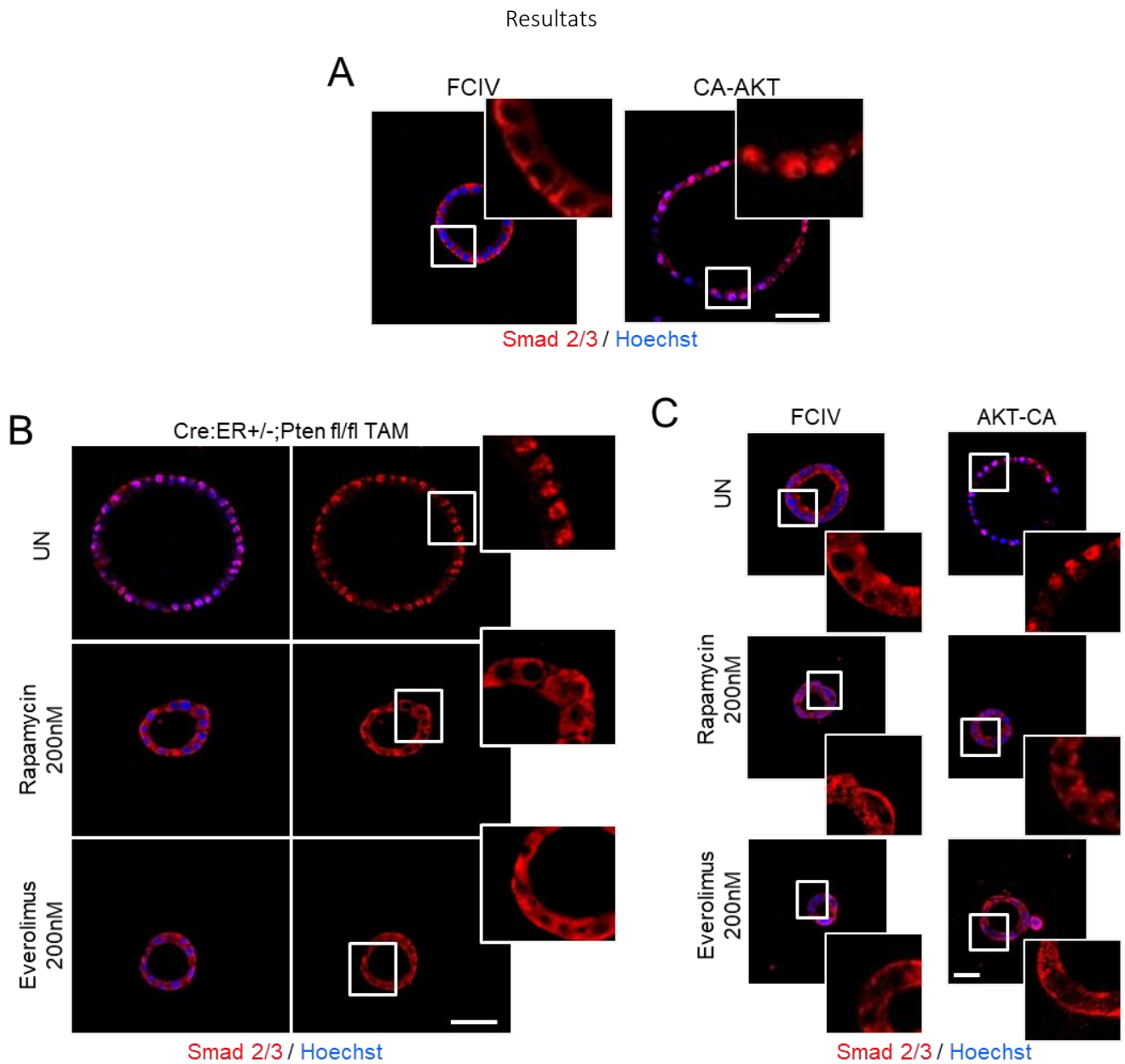


Figura 52. *L' axis PI3K/AKT/mTORC1 regula la localització cel·lular d' Smad2/3.* (A) Imatges representatives d' immunofluorescència per a Smad2/3 en cultius 3D infectats amb lentivirus que contenen un plasmidi que codifica per la proteïna Akt constitutivament activa (CA-AKT) o be contenen un plasmidi control (FCIV). Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Barra d'escala: 50 μ m. (B) Imatges representatives d'immunofluorescència contra Smad2/3 en cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i tractats amb 200nM de Rapamicina o Everolimus o sense tractar (UN). Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Barra d'escala: 50 μ m. (C) Imatges representatives d'una immunofluorescència per Smad2/3 en cultius 3D infectats amb lentivirus que contenen un plasmidi que codifica per l' Akt constitutivament activa (CA-AKT) o be per un plasmidi control (FCIV) i tractats amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus o sense tractar (UN). Els nuclis es van evidenciar amb tincions de Hoechst. Barra d'escala: 50 μ m.

LA INHIBICIÓ DE LA SENYALITZACIÓ PER PI3K/AKT/MTORC1 DISMINUEIX LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR I RESTAURA L' APOPTOSI INDUÏDA PEL TGF- β EN CÈL·LULES DEFICIENTS PER PTEN

Un cop demostrat que l' axis PI3K/AKT/mTORC1 proporciona un vincle de mecanicisme entre la deficiència per Pten i la localització subcel·lular d' Smad2/3, vam estudiar si l' híper-activitat de la via PI3K/AKT/mTORC1 és també la responsable de l' augment de la taxa de proliferació cel·lular i de la supressió de l' apoptosi induïda per TGF- β en les cèl·lules deficientes per Pten. Per a dur a terme aquest propòsit, els cultius 3D deficientes en Pten es van infectar amb lentivirus que contenien el cDNA de Pten per tal de restablir l' expressió de Pten i disminuir l' activació d' Akt. Un cop restablerta la correcta senyalització de la via PI3K/Akt, vam tractar els cultius amb TGF- β per a observar si recuperaven la mort apoptòtica com en les cèl·lules salvatges. Tal i com s' observa a la figura 53 A, les cèl·lules que sobre-expressaven el Pten exogen van mostrar un augment significatiu de l' activació de la caspasa-3 activa així com de l' apoptosi després del tractament amb TGF- β . A més, la sobre-expressió de Pten va provocar una disminució esperada de la fosforilació de l' Akt (Figura 53 A). Per a provar el paper de l' activació de la via PI3K/Akt en l' obstrucció de l' apoptosi induïda pel tractament amb TGF- β , es van tractar cultius 3D deficientes en Pten amb TGF- β més LY294002. La inhibició de la PI3K per part de l' LY294002 va ser capaç de restaurar la sensibilitat a la mort apoptòtica produïda per la senyal del TGF- β (Figura 53 B). La qual cosa suggereix que la inhibició de la via PI3K/Akt és un factor clau en la mort induïda pel TGF- β .

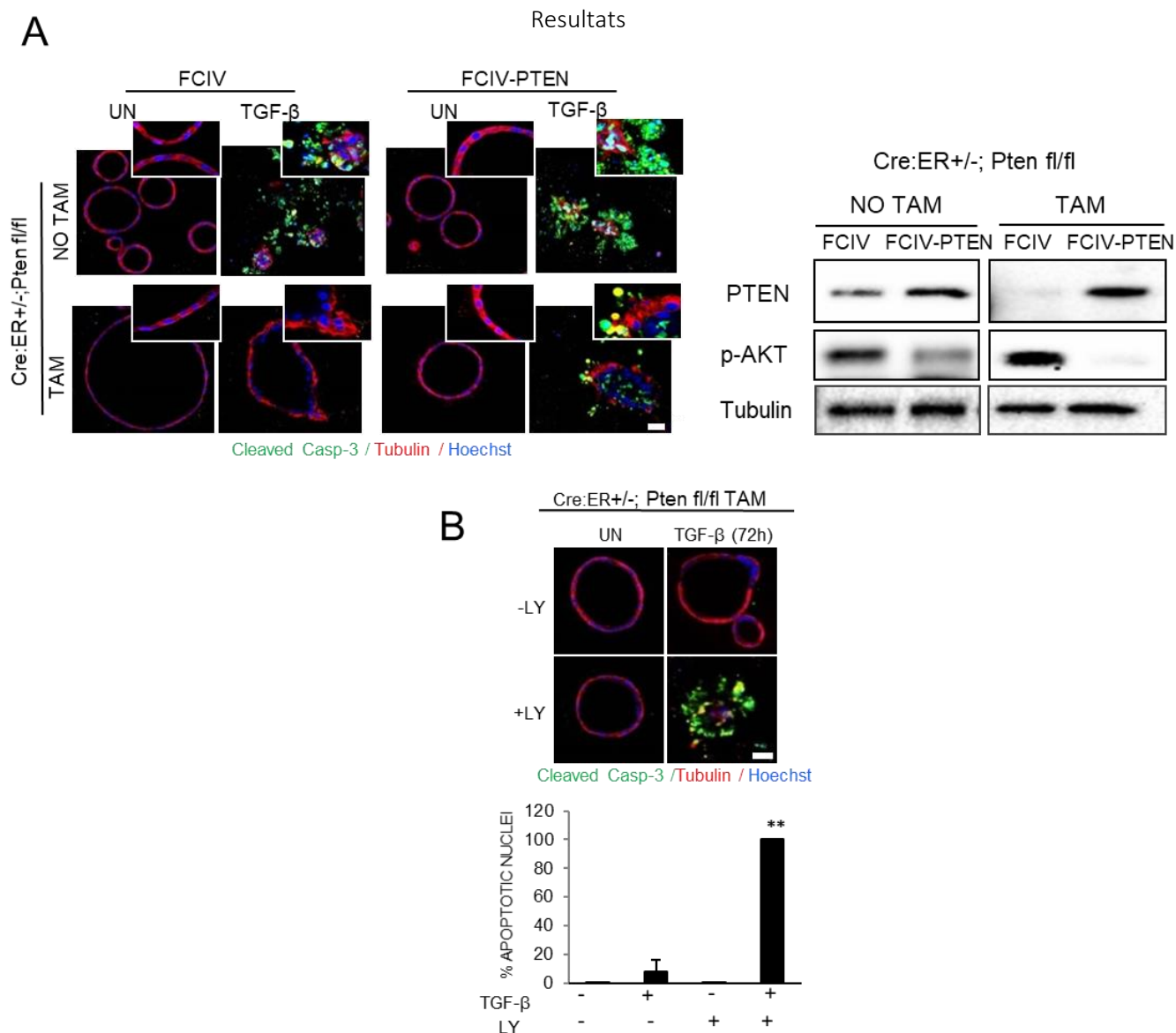


Figura 53. La inhibició de PI3K/AKT/mTORC1 restaura l'apoptosi induïda pel TGF- β . (A) Esquerra, imatges representatives d'immunofluorescència contra caspasa-3 activa en cultius 3D Cre:ER^{+/-} Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten, infectats amb lentivirus que contenen l'ADN de PTEN (FCIV-PTEN) o be el vector buit (FCIV) i tractats o no (UN) amb TGF- β a 10 ng/ml durant 30 minuts. Les imatges ampliades demostren la mort cel·lular apoptòtica. Els cultius 3D també s'han blotat amb tubulina i Hoechst per mostrar la morfologia de l'estructura glandular i els nuclis apoptòtics. Les dades són de n =3 rèpliques experimentals (cultius 3D independents). Barres d'escala: 25 μ m. Dreta, anàlisi Western blot de p-Akt i PTEN de cultius 3D Cre:ER^{+/-} Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i infectats amb lentivirus que contenen el cDNA de Pten (FCIV-PTEN) o el vector buit (FCIV). Es mostra una imatge representativa de n =3 rèpliques biològiques.

(B) *Panell superior, imatges representatives de la tinció de caspasa-3 activa, tubulina i coloració de Hoechst de cultius 3D Cre:ER^{+/+}-Pten^{fl/fl} exposats al tamoxifè i tractats amb TGF- β amb 10 ng/ml durant 72 hores, en presència (+ LY) o absència (-LY) de LY294002. Panell inferior, quantificació dels nuclis que mostren immunofluorescència positiva per a caspasa-3 escindida. Barres d'escala: 25 μ m. Les dades que es mostren corresponen a tres experiments independents (cadascun amb n =150 cèl·lules comptades per condició). Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. ** P \leq 0,01 (ANOVA unidireccional més la prova de comparació múltiple Tukey).*

De forma coherent amb els nostres resultat anteriors, es va veure que la inhibició de la PI3K també provocava una reducció significativa del perímetre glandular de les cèl·lules deficientes en Pten (Figura 54 A). De tal manera que, seguidament, es va analitzar el paper de mTORC1 en la transducció de senyals de proliferació i supervivència degudes a l' activació de la via de senyalització PI3K/Akt. La inhibició de mTORC1 per la Rapamicina o l' Everolimus va causar una marcada disminució del perímetre glandular en les glàndules deficientes en Pten i també en les glàndules infectades amb CA-Akt (Figura 54 B). A més a més, tant l' Everolimus com la Rapamicina van causar una marcada reducció de les cèl·lules positives per a la BrdU en les glàndules deficientes per a Pten i també en les glàndules infectades amb CA-Akt (Figura 54 C).

És important destacar que tant l' Everolimus com també la Rapamicina van restaurar l' apoptosi induïda per TGF- β en les cèl·lules deficientes per Pten (Figura 54 D). Tots aquests resultats donen suport a la hipòtesi que el mTORC1 és l' efector molecular de la translocació nuclear d' Smad2/3 en les cèl·lules deficientes en Pten.

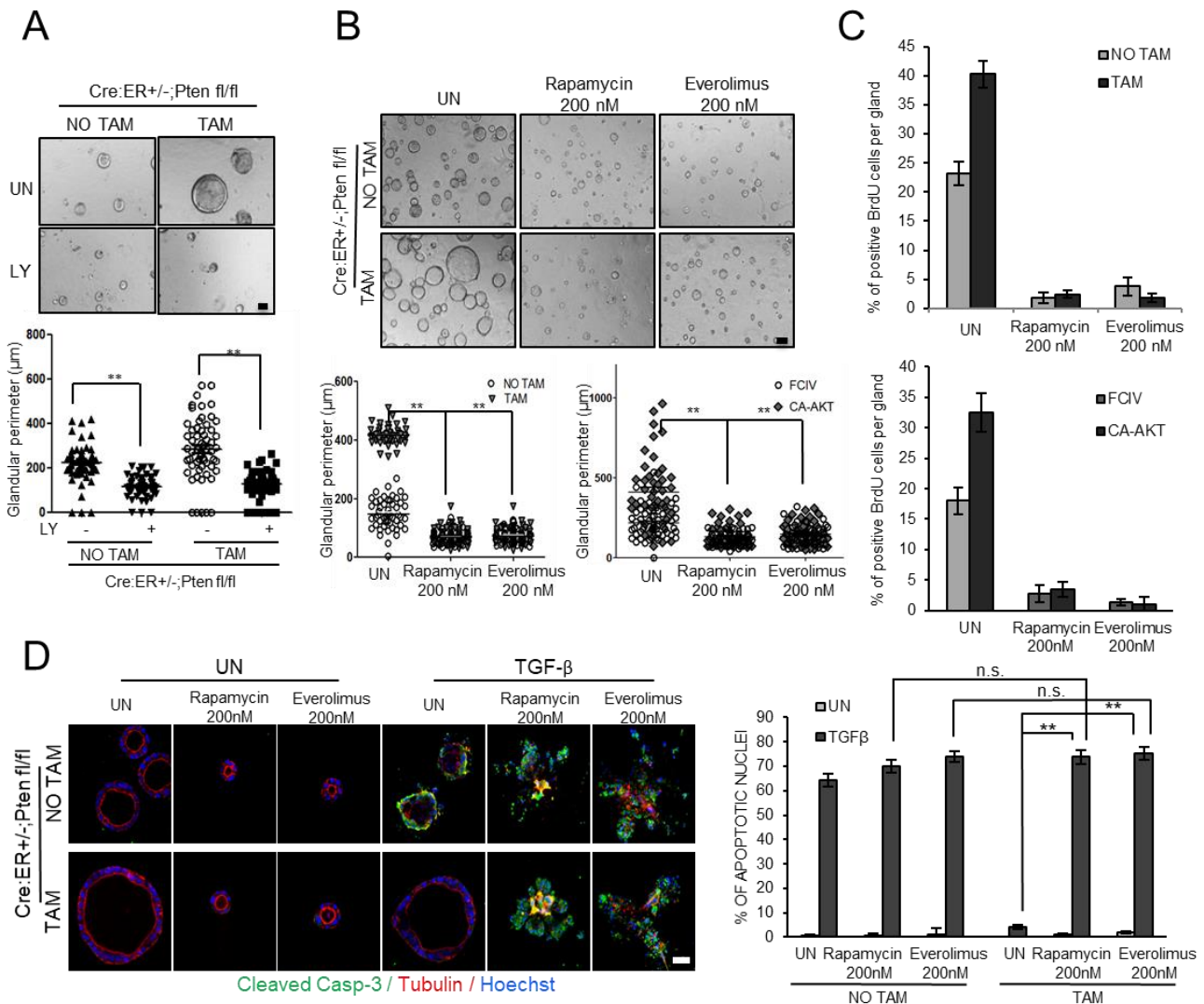


Figura 54. La inhibició de PI3K/AKT/mTORC1 redueix la proliferació i restaura l'apoptosi induïda pel TGF-β. (A) Imatges representatives de contrast de fases i mesures del perímetre glandular de cultius en 3D a partir d'animals Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè per induir la supressió de Pten en combinació amb (+LY) o sense (-LY) LY294002. Tots els experiments es van realitzar com a mínim 3 vegades. Les barres d'errors representen la mitjana ± s.e.m.. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. n.s. no-significatiu; ** P <0,01 per anàlisi t-test. Barres d'escala: 50µm. (B) Panell superior, imatges representatives de contrast de fases de cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i tractats amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus o sense tractar (UN). A la part inferior esquerra, mesura del perímetre glandular de cultius 3D Cre:ER^{+/-};Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i després amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus o no tractats (UN). A la part inferior dreta, mesura del perímetre glandular de cultius 3D infectats amb lentivirus que contenen un plasmidi que codifica per una forma constitutivament activa de l' Akt (CA-AKT) o be lentivirus que contenen un plasmidi control (FCIV) i tractats amb 200nM de

Resultats

Rapamicina, o Everolimus o sense tractar (UN). Tots els experiments es van realitzar almenys tres vegades (cadascun amb $n = 80$ glàndules comptades per condició). Les barres d' error representen la mitjana \pm s.e.m.. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives entre les condicions. n.s. no-significatiu; ** $P < 0,01$ per un ANOVA unidireccional seguit de la prova de comparació múltiple de Turkey. Barres d'escala: $50\mu\text{m}$. Barra d'escala: $100\mu\text{m}$. **(C)** Panell superior, quantificació de les cèl·lules positives per BrdU en cultius 3D Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i després amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus o no tractats (UN). Gràfic inferior, quantificació de les cèl·lules positives per BrdU procedents de cultius 3D infectats amb lentivirus que conté un plasmidi que codifica per una forma constitutivament activa d' Akt (CA-AKT) o be lentivirus que contenen un plasmidi control (FCIV) i tractat amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus o sense tractar (UN). Els valors són les mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m. ** $<P < 0,01$ per a un ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb $n = 200-300$ cèl·lules comptades per condició). **(D)** Imatges representatives i quantificació de cèl·lules positives per la tinció de caspasa-3 activa a partir de cultius 3D Cre:ER^{+/+}Pten^{fl/fl} tractats (TAM) o no (NO TAM) amb tamoxifè i després amb 200nM de Rapamicina, o Everolimus sols o en combinació amb 10 ng/ml de TGF- β durant 36 hores. Els cultius es van immunoblotar també amb tubulina per a mostrar estructures glandulars. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Les dades provenen de $n = 3$ rèpliques experimentals (cultius 3D independents, cadascun amb $n = 180-200$ cèl·lules per condició) i els valors són les mitjanes \pm s.e.m. ** $P < 0,01$, per a una anàlisi ANOVA bidireccional, seguit del test de Bonferroni.

3. ESTUDI DELS EFECTES DE LA POLARITAT CEL·LULAR SOBRE LA SENYALITZACIÓ PEL TGF- β I EL SEU PAPER EN LA CARCINOGENÈSIS ENDOMETRIAL

LA PÈRDUA DE POLARITAT CEL·LULAR CANVIA L' EFECTE PRO-APOPTÒTIC DEL TGF- β PER UN EFECTE INDUCTOR D' EMT

Resultats previs del nostre laboratori han demostrat que el TGF- β desencadena l' apoptosi en cèl·lules epitelials endometrials polaritzades de ratolí, donant suport a una funció supressora de tumors per a TGF- β en teixit endometrial. No obstant això, el TGF- β pot canviar de supressor tumoral a promotor durant la progressió del càncer. Atès a que la pèrdua d' adhesió i polaritat cel·lular és un dels trets característics de la transformació maligna, vam intentar investigar el paper i les característiques de l' adhesió i de la polaritat en les respostes cel·lulars induïdes pel tractament amb TGF- β . Amb aquesta finalitat, es van comparar els efectes del TGF- β en cèl·lules epitelials d' endometri cultivades en condicions 2D, sense la presència de matriu extracel·lular i, per tant, mal polaritzades; enfront dels seus efectes en el model de cultiu 3D correctament polaritzat i estructurat (Núria Eritja, Dolcet, and Matias-Guiu 2013). Com s' ha descrit anteriorment, l' addició de TGF- β a cultius 3D provoca una ràpida mort per apoptosi en aquestes cèl·lules epitelials. Sorprenentment, en cultius 2D, les cèl·lules són totalment resistents a l' apoptosi induïda pel TGF- β (Figura 55 A). Curiosament, després de 72 hores d' exposició al TGF- β , vam observar que les cèl·lules en condicions 2D canviaven la seva morfologia típica epitelial per una típicament mesenquimal (Figura 55 A), el que suggereix que les cèl·lules estaven en procés d' EMT. Per a demostrar aquesta hipòtesi, vam realitzar una anàlisi d' immunofluorescència dels marcadors d' EMT a les cèl·lules epitelials tractades amb TGF- β . El tractament amb TGF- β va causar una marcada pèrdua de marcadors epitelials com l' E-cadherina o la Citoqueratina i va augmentar l' expressió de marcadors mesenquimals com la Vimentina (Figura 55 B). Aquests resultats van ser confirmats també per l' anàlisi de *Western blot* (Figura 55 C). Tal i com s' ha descrit, un altre segell distintiu de l' EMT és la disminució de la proliferació cel·lular. Per tant, es va estudiar si el TGF- β provocava una disminució en la taxa de proliferació. Per aquest motiu es va analitzar la incorporació de BrdU en cèl·lules epitelials d' endometri en condicions 2D tractades amb TGF- β . El tractament amb TGF- β va resultar en una marcada disminució de les cèl·lules que incorporaven la BrdU (Figura 55 D). En consonància

Resultats

amb aquests resultats, el TGF- β també va causar una disminució significativa de l'expressió de la ciclina D1 en aquests mateixos cultius 2D (Figura 55 C). Suggestint que la pèrdua de polaritat cel·lular causada per l'absència de matriu extracel·lular no només suprimeix els efectes pro-apoptòtics del TGF- β , sinó que també permet l'activació de les funcions pro-tumorals del TGF- β com ho és la inducció d'EMT.

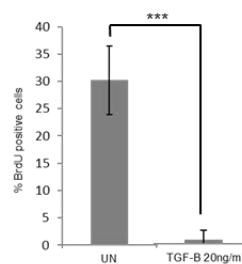
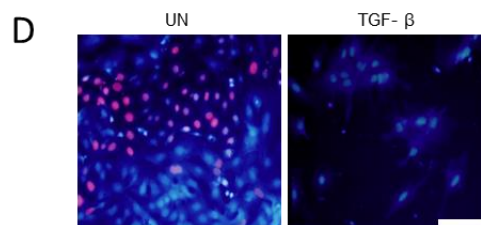
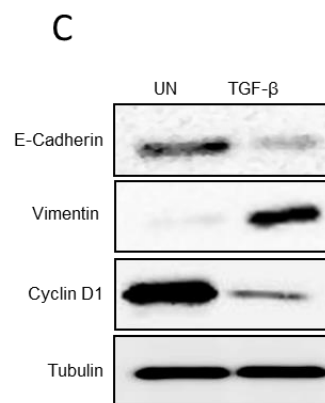
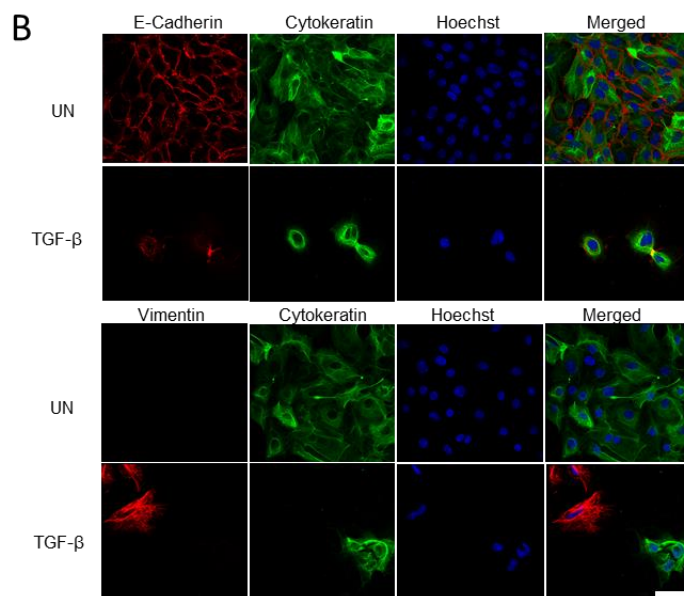
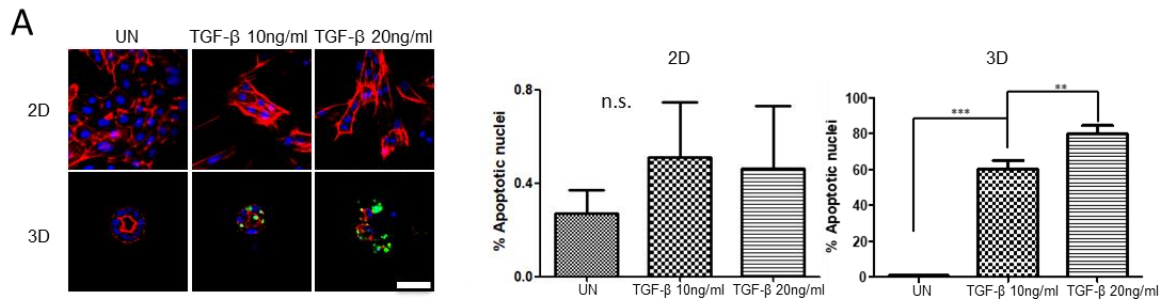


Figura 55. El tractament amb TGF- β indueix EMT en cultius bidimensionals. (A) (Esquerra) Imatges representatives d'immunofluorescència per a vimentina (vermell) i caspasa-3 activa (verd) en cultius 3D i 2D tractats a (10 i 20) ng/ml de TGF- β durant 72h. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per a mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals (cultius independents). Barres d' escala 25 μ m. (Dreta) Quantificació dels nuclis que mostren morfologia apoptòtica en cultius 2D (gràfic esquerra) i cultius 3D (gràfic dreta) sota l'estímul del TGF- β a (10 i 20) ng/ml durant 72h de tractament. Els valors són les mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m * P <0,05; **P <0,01 per a un ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Les dades corresponen a tres experiments independents cadascun amb n =200-300 cèl·lules comptades per condició. **(B)** Imatges representatives d'immunofluorescència per a E-Cadherina, Vimentina, Citoqueratina de cultius bidimensionals tractats a 20ng/ml de TGF- β durant 72h. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals (cultius independents). Barres d' escala 25 μ m. **(C)** Anàlisis per Western Blot d' E-Cadherina, Vimentina i Ciclina D1 a partir de lisats 2D tractats amb 20ng/ml de TGF- β durant 72h. Es mostra una imatge representativa de n=3 rèpliques biològiques. La membrana es va immunoblottar per la tubulina per a mostrar una càrrega igual entre condicions experimentals. **(D)** Panell superior, imatges representatives d'immunofluorescència per BrdU de cultius bidimensionals sense tractament i tractats amb 20ng/ml de TGF- β durant 72h. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals. Barres d' escala 25 μ m. Gràfic inferior, quantificació de nuclis amb incorporació de BrdU en cultius 2D tractats o no (UN) amb 20ng/ml de TGF- β durant 72h. Els valors són les mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m. ** <P <0,01 per a un ANOVA unidireccional, seguit del test de comparació múltiple de Tukey. Les dades es mostren per a tres experiments independents (cadascun amb n =200-300 cèl·lules comptades per condició).

LA PÈRDUA DE LA POLARITAT CEL·LULAR CAUSADA PER LA FALTA DE MATRIU EXTRACEL·LULAR ACTIVA LES VIES DE SENYALITZACIÓ PI3K/AKT I ERK/MAPKS

En aquest treball també es demostra que la pèrdua de Pten i el posterior increment de l'activitat PI3K/Akt es tradueix en un bloqueig complet de l'apoptosi induïda pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials polaritzades. Per altra banda, resultats d'un altre estudi realitzat en el nostre laboratori van demostrar que la via ERK/MAPK pot tenir un paper important en la regulació de l'EMT en les cèl·lules de càncer d'endometri. Aquestes evidències, ens van fer pensar que la manca de polaritat cel·lular en cultius 2D podria causar alteracions tant en la via de senyalització PI3K/Akt com en la via ERK/MAPK. Per provar aquesta hipòtesi, es va realitzar una anàlisi de *Western blot* de la fosforilació Akt en lisats obtinguts de cultius 2D o 3D. Tal i com s'observa en la figura 56 A, La fosforilació d'Akt es va veure marcadament reduïda en cèl·lules epitelials polaritzades crescudes en condicions 3D en comparació amb les cèl·lules en condicions 2D. Aquest resultat suggereix que la presència de Matrigel[®], que permet l'establiment de la polaritat cel·lular en cultius 3D, pot estar implicada en el control de la fosforilació de l'Akt. Per respondre a aquesta pregunta, es van establir cultius en condicions 2D i es van estimular amb un percentatge creixent de Matrigel[®] diluït en el medi de cultiu. L'anàlisi de *Western blot* va revelar que el Matrigel[®] és capaç de provocar una reducció de la fosforilació d'Akt d'una forma dosi dependent i també és capaç d'inhibir la fosforilació d'altres proteïnes en esglavons més baixos de la via de senyalització com ara la S6K (Figura 56 B). Per tant, aquests resultats impliquen que la polaritat cel·lular i/o la presència de Matrigel[®] és capaç de *down*-regular l'activació de la via PI3K/Akt.

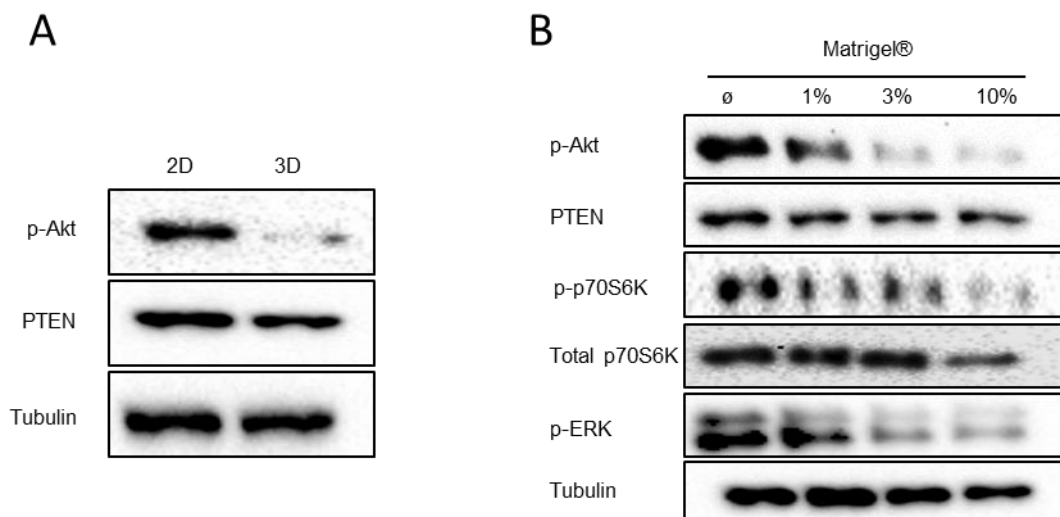
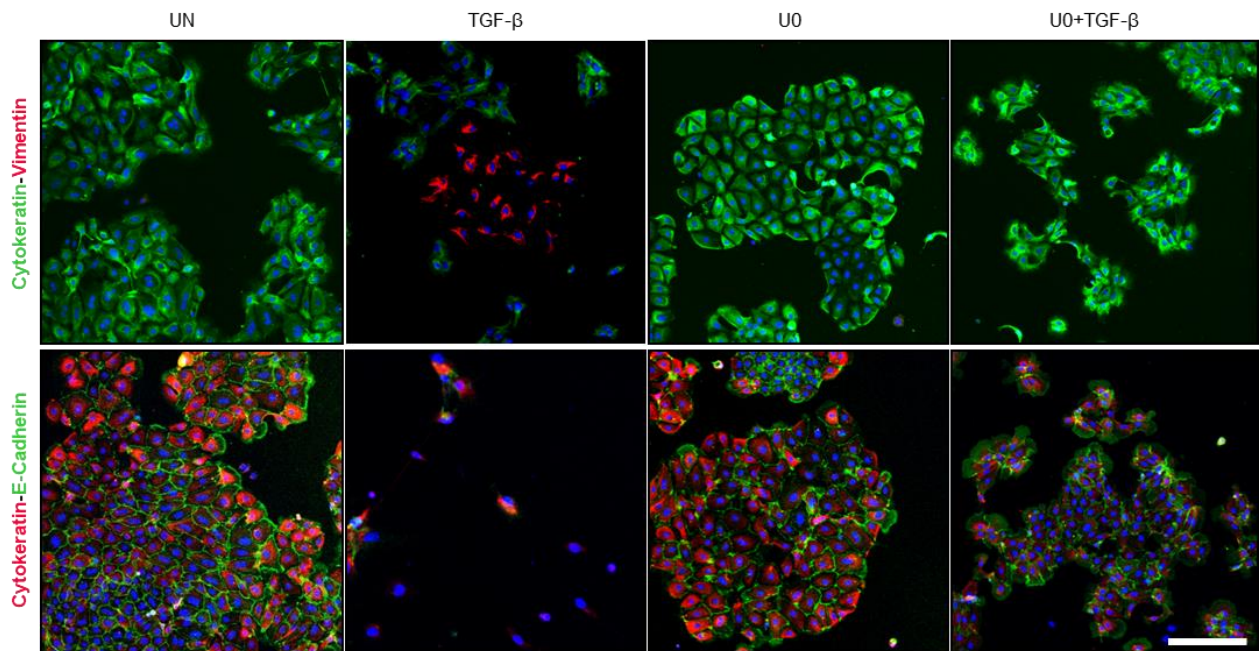


Figura 56. El Matrigel® provoca una disminució de l'activació de la via PI3K/Akt. (A) Anàlisi per Western Blot de p-Akt i PTEN en cultius 2D i 3D. Es mostra una imatge representativa de n=3 rèpliques biològiques. La membrana es va immunoblottar per la tubulina per a mostrar una càrrega igual entre condicions experimentals. **(B)** Anàlisi per Western Blot de p-Akt, PTEN, p-p70S6K, p70S6K i p-ERK en cultius 2D sense Matrigel®, 1%, 3% i 10% de Matrigel®. Es mostra una imatge representativa de n=3 rèpliques biològiques. La membrana es va immunoblottar per la tubulina per a mostrar una càrrega igual entre condicions experimentals.

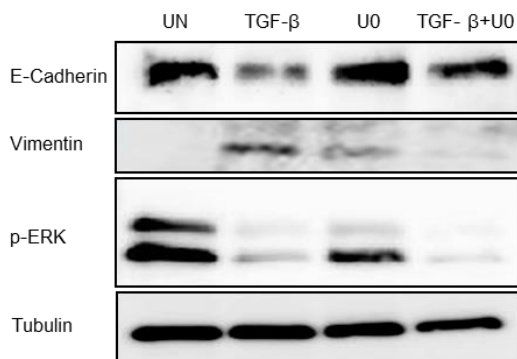
EL TGF- β PROVOCA EMT EN CÈL·LULES EPITELIALS NO POLARITZADES A TRAVÉS D' UN MECANISME ERK-DEPENDENT

Els resultats anteriors on s'observa una disminució proteica de p-ERK suggereixen que la via ERK/MAPK pot jugar un paper important en la regulació de l'EMT en les cèl·lules de càncer d'endometri. Aquestes evidències ens van conduir a analitzar el paper de les ERK/MAPK en l'EMT induïda pel TGF- β . Per abordar aquest repte, les cèl·lules endometrials van ser plantades en condicions de 2D en presència de TGF- β més l'inhibidor de MEK U0126 i es va realitzar un estudi per immunofluorescència de la Citoqueratina, de la Vimentina i de l'E-cadherina (Figura 57 A). L'addició d'U0126 va restablir l'expressió de l'E-cadherina i de la Citoqueratina, tot inhibint l'expressió de la Vimentina, que es veu induïda pel tractament amb TGF- β . Es van obtenir resultats similars mitjançant l'anàlisi de transferència *Western blot* (Figura 57 B). En conjunt, aquests resultats demostren que l'EMT provocada pel TGF- β requereix de l'activació de la senyalització de la via ERK/MAPK. Tot i que el procés d'EMT es va bloquejar de manera eficient per l'U0126, no es va observar un augment de la mort cel·lular per apoptosi (Figura 57 C). Aquests resultats suggereixen que el TGF- β regula l'apoptosi, el procés d'EMT i la supervivència cel·lular mitjançant diferents mecanismes moleculars.

A



B



C

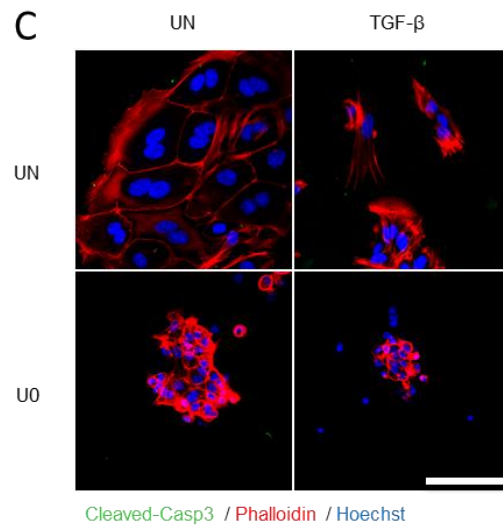


Figura 57. L' U0126 inhibeix l' EMT induïda pel TGF-β. (A) Imatges representatives d' immunofluorescència per a vimentina (vermell) i citoqueratina (verd) panell superior i citoqueratina (vermell) i E-cadherina (verd) panell inferior; en cultius 2D tractats a 20 ng/ml de TGF-β i/o amb 10μM d' U0126 durant 72h. Els nuclis es van contrastar amb Hoechst. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals (cultius independents). Barres d' escala 25μm. (B) Anàlisi per Wester Blot de E-cadherina, vimentina i p-ERK en cultius 2D sense tractar (UN), tractats amb TGF-β, U0126 o doble tractament. Es mostra una imatge representativa de n=3 rèpliques biològiques. La membrana es va immunoblotar per la tubulina per a mostrar una càrrega igual entre condicions experimentals. (C) Imatges representatives d'

immunofluorescència per a fal·loïdina (vermell) i caspasa-3 activa (verd) en cultius 2D tractats a 20ng/ml de TGF- β i/o 10 μ M d' U0126 durant 72h. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per a mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals (cultius independents). Barres d' escala 25 μ m.

LA INHIBICIÓ DE LA PI3K RESTAURA L' APOPTOSIS INDUÏDA PEL TGF-B EN CÈL·LULES EPITELIALS ENDOMETRIALS NO POLARITZADES EN ABCÈNCIA DE MATRIU EXTRACEL·LULAR

Ja que la via PI3K/Akt està més activa en els cultius bidimensionals que en els 3D es va estudiar si aquesta és la via de senyalització que concedeix resistència a l' apoptosi induïda pel TGF- β en cèl·lules no polaritzades. Com s' ha esmentat anteriorment, els nostres estudis mostren que un augment de l' activitat PI3K/Akt provoca un bloqueig complet de l' apoptosi induïda per TGF- β en les cèl·lules epitelials endometrials polaritzades. Seguint amb aquests resultats i després d' haver demostrat que la via de senyalització ERK/MAPK no està involucrada en la regulació de l' apoptosi causada pel tractament amb TGF- β , ens vam preguntar si la reducció de la fosforilació de l' Akt causada per Matrigel® era important per a sensibilitzar les cèl·lules epitelials d' endometri a l' apoptosi provocada pel TGF- β . Per respondre a aquesta pregunta, es van establir cultius de cèl·lules endometrials en condicions 2D i es van incubar amb TGF- β més LY294002 (inhibidor de PI3K) i es va quantificar el nombre de cèl·lules apoptòtiques. L' addició de LY294002 va restaurar la sensibilitat de les cèl·lules epitelials d' endometri als efectes pro-apoptòtics del TGF- β (Figura 58 A). Per tal de comprovar que l' LY294002 bloquejava eficientment la via PI3K, es va realitzar una anàlisi de *Western blot* per avaluar els nivells de fosforilació d' Akt en lisats paral·lels (Figura 58 B). Aquests resultats suggereixen que un bloqueig de la via PI3K/Akt condueix a una resposta apoptòtica sota el tractament amb TGF- β també en condicions 2D i que realment aquesta híper-activació de la via en condicions 2D és la responsable de la resistència a la mort apoptòtica sota l' estímul de TGF- β en aquestes condicions.

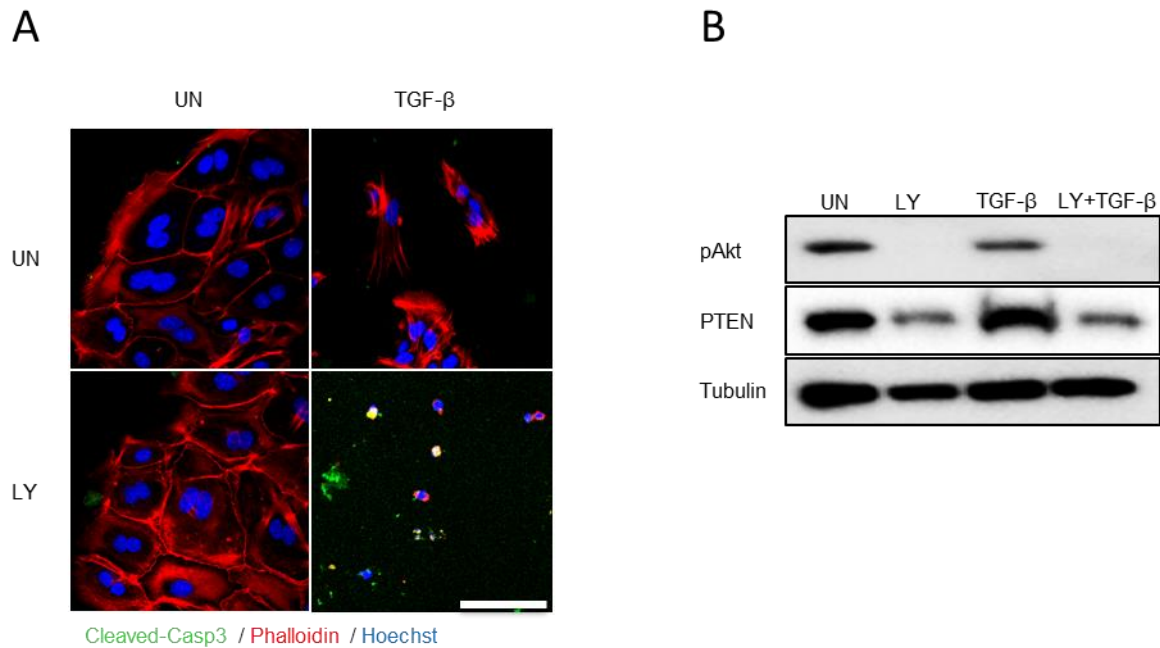


Figura 58. El bloqueig de la via PI3K/Akt restaura l'apoptosis induïda pel TGF- β en cultius 2D. **(A)** Imatges representatives d'immunofluorescència per a vimentina (vermell) i caspasa-3 activa (verd) en cultius 2D tractats a 20 ng/ml de TGF- β i/o amb 10 μ M de LY durant 72h. Els nuclis es van contratenyir amb Hoechst per a mostrar la morfologia nuclear apoptòtica. Les dades són de n=3 rèpliques experimentals (cultius independents). Barres d'escala 25 μ m. **(B)** Anàlisi per Wester Blot de p-Akt i PTEN en cultius 2D sense tractar (UN), tractats amb TGF- β , LY o doble tractament. Es mostra una imatge representativa de n=3 rèpliques biològiques. La membrana es va immunoblottar per la tubulina per a mostrar una càrrega igual entre condicions experimentals.

DISCUSSIÓ

1. L' APOTOSI INDUIDA PEL TGF- β EN L' ENDOMETRI DEPÈN DE L' ACTIVITAT DE LA VIA PI3K/AKT

El TGF- β és una citocina pleiotròpica que regula una infinitat de funcions cel·lulars. Durant l'última dècada han anat sorgint cada vegada més evidències que donen suport a una funció context cel·lular-específica per al TGF- β . Se sap, que durant la carcinogènesi, el TGF- β pot tenir una funció dicotòmica: per una banda pot actuar com un supressor tumoral en cèl·lules normals o pre-malignes, per altra banda, però, és un potent promotor tumoral en etapes avançades (Pardali and Moustakas 2007a). Aquest paper paradoxal de TGF- β segueix sent poc entès. En els teixits epitelials, la funció com a supressor tumoral del TGF- β depèn de la seva capacitat per a induir apoptosi o per a frenar creixement cel·lular (Massagué et al. 2008). En aquesta tesi, s' ha identificat un nou bucle regulador entre la senyalització TGF- β /Smad3 i la via PI3K/Akt que regula la proliferació i la mort cel·lular apoptòtica desencadenada pel TGF- β i, per tant, les seves funcions com a supressor tumoral en les cèl·lules epitelials de l' endometri. Alhora, aquest mecanisme pot tenir un paper fonamental durant la carcinogènesi d' endometri.

El TGF- β és important per a la regulació del desenvolupament i la funció endometrial (Godkin and Doré 1998). Hem vist que el TGF- β només s' expressa en cèl·lules estromals, mentre que els T β RI i T β RII s' expressen en compartiments estromals i epitelials. Aquest patró d' expressió suggereix que el TGF- β que es produeix en les cèl·lules estromals podria actuar de forma paracrina sobre les cèl·lules epitelials per a regular les seves funcions. Utilitzant un sistema de cultius 3D que recapitula l' organització estructural nativa de les glàndules epitelials de l' endometri, s' ha demostrat que el tractament amb TGF- β induïx apoptosi en les cèl·lules endometrials normals polaritzades. Els mecanismes moleculars pels quals el TGF- β desencadena aquesta apoptosi encara no es comprenen completament (Pardali and Moustakas 2007b; P. M. Siegel and Massagué 2003). Estudis previs han demostrat que la sobre-regulació de les proteïnes *BH3-only* és important per a l' apoptosi induïda pel TGF- β (Ramesh, Wildey, and Howe 2009; Ramjaun et al. 2007). Entre ells, es va descriure que la regulació de BIM era essencial per l' apoptosi causada pel TGF- β en altres tipus cel·lulars (Ramesh et al. 2008; Wiener et al. 2014; Wildey, Patil, and Howe 2003). En aquest sentit, s' ha demostrat que el TGF- β induïx l' expressió de les proteïnes *BH3-only* BIM, NOXA i BMF d' una manera dependent d' Smad3. És important destacar que el bloqueig de l' apoptosi induïda per TGF- β causat per l' ablació d' Smad3 o Pten es correlaciona amb la inhibició de la sobre-regulació de BIM per part del TGF- β .

Tots aquests resultats suggereixen un paper cabdal de les proteïnes *BH3-only* en la regulació de la senyalització pro-apoptòtica del TGF- β en les cèl·lules epitelials de l' endometri. Val la pena esmentar que, tot i que s' ha proposat aquesta funció proapoptòtica del TGF- β per a altres tipus cel·lulars, fins al moment, mai no s' ha descrit la seva capacitat per provocar apoptosi en cèl·lules epitelials endometrials normals. Estudis previs han suggerit que alteracions en la senyalització del TGF- β poden participar en la progressió del càncer d' endometri (Parekh et al. 2002). En aquest sentit, s' ha vist que la senyalització del TGF- β està interrompuda en la carcinogènesi endometrial (Piestrzeniewicz-Ulanska et al. 2004) i, la baixa regulació de la senyalització per TGF- β s' ha associat a un mal pronòstic en càncer d' endometri (Mhawech-Fauceglia et al. 2011). A més, en la carcinogènesi endometrial precoç, la senyalització disminuïda del TGF- β s' ha associat amb una pèrdua d' inhibició del creixement (Parekh et al. 2002). En canvi, en línies cel·lulars de càncer d' endometri, el TGF- β promou l' EMT i augmenta la invasivitat (Muínelo-Romay et al. 2011). A més a més, treballs molt recents han demostrat que l' ablació del T β RI o ALK5 juntament amb la deficiència de Pten condueixen al desenvolupament de carcinomes endometrials invasius, demostrant un cop més que la senyalització pel TGF- β és un potent supressor tumoral en l' endometri (Gao et al. 2017).

Mecanísticament, hem demostrat que les funcions com a supressor tumoral de la senyalització TGF- β /Smad3 estan mitjançades a través de la regulació de la senyalització de la via PI3K/Akt. La via de senyalització PI3K/Akt és una de les anomenades vies de senyalització non-Smad que poden activar-se directament a través del receptor del TGF- β (Y. E. Zhang 2009a). A més a més, s' ha descrit que l' activació de la via PI3K/Akt per TGF- β és capaç de regular la translocació nuclear d' Smad3 (Y. E. Zhang 2009b). Els nostres resultats han demostrat que el TGF- β indueix la translocació nuclear d' Smad2/3, però, en aquest cas, aquesta translocació és independent de la senyalització de PI3K/Akt ja que tractant els cultius amb l' inhibidor de la PI3K, el LY294002, no s' aconsegueix inhibir la translocació d' aquestes Smads a nucli quan són cotractades amb TGF- β . Un cop al nucli, Smad2/3 s' uneix al promotor de Pten i estimula la seva transcripció, cosa que resulta en una inhibició de la senyalització de la via PI3K/Akt. A nivell funcional, la inhibició de la via PI3K/Akt a través de la senyalització TGF- β /Smad provoca una mort cel·lular apoptòtica. La regulació dependent d' Smad3 de la via PI3K/Akt i el seu paper en la transducció dels efectes supressors de la senyalització per TGF- β està fortament recolzada pels resultats obtinguts a partir de cèl·lules deficientes per Smad3. La pèrdua d' Smad3 provoca una reducció de la transcripció de Pten, la qual cosa condueix a l' activació de la via de senyalització PI3K/Akt de forma constitutiva, el que resulta en un augment de la proliferació i de la resistència cel·lular a l' apoptosi induïda pel TGF- β . Per tant, sembla que la manca d' Smad3 protegeix a les cèl·lules

epitelials d' endometri polaritzades de la inhibició de la via PI3K/Akt per part del TGF- β i d' aquesta manera, també de la mort apoptòtica que el TGF- β els causa.

2. INTERACCIÓ DE LA VIA DEL TGF- β I LA VIA PI3K/AKT EN LA CARCINOGENÈSIS ENDOMETRIAL

Fins ara, no hi havia evidències d' una regulació de l' expressió de Pten depenent d' Smad3 com a mecanisme supressor de tumors per a cèl·lules normals. La via de senyalització PI3K/Akt juga un paper fonamental en la regulació de l' homeòstasi de l' endometri. Les perturbacions d' aquesta via de senyalització són les alteracions moleculars més freqüents en el càncer d' endometri (Yeramian et al. 2013). L' activació de la via PI3K/Akt condueix a un augment de la supervivència i de la proliferació cel·lular i, per tant, pot anul·lar els efectes citostàtics o proapoptòtics senyalitzats pel TGF- β . Tot i que s' han descrit diferents mecanismes d' interferència entre la senyalització PI3K/Akt i TGF- β /Smad (Conery et al. 2004; Ding et al. 2011; Remy, Montmarquette, and Michnick 2004; Seoane et al. 2004), els resultats presentats en aquesta tesi descobreixen un nou model mecanístic que explica l' antagonisme funcional entre aquestes dues vies. En aquest sentit, s' ha demostrat que la pèrdua de Pten provoca l' activació de la senyalització de la via PI3K/Akt tot augmentant la proliferació cel·lular i reduint l' apoptosi induïda pel TGF- β i, per tant, part de les funcions supressores del TGF- β . Segons els resultats presentats, és fàcil especular que la pèrdua d' aquesta funció supressora de tumors pot ser un dels mecanismes cel·lulars que contribueixen al desenvolupament d' una hiperplàsia i posteriorment a un carcinoma endometrial en ratolins deficients en Pten. Finalment, es proporcionen evidències *in vitro* i *in vivo* en que l' ablació genètica de Pten provoca una translocació nuclear d' Smad2/3. A diferència de la translocació nuclear d' Smad2/3 induïda pel TGF- β , la seva localització nuclear en cèl·lules deficients en Pten depèn de la via de senyalització PI3K/Akt. És important destacar que l' anàlisi dels carcinomes endometrials humans va revelar una correlació inversa significativa entre l' expressió de PTEN i la tinció nuclear d' Smad2/3, reforçant encara més la hipòtesi que l' expressió de PTEN regula la localització d' Smad2/3. Com ja s' ha esmentat anteriorment, la translocació nuclear d' Smad3 provocada pel TGF- β té una important funció supressora tumoral. Per tant, és sorprenent que la deficiència de Pten, que condueix a una major proliferació i a una inhibició de l' apoptosi induïda per TGF- β , pugui provocar la translocació nuclear d' Smad3. Aquesta observació planteja la següent pregunta: la translocació nuclear d' Smad3 posterior a la supressió de Pten, és un mecanisme supressor

tumoral o es tracta d' un mecanisme de progressió tumoral? D' una banda, els resultats demostren que la pèrdua de Pten provoca l' activació de la senyalització PI3K/Akt que desencadena en una localització nuclear constitutiva d' Smad3. Quan Smad3 es troba en el nucli (sota aquest context) s' uneix al promotor de Pten activant-ne la seva transcripció. Òbviament, en les cèl·lules deficientes per Pten, Smad3 ja no és capaç d' augmentar l' expressió de Pten, la qual cosa comporta una major activitat de la via de senyalització PI3K/Akt, que, per la seva banda, augmenta la proliferació cel·lular i impedeix la mort induïda pel TGF- β en aquestes cèl·lules. Aquests resultats suggereixen que Pten i les Smad2/3 comparteixen un únic eix de senyalització i estableixen un bucle supressor tumoral que controla l' apoptosi induïda pel TGF- β . D' altra banda, la *down*-regulació d' Smad3 en cèl·lules deficientes per Pten provoca un augment addicional de la proliferació en les cèl·lules endometrials, el que suggereix que la translocació d' Smad3 posterior a la deleció de Pten pot tenir com a objectiu impedir la progressió tumoral. Totes aquestes dades suggereixen que Smad3 té funcions supressores tumorals quan es trasllada al nucli degut a l' estimulació amb TGF- β o be per la deficiència de Pten. Molecularment, Smad3 pot regular de manera positiva o negativa l' expressió dels seus gens diana per a controlar les seves funcions com a supressor tumoral. Per exemple, l' expressió d' Id1 (Kang, Chen, and Massagué 2004), c-Myc (C.-R. Chen, Kang, and Massague 2002) o ciclina D1 (Ko et al. 1995) pot estar reprimida per les Smads, mentre que altres gens com Smad7 s' activen transcripcionalment. També hem estudiat l' expressió de l' mRNA d' Smad7, PAI-1, Id1 o ciclina D1 en les cèl·lules deficientes en Pten; i hem observat que l' expressió d' aquests gens augmenta significativament. Aquests resultats es poden explicar ja que aquests gens també poden ser regulats per la senyalització de la via PI3K/Akt (Hjelmeland et al. 2005; W. Li et al. 2012; Su et al. 2010; Vartanian et al. 2011). La regulació a la baixa d' Smad3 en cultius 3D deficientes en Pten provoca un augment addicional de la transcripció d' Id1, c-Myc o ciclina D1, demostrant que la presència d' Smad3 al nucli frena la seva expressió. Per contra, la deficiència en Smad3 va provocar una reducció de l' expressió de l' mRNA d' Smad7. Tots aquests resultats donen suport a la hipòtesi que la translocació nuclear d' Smad3, com a conseqüència de la pèrdua de Pten té com a objectiu limitar la progressió tumoral. En línia amb aquests resultats, evidències recents suggereixen que la senyalització pel TGF- β limita la tumorigènesi causada per la deficiència de Pten (Bjerke et al. 2014; Ding et al. 2011). Malauradament, la vida limitada dels ratolins Smad3^{-/-} impedeix l' estudi de la supressió genètica d' Smad3 sola o en combinació amb la supressió de Pten *in vivo*; és per aquest motiu que, actualment, en el nostre laboratori estem treballant amb un nou model de ratolí el qual té

el gen Smad3 flanquejat per dos regions LocusP podent induir-ne, doncs, la seva pèrdua de forma controlada després d' una única injecció amb tamoxifè.

Mecanísticament, la regulació de l' activació d' Smad2/3 i la seva translocació nuclear induïda per la via de senyalització PI3K/Akt encara és controvertida. L' activació de la via PI3K/Akt pot bloquejar o activar les Smads a través de diferents mecanismes moleculars. D' una banda, s' ha descrit que l' Akt pot interactuar directament amb l' Smad3 inhibint-ne la seva translocació i activació nuclear (Conery et al. 2004; Remy, Montmarquette, and Michnick 2004). D' altra banda, també s' ha demostrat que la hiper-activació de la senyalització de PI3K/Akt pot bloquejar l' activació de les Smad. Per exemple, les pròstates dels ratolins deficientes en Pten mostren una major fosforilació i activació d' Smad3 i Smad4 (Ding et al. 2011). A més a més, resultats recents demostren que l' activació de la via PI3K/Akt augmenta els receptors de TGF- β presents en la superfície cel·lular, fet que resulta en una constant i millor senyalització autocrina del TGF- β que causa l' activació d' Smad3 (Budi, Muthusamy, and Derynck 2015). Els nostres resultats també demostren que l' activació de la senyalització de la via PI3K/Akt desencadena una translocació nuclear d' Smad3, però mitjançant un mecanisme molecular diferent.

La ruta de senyalització PI3K/Akt mostra un alt grau de complexitat. La PI3K pot activar diversos substrats a part de l' Akt (Bayascas 2008). A més a més, l' Akt pot ser fosforilada per altres quinases diferents de la PI3K. Un cop activada, l' Akt pot fosforilar molts substrats diferents (Manning and Cantley 2007), afegint complexitat addicional a la ruta. Aquí hem proposat a PI3K/Akt/mTORC1 com a l' eix de senyalització responsable de la translocació nuclear d' Smad3 en les cèl·lules deficientes per Pten. En aquest sentit, val la pena destacar que la translocació nuclear d' Smad2/3 és bloquejada per inhibidors de mTORC1 com ara Everolimus, que actualment s' utilitza en la clínica com a agent terapèutic per als càncers deficientes en Pten (Rodon et al. 2013). A nivell funcional, la inhibició de mTORC1 restaura l' apoptosi induïda per TGF- β , posterior de la pèrdua de Pten o a l' activació constitutiva d' Akt. Per tant, els resultats presentats, a més a més d' una nova visió mecànica de la regulació de les Smads a través de Pten, podrien arribar a tenir un valor terapèutic. Finalment, és important destacar que les diferències en els mecanismes descrits en el nostre model i altres dels proposats es poden explicar per les diferents respostes a la senyalització per TGF- β segons el tipus cel·lular o segons el context en el qual aquestes cèl·lules es troben (Massagué 2012). Pel que fa a la senyalització de les Smads, un altre tema que mereix una part en la discussió és el requisit d' Smad2 o Smad4 per a transmetre les respostes cel·lulars induïdes pel TGF- β . La majoria de les respostes cel·lulars provocades degut a l' estimulació per TGF- β requereixen una

associació de les R-Smads (Smad2/3) amb l' Smad4. No obstant això, cada cop hi ha més evidències que demostren que Smad2 i Smad3 poden tenir diferents rols en la senyalització induïda pel TGF- β (Brown, Pietenpol, and Moses 2007), independentment d' Smad4. En aquest sentit s' ha descrit que, mentre que la deficiència de Pten provoca una translocació nuclear constitutiva d' Smad2/3, Smad4 es manté al citoplasma. D' altra banda, la deficiència d' Smad2 no afecta a l' apoptosi induïda pel tractament amb TGF- β , ni tampoc a la proliferació de cèl·lules endometrials, el que suggereix que Smad2 i Smad4 són prescindibles en quan a la regulació de l' apoptosi induïda per TGF- β i a l' augment de la mida glandular en el cultius 3D d' endometri.

Per tant, podríem dir que existeix un bucle regulador Pten-Smad3 on en les cèl·lules de tipus salvatge el TGF- β actua com un supressor tumoral induint apoptosi. L' estimulació amb TGF- β condueix a la translocació nuclear d' Smad2/3. Al nucli, es requereix d' Smad3 per a transcriure Pten, que, al seu torn, inhibeix la senyalització de PI3K/AKT i permet l' apoptosi induïda per TGF- β . En les cèl·lules deficientes per Smad3, la regulació de l' mRNA de Pten induïda pel TGF- β es veu afectada, la qual cosa comporta una hiperactivació de la via PI3K/AKT que condueix a una major proliferació i dificulta l' apoptosi provocada pel TGF- β . En les cèl·lules deficientes en Pten, també s' inhibeixen les funcions supressores tumorals del TGF- β . En les cèl·lules deficientes per Pten, la senyalització de PI3K/AKT està activa, augmenta la proliferació cel·lular i se suprimeix l' apoptosi induïda pel TGF- β a través d' un mecanisme dependent de mTORC1. En aquest escenari, Smad3 està constitutivament localitzat al nucli, però, òbviament, l' ablació genètica de Pten n' impedeix la seva transcripció activada per Smad3.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquest treball de tesi proporcionen un nou model mecanístic i funcional de la interacció entre les vies de senyalització TGF- β /Smad i la via PI3K/Akt per regular les característiques del fenotip tumoral, com ara la proliferació i l' apoptosi cel·lular (Figura 59).

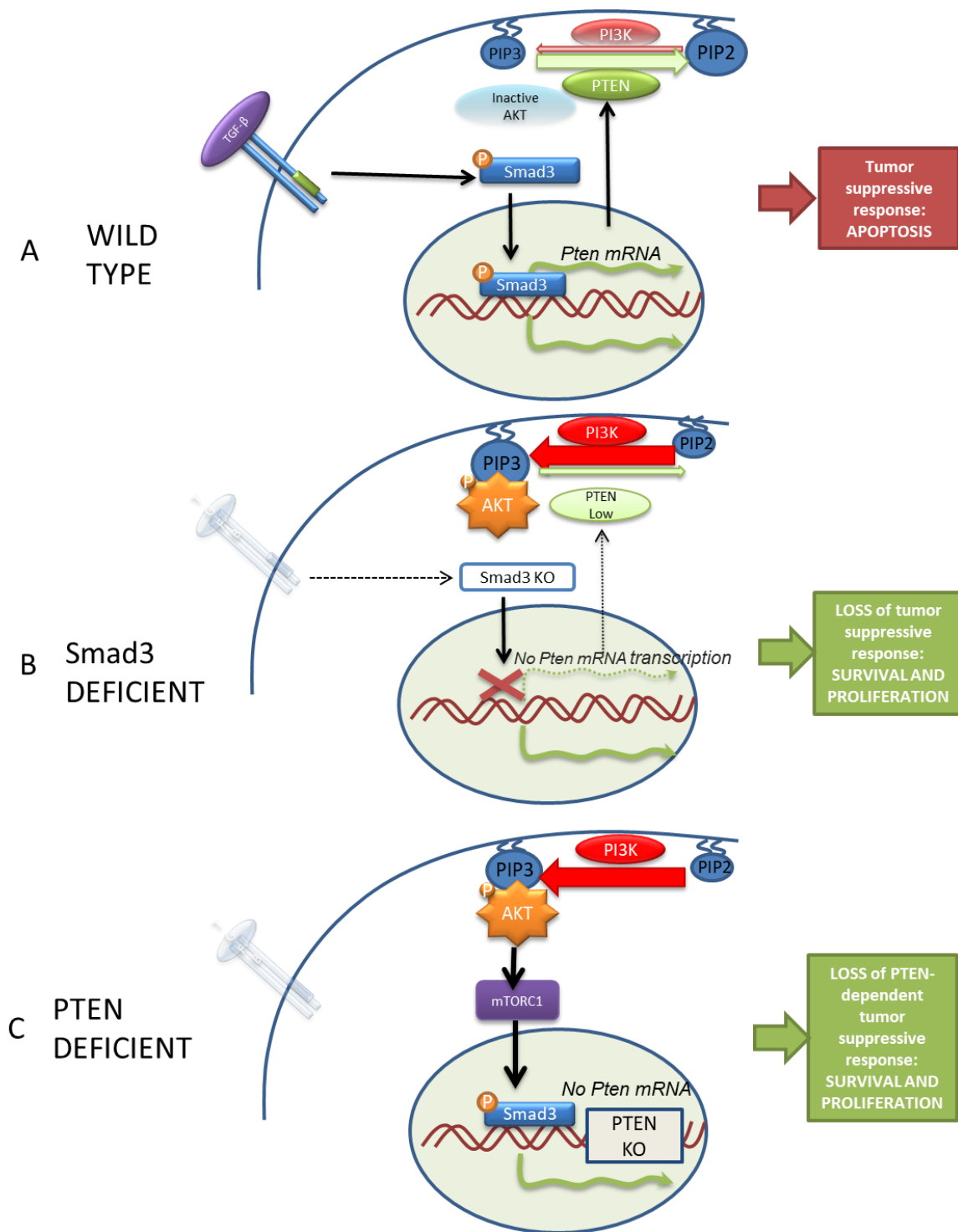


Figura 59. Model mecànic per al bucle regulador *Pten-Smad3*. (A) Cèl·lules normals (B) Cèl·lules deficients per *Smad3* (C) Cèl·lules deficients en *Pten*.

3. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR REGULA LA FUNCió DEL TGF- β SOBRE LES CÈL·LULES ENDOMETRIALS

Com s'ha esmentat anteriorment, descobriments recents demostren de manera clara que l'ablació del T β RI o ALK5 juntament amb la deficiència de Pten condueixen al desenvolupament de carcinomes endometrials invasius (Gao et al. 2017). Tot i que la deleció del T β RI demostra una clara funció supressiva tumoral del TGF- β , la senyalització que s'activa posteriorment a aquesta ablació continua sent controvertida. La contribució de cada branca de senyalització del TGF- β posterior a l'activació del receptor i la diversitat de funcions que aquestes promouen, fan que la resposta cel·lular al TGF- β no hagi estat encara completament elucidada. A més, està àmpliament descrit que les diverses respostes cel·lulars vers la senyalització pel TGF- β són, molts cops, antagòniques i dependents del context cel·lular (Massagué 2012). Per tant, no és d'estranyar que canvis en la polarització cel·lular comportin una diferent resposta al TGF- β . A més a més, està àmpliament descrit que la polaritat cel·lular juga un paper important en la regulació i la progressió de la carcinogènesis (Sever and Brugge 2015; Walker et al. 2018; Walker and Brugge 2006). Els nostres resultats han demostrat que, en cultius 3D, on les cèl·lules epitelials endometrials presenten una correcta estructura i polarització (Núria Eritja, Dolcet, and Matias-Guiu 2013), el tractament amb TGF- β induïx una ràpida mort apoptòtica. En canvi, quan es tracten cultius 2D de cèl·lules normals, per tant, sense una correcta formació ni polarització glandular, no s'observa aquesta mort sinó una pèrdua de marcadors epitelials, com ho són l'E-cadherina i la Citoqueratina i l'aparició de marcadors mesenquimals com ara la Vimentina. Aquest resultat suggereix que, en cultius 2D el TGF- β és capaç d'induir EMT. A més a més, l'adquisició d'aquestes característiques mesenquimals es veu acompanyada per a un alentiment en el creixement cel·lular, característica típica del fenotip de l'EMT (Kerosuo and Bronner-Fraser 2012; Prakash et al. 2019; Vega et al. 2004). Se sap que l'EMT induïda pel TGF- β pot ser deguda a diverses vies *downstream* activades per aquesta citoquina, essent la via de les ERK/MAPKs i la via PI3K/Akt dues de les més importants en aquesta EMT deguda al TGF- β (Xu, Lamouille, and Derynck 2009). Ja que una de les principals diferències entre els cultius estructurats en 3D i els cultius en dues dimensions és la polaritat que adquireixen aquests cultius gràcies a la presència de Matrigel®, hem analitzat com la presència d'aquesta matriu extracel·lular afecta a l'activació d'aquestes vies ERK/MAPK i PI3K/Akt. Hem vist que la presència de la matriu extracel·lular és capaç de disminuir la fosforilació tant de l'Akt com de l'ERK i que, per tant, el Matrigel® promou una inactivació de la via ERK/MAPK i la via PI3K/Akt o

be directament a la polarització que els hi atorga als cultius el propi Matrigel®, o be degut alguna secreció diferencial de factors entre les cèl·lules correctament polaritzades (3D) i les no correctament polaritzades (2D) o per algun altre motiu que, de moment, s'escapa al nostre coneixement. Aquest fet podria ajudar a entendre el perquè de la diferència en la resposta al TGF- β entre els cultius en tres dimensions i els cultius bidimensionals, ja que aquests primers presentarien una menor activitat basal de la via PI3K/Akt, cosa que afavoriria una resposta pro-apoptòtica al TGF- β . En canvi, en cultius en 2D, on existeix una falta d'aquesta inhibició basal de la via PI3K/Akt, la resposta al TGF- β és diferent; promovent l'EMT. A més a més, cal tenir en compte l'efecte de la polaritat cel·lular, deixant de banda el paper com a regulador cel·lular que pot exercir el propi Matrigel®. És en aquest sentit que pensem que una major anàlisi de l'efecte de la polaritat cel·lular en aquest context podria ser d'utilitat per acabar d'elucidar una resposta clara a les diferències observades.

Després de veure com en el nostre sistema les vies ERK/MAPK i PI3K/Akt juguen un paper central en l'EMT induïda pel TGF- β , hem analitzat l'efecte d'inhibidors d'aquestes dues vies sobre els nostres cultius en 2D i la seva relació amb la resposta al TGF- β . Utilitzant l'inhibidor de les MEK, U0126, s'ha vist que aquest és capaç de revertir l'EMT causada pel TGF- β però que, per altra banda, l'U0126 no és suficient per a restablir els nivells normals de proliferació cel·lular. Aquests resultats suggereixen que la via ERK/MAPK està centralment implicada en l'EMT adquirida per la senyalització del TGF- β però no en la frenada en la proliferació cel·lular que aquest causa en cultius bidimensionals.

Per altra banda, hem analitzat el paper de la inhibició de la via PI3K/Akt en resposta a l'EMT induïda pel TGF- β . És en aquest sentit que cultius 2D han estat pretractats amb l'inhibidor de la fosforilació d'Akt, LY294002, i posteriorment exposats al TGF- β . Sorprenentment, en aquest context, s'ha observat una recuperació de la mort apoptòtica provocada pel tractament amb TGF- β , la qual cosa fa pensar que la inhibició de la via PI3K/Akt és necessària, també en cultius 2D, per a activar la senyalització pro-apoptòtica del TGF- β . Per tant, sembla que a part del rol que pugui tenir la polaritat cel·lular en la resposta diferencial al TGF- β , l'estat d'activació o d'inhibició de la via PI3K/Akt és essencial en la resposta de les cèl·lules epitelials d'endometri al TGF- β , la qual cosa obra un nou escenari fins ara desconegut.

CONCLUSIONS

Conclusions

- **Primera**

El TGF- β induïx mort per apoptosi en cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d' endometri murí de forma Smad3 i Pten dependent i Smad2 independent.

- **Segona**

La Smad 3 activada pel TGF- β s'uneix al promotor de Pten i n' incrementa la seva expressió. Per tant, la manca d' Smad3 provoca una híper-activació de la via PI3K/Akt.

- **Tercera**

La inhibició de la via PI3K/Akt restaura la resposta apoptòtica al TGF- β en cultius 3D deficients per Smad3 i Pten.

- **Quarta**

La deficiència en Pten augmenta l' expressió, la fosforilació i la localització nuclear d' Smad2/3, que actua com a fre de la progressió tumoral.

- **Cinquena**

La inhibició de la via PI3K/Akt restaura la localització citosòlica d' Smad2/3 i la mort apoptòtica induïda pel TGF- β en les cèl·lules deficients en Pten, però no la translocalització citosòlica d' Smad2/3 induïda per l' estímul amb TGF- β .

- **Sisena**

La inhibició de mTORC1 per part de l' Everolimus i la Rapamicina, restaura la localització citoplasmàtica d' Smad3/2 en cultius deficients en Pten, així com la mort apopòtica induïda pel TGF- β i, també, inhibeix la híper-proliferació d' aquests cultius deficients en Pten.

- **Setena**

El tractament amb TGF- β en cultius bidimensionals induïx EMT, inhibint l' expressió d' E-Cadherina i Citoqueratina i promovent l' expressió de Vimentina.

- **Vuitena**

La matriu extracel·lular Matrigel[®] provoca una inhibició de la via PI3K/Akt i de la via ERK/MAPK en cultius de cèl·lules endometrials.

- **Novena**

La inhibició de la via ERK/MAPK reverteix l' EMT causada pel TGF- β en cultius bidimensionals.

- **Desena**

La inhibició de la via PI3K/Akt en cultius bidimensionals restaura la mort apoptòtica induïda pel TGF- β .

REFERÈNCIES

Referències

- Alexander-Sefre, Farhad et al. 2003. "Molecular Assessment of Depth of Myometrial Invasion in Stage I Endometrial Cancer: A Model Based on K-Ras Mutation Analysis." *Gynecologic Oncology*.
- Alexandrow, Mark G., and Harold L. Moses. 1983. "Transforming Growth Factor β and Cell Cycle Regulation." *Cancer Research*.
- Allinen, Minna et al. 2004. "Molecular Characterization of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer." *Cancer cell* 6(1): 17–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610804001783> (May 30, 2019).
- Atfi, Azeddine, Maud Buisine, Anne Mazars, and Christian Gespach. 1997. "Induction of Apoptosis by DPC4, a Transcriptional Factor Regulated by Transforming Growth Factor- β through Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase (SAPK/JNK) Signaling Pathway." *Journal of Biological Chemistry*.
- Azar, Rania et al. 2009. "4E-BP1 Is a Target of Smad4 Essential for TGF β -Mediated Inhibition of Cell Proliferation." *EMBO Journal*.
- Bakin, Andrei V. et al. 2000. "Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration." *Journal of Biological Chemistry*.
- Barrios-Rodiles, Miriam et al. 2005. "High-Throughput Mapping of a Dynamic Signaling Network in Mammalian Cells." *Science*.
- Bayascas, Jose R. 2008. "Dissecting the Role of the 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 (PDK1) Signalling Pathways." *Cell Cycle*.
- Berg, Anna et al. 2016. "Tissue and Imaging Biomarkers for Hypoxia Predict Poor Outcome in Endometrial Cancer." *Oncotarget*.
- Bhowmick, N. A. et al. 2003. "TGF- β -Induced RhoA and P160ROCK Activation Is Involved in the Inhibition of Cdc25A with Resultant Cell-Cycle Arrest." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Bjerke, G. A. et al. 2014. "Activation of Akt Signaling in Prostate Induces a TGF β -Mediated Restraint on Cancer Progression and Metastasis." *Oncogene* 33(28): 3660–67. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.342>.
- Bokhman, Jan V. 1983. "Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma." *Gynecologic Oncology*.
- Broderick, Peter et al. 2007. "A Genome-Wide Association Study Shows That Common Alleles of SMAD7 Influence Colorectal Cancer Risk." *Nature Genetics*.
- Brown, Kimberly A., Jennifer A. Pietenpol, and Harold L. Moses. 2007. "A Tale of Two Proteins: Differential Roles and Regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- β Signaling." *Journal of Cellular Biochemistry* 101(1): 9–33.
- Bruna, Alejandra et al. 2007. "High TGF β -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene." *Cancer Cell*.
- Budi, Erine H., Baby Periyayaki Muthusamy, and Rik Derynck. 2015. "The Insulin Response Integrates Increased TGF- β Signaling through Akt-Induced Enhancement of Cell Surface Delivery of TGF- β Receptors." *Science Signaling*.
- Campbell, Hannah K., Jessica L. Maiers, and Kris A. DeMali. 2017. "Interplay between Tight Junctions & Adherens Junctions." *Experimental Cell Research*.
- Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013. "Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma." *Nature*.
- Cerutti, J. M. et al. 2003. "Expression of Smad4 and Smad7 in Human Thyroid Follicular Carcinoma Cell Lines." *Journal of Endocrinological Investigation*.
- Chen, C.-R., Y. Kang, and J. Massague. 2002. "Defective Repression of C-Myc in Breast Cancer Cells: A Loss at the Core of the Transforming Growth Factor Growth Arrest Program." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Chen, Chien Yu, Jingyu Chen, Lina He, and Bangyan L. Stiles. 2018. "PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator." *Frontiers in Endocrinology*.
- Chen, Mei Ling et al. 2006. "The Deficiency of Akt1 Is Sufficient to Suppress Tumor Development in Pten \pm Mice." *Genes and Development*.
- Chen, Y G et al. 1998. "Determinants of Specificity in TGF-Beta Signal Transduction [In Process Citation]." *Genes Dev*.
- Cheung, Lydia W.T. et al. 2011. "High Frequency of PIK3R1 and PIK3R2 Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability." *Cancer Discovery*.
- Chin, Y. Rebecca, Xin Yuan, Steven P. Balk, and Alex

Referències

- Toker. 2014. "PTEN-Deficient Tumors Depend on AKT2 for Maintenance and Survival." *Cancer Discovery*.
- Chipuk, Jerry E. et al. 2001. "Bcl-XL Blocks Transforming Growth Factor-B1-Induced Apoptosis by Inhibiting Cytochrome c Release and Not by Directly Antagonizing Apaf-1-Dependent Caspase Activation in Prostate Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry*.
- Coffey, R J et al. 2015. "Selective Inhibition of Growth-Related Gene Expression in Murine Keratinocytes by Transforming Growth Factor Beta." *Molecular and Cellular Biology*.
- Conery, Andrew R. et al. 2004. "Akt Interacts Directly with Smad3 to Regulate the Sensitivity to TGF- β -Induced Apoptosis." *Nature Cell Biology*.
- Di Cristofano, Antonio, Barbara Pesce, Carlos Cordon-Cardo, and Pier Paolo Pandolfi. 1998. "Pten Is Essential for Embryonic Development and Tumour Suppression." *Nature Genetics*.
- Dai, J. L., R. K. Bansal, and S. E. Kern. 2002. "G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction by Nuclear Smad4/Dpc4: Phenotypes Reversed by a Tumorigenic Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Datto, M. B. et al. 2006. "Transforming Growth Factor Beta Induces the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21 through a P53-Independent Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(12): 5545–49.
- David, Charles J. et al. 2016. "TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT." *Cell*.
- Dedes, Konstantin J. et al. 2011. "Emerging Therapeutic Targets in Endometrial Cancer." *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Dibble, Christian C., and Lewis C. Cantley. 2015. "Regulation of MTORC1 by PI3K Signaling." *Trends in Cell Biology*.
- Ding, Zhihu et al. 2011. "SMAD4-Dependent Barrier Constrains Prostate Cancer Growth and Metastatic Progression." *Nature* 470(7333): 269–76.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature09677>.
- Djordjevic, Bojana et al. 2012. "Clinical Assessment of PTEN Loss in Endometrial Carcinoma: Immunohistochemistry Outperforms Gene Sequencing." *Modern Pathology*.
- Dowdy, Sean C. et al. 2005. "Overexpression of the TGF- β Antagonist Smad7 in Endometrial Cancer." *Gynecologic Oncology*.
- Dutt, A. et al. 2008. "Drug-Sensitive FGFR2 Mutations in Endometrial Carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Ellenson, Lora Hedrick, and T.-C Wu. 2004. "Focus on Endometrial and Cervical Cancer." *Cancer Cell*.
- Eritja, Nuria et al. 2017. "Endometrial Carcinoma: Specific Targeted Pathways." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Eritja, Núria, Xavier Dolcet, and Xavier Matias-Guiu. 2013. "Three-Dimensional Epithelial Cultures: A Tool to Model Cancer Development and Progression." *Histology and Histopathology*.
- Feng, Xin-Hua, and Rik Derynck. 2005. "SPECIFICITY AND VERSATILITY IN TGF- β SIGNALING THROUGH SMADS." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
- Francis, Julia M. et al. 2000. "Transforming Growth Factor-B1 Induces Apoptosis Independently of P53 and Selectively Reduces Expression of Bcl-2 in Multipotent Hematopoietic Cells." *Journal of Biological Chemistry*.
- Fruman, David A. et al. 2017. "The PI3K Pathway in Human Disease." *Cell*.
- Fukuchi, Takeshi et al. 1998. "E-cadherin Mutation in Carcinoma of the Uterine Endometrium." *Cancer Research*.
- Funaba, Masayuki, Cole M. Zimmerman, and Lawrence S. Mathews. 2002. "Modulation of Smad2-Mediated Signaling by Extracellular Signal-Regulated Kinase." *Journal of Biological Chemistry*.
- Gallagher, Amy J., and William P. Schiemann. 2007. "Src Phosphorylates Tyr284 in TGF- β Type II Receptor and Regulates TGF- β Stimulation of P38 MAPK during Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion." *Cancer Research*.
- Gao, Yang, Shu Li, and Qinglei Li. 2014. "Uterine Epithelial Cell Proliferation and Endometrial Hyperplasia: Evidence from a Mouse Model." *Molecular Human Reproduction* 20(8): 776–86.
- Gao, Yang, Pengfei Lin, John P. Lydon, and Qinglei Li. 2017. "Conditional Abrogation of Transforming Growth Factor- β Receptor 1 in PTEN-Inactivated Endometrium Promotes Endometrial Cancer Progression in Mice." *Journal of Pathology*.
- Garcia-Cao, Isabel et al. 2012. "Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State." *Cell*.
- Garcia, Miguel A., W. James Nelson, and Natalie

Referències

- Chavez. 2018. "Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Garrod, David, and Martyn Chidgey. 2008. "Desmosome Structure, Composition and Function." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.
- Godkin, James D, and J J Doré. 1998. "Transforming Growth Factor Beta and the Endometrium." *Reviews of reproduction*.
- Gorelik, Leonid, and Richard A. Flavell. 2000. "Abrogation of TGF β Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease." *Immunity*.
- Gottfried, Yossi et al. 2004. "The Mitochondrial ARTS Protein Promotes Apoptosis through Targeting XIAP." *EMBO Journal*.
- Guasch, Géraldine et al. 2007. "Loss of TGF β Signaling Destabilizes Homeostasis and Promotes Squamous Cell Carcinomas in Stratified Epithelia." *Cancer Cell*.
- Guo, Xing, and Xiao-Fan Wang. 2009. "Signaling Cross-Talk between TGF- β /BMP and Other Pathways." *Cell Research* 19(1): 71-88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002158> (May 30, 2019).
- Hannon, Gregory J., and David Beach. 1994. "p15INK4B Is a Potential Effector of TGF- β -Induced Cell Cycle Arrest." *Nature*.
- Harada, H. et al. 2007. "Significance of HIF-1-Active Cells in Angiogenesis and Radioresistance." *Oncogene*.
- Hartsock, Andrea, and W. James Nelson. 2008. "Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.
- Heldin, Carl Henrik, Maréne Landström, and Aristidis Moustakas. 2009. "Mechanism of TGF- β Signaling to Growth Arrest, Apoptosis, and Epithelial-Mesenchymal Transition." *Current Opinion in Cell Biology*.
- Hjelmeland, Anita B. et al. 2005. "Loss of Phosphatase and Tensin Homologue Increases Transforming Growth Factor β -Mediated Invasion with Enhanced SMAD3 Transcriptional Activity." *Cancer Research*.
- Hollander, M. Christine, Gideon M. Blumenthal, and Phillip A. Dennis. 2011. "PTEN Loss in the Continuum of Common Cancers, Rare Syndromes and Mouse Models." *Nature Reviews Cancer*.
- Hoshino, Rika et al. 1999. "Constitutive Activation of the 41-/43-KDa Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Human Tumors." *Oncogene*.
- Hurley, Rebecca L. et al. 2005. "The Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-Activated Protein Kinase Kinases." *Journal of Biological Chemistry*.
- Huse, Morgan, Ye Guang Chen, Joan Massagué, and John Kuriyan. 1999. "Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF β Receptor in Complex with FKBP12." *Cell*.
- Jae, Youn Yi, Incheol Shin, and Carlos L. Arteaga. 2005. "Type I Transforming Growth Factor β Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Journal of Biological Chemistry*.
- Jaffee, Elizabeth M, Ralph H Hruban, Marcia Canto, and Scott E Kern. 2002. "Focus on Pancreas Cancer." *Cancer Cell*.
- Jang, Chuan Wei et al. 2002. "TGF- β Induces Apoptosis through Smad-Mediated Expression of DAP-Kinase." *Nature Cell Biology*.
- Jennings, Mark T., and Jennifer A. Pietenpol. 1998. "The Role of Transforming Growth Factor β in Glioma Progression." *Journal of Neuro-Oncology*.
- Kaklamani, Virginia et al. 2004. "No Major Association between TGFBR1*6A and Prostate Cancer." *BMC Genetics*.
- Kang, Yibin et al. 2003. "A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone." *Cancer cell*.
- Kang, Yibin, Chang-Rung Chen, and Joan Massagué. 2004. "A Self-Enabling TGF β Response Coupled to Stress Signaling." *Molecular Cell*.
- Kang, Yibin, Chang Rung Chen, and Joan Massagué. 2003. "A Self-Enabling TGF β Response Coupled to Stress Signaling: Smad Engages Stress Response Factor ATF3 for Id1 Repression in Epithelial Cells." *Molecular Cell*.
- Kato, Hidenori et al. 2006. "Induction of Human Endometrial Cancer Cell Senescence through Modulation of HIF-1 α Activity by EGLN1." *International Journal of Cancer*.
- Kerosuo, Laura, and Marianne Bronner-Fraser. 2012. "What Is Bad in Cancer Is Good in the Embryo: Importance of EMT in Neural Crest Development." *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Keski-Oja, Jorma, Katri Koli, and Harald Von

Referències

- Melchner. 2004. "TGF- β Activation by Traction?" *Trends in Cell Biology*.
- Kestler, Hans A., and Michael Kühl. 2008. "From Individual Wnt Pathways towards a Wnt Signalling Network." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Khalifa, Mahmoud A. et al. 1994. "Expression of EGFR, HER-2/Neu, P53, and PCNA in Endometrioid, Serous Papillary, and Clear Cell Endometrial Adenocarcinomas." *Gynecologic Oncology*.
- Ko, TC et al. 1995. "Transforming Growth Factor-Beta 1 Inhibits Cyclin D1 Expression in Intestinal." *Oncogene*.
- Koul, Anjila et al. 2002. "Distinct Sets of Gene Alterations in Endometrial Carcinoma Implicate Alternate Modes of Tumorigenesis." *Cancer*.
- Kowanetz, Marcin et al. 2004. "Id2 and Id3 Define the Potency of Cell Proliferation and Differentiation Responses to Transforming Growth Factor Beta and Bone Morphogenetic Protein." *Molecular and cellular biology*.
- Kretzschmar, Marcus, Jacqueline Doody, and Joan Massagué. 1997. "Opposing BMP and EGF Signalling Pathways Converge on the TGF- β Family Mediator Smad1." *Nature*.
- Kretzschmar, Marcus, Jacqueline Doody, Inna Timokhina, and Joan Massagué. 1999. "A Mechanism of Repression of TGF β /Smad Signaling by Oncogenic Ras." *Genes and Development*.
- Kriseman, Maya et al. 2019. "Uterine Double-Conditional Inactivation of Smad2 and Smad3 in Mice Causes Endometrial Dysregulation, Infertility, and Uterine Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Lamouille, Samy, and Rik Derynck. 2007. "Cell Size and Invasion in TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition Is Regulated by Activation of the MTOR Pathway." *Journal of Cell Biology*.
- Larisch-Bloch, S et al. 2000. "Selective Loss of the Transforming Growth Factor-Beta Apoptotic Signaling Pathway in Mutant NRP-154 Rat Prostatic Epithelial Cells." *Cell Growth Differ*.
- Larisch, Sarit et al. 2000. "A Novel Mitochondrial Septin-like Protein, ARTS, Mediates Apoptosis Dependent on Its P-Loop Motif." *Nature Cell Biology*.
- Lawrence, Michael S. et al. 2014. "Discovery and Saturation Analysis of Cancer Genes across 21 Tumour Types." *Nature*.
- Lax, Sigurd F. et al. 2000. "The Frequency of P53, K-Ras Mutations, and Microsatellite Instability Differs in Uterine Endometrioid and Serous Carcinoma: Evidence of Distinct Molecular Genetic Pathways." *Cancer*.
- Lebrin, Franck, Martine Deckers, Philippe Bertolino, and Peter Ten Dijke. 2005. "TGF- β Receptor Function in the Endothelium." *Cardiovascular Research*.
- Lee, Matt K. et al. 2007. "TGF- β Activates Erk MAP Kinase Signalling through Direct Phosphorylation of ShcA." *EMBO Journal*.
- Lee, Yu Ru, Ming Chen, and Pier Paolo Pandolfi. 2018. "The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor: New Modes and Prospects." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Levy, Laurence, and Caroline S. Hill. 2006. "Alterations in Components of the TGF- β Superfamily Signaling Pathways in Human Cancer." *Cytokine and Growth Factor Reviews*.
- Li, Jing et al. 1997. "PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer." *Science*.
- Li, Wei et al. 2012. "An Essential Role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/Survivin Signalling Pathway in Promoting the Proliferation of Endothelial Progenitor Cells in Vitro." *Molecular and Cellular Biochemistry*.
- Liao, Jin Hui et al. 2001. "The Involvement of P38 MAPK in Transforming Growth Factor B1-Induced Apoptosis in Murine Hepatocytes." *Cell Research*.
- Liu, J. et al. 2013. "Targeting Wnt-Driven Cancer through the Inhibition of Porcupine by LGK974." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Liu, Na et al. 2014. "Wnt/ β -Catenin Pathway Regulates Cementogenic Differentiation of Adipose Tissue-Deprived Stem Cells in Dental Follicle Cell-Conditioned Medium." *PLoS ONE*.
- Liu, Pengda et al. 2015. "Ptdins(3,4,5) P3 -Dependent Activation of the MTORC2 Kinase Complex." *Cancer Discovery*.
- Liu, Yunduo et al. 2013. "Overexpression of Wnt7a Is Associated with Tumor Progression and Unfavorable Prognosis in Endometrial Cancer." *International Journal of Gynecological Cancer*.

Referències

- Livasy, Chad A. et al. 2006. "EGFR Expression and HER2/Neu Overexpression/Amplification in Endometrial Carcinosarcoma." *Gynecologic Oncology*.
- Maehama, Tomohiko, and Jack E. Dixon. 1998. "The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate." *Journal of Biological Chemistry*.
- Manning, Brendan D, and Lewis C Cantley. 2007. "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream." *Cell*.
- Manning, Brendan D, and Alex Toker. 2017. "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." *Cell*.
- De Marco, Paola et al. 2015. "Novel Aspects Concerning the Functional Cross-Talk between the Insulin/IGF-I System and Estrogen Signaling in Cancer Cells." *Frontiers in Endocrinology*.
- Markowska, Anna, Monika Pawałowska, Jolanta Lubin, and Janina Markowska. 2014. "Signalling Pathways in Endometrial Cancer." *Wspolczesna Onkologia*.
- Massagué, Joan et al. 2008. "TGFbeta in Cancer." *Cell*.
- . 2012. "TGFβ Signalling in Context." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Massagué, Joan, Joan Seoane, and David Wotton. 2005a. "Smad Transcription Factors." *Genes & development* 19(23): 2783–2810. <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1350705> (May 29, 2019).
- . 2005b. "Smad Transcription Factors." *Genes and Development*.
- McC Campbell, Adrienne S., Russell R. Broaddus, David S. Loose, and Peter J A Davies. 2006. "Overexpression of the Insulin-like Growth Factor I Receptor and Activation of the AKT Pathway in Hyperplastic Endometrium." *Clinical Cancer Research*.
- McConechy, Melissa K. et al. 2012. "Use of Mutation Profiles to Refine the Classification of Endometrial Carcinomas." *Journal of Pathology*.
- . 2014. "Ovarian and Endometrial Endometrioid Carcinomas Have Distinct CTNNB1 and PTEN Mutation Profiles." *Modern Pathology*.
- Mendoza, Michelle C, E Emrah Er, and John Blenis. 2011. "The Ras-ERK and PI3K-MTOR Pathways: Cross-Talk and Compensation." *Trends in biochemical sciences*.
- Menon, Suchithra et al. 2014. "Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of MTORC1 at the Lysosome." *Cell*.
- Meşe, Gülistan, Gabriele Richard, and Thomas W. White. 2007. "Gap Junctions: Basic Structure and Function." *Journal of Investigative Dermatology*.
- Mhaweche-Fauceglia, Paulette et al. 2011. "Expression and Clinical Significance of the Transforming Growth Factor-β Signalling Pathway in Endometrial Cancer." *Histopathology*.
- Mirantes, C. et al. 2013. "An Inducible Knockout Mouse to Model the Cell-Autonomous Role of PTEN in Initiating Endometrial, Prostate and Thyroid Neoplasias." *Disease Models & Mechanisms*.
- Morrison, Carl et al. 2006. "HER-2 Is an Independent Prognostic Factor in Endometrial Cancer: Association with Outcome in a Large Cohort of Surgically Staged Patients." *Journal of Clinical Oncology*.
- Muñelo-Romay, L. et al. 2011. "High-Risk Endometrial Carcinoma Profiling Identifies TGF-1 as a Key Factor in the Initiation of Tumor Invasion." *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Murphy, C. R. 2000. "Junctional Barrier Complexes Undergo Major Alterations during the Plasma Membrane Transformation of Uterine Epithelial Cells." In *Human Reproduction*.
- Mutter, G. L. 2000. "Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers." *Journal of the National Cancer Institute*.
- O'Hara, Andrea J, and Daphne W Bell. 2012. "The Genomics and Genetics of Endometrial Cancer." *Advances in genomics and genetics*.
- Oda, K. 2011. "[Targeting Ras-PI3K/MTOR Pathway and the Predictive Biomarkers in Endometrial Cancer]." *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*.
- Ohgushi, M. et al. 2005. "Transforming Growth Factor -Dependent Sequential Activation of Smad, Bim, and Caspase-9 Mediates Physiological Apoptosis in Gastric Epithelial Cells." *Molecular and Cellular Biology*.
- Ozdamar, Barish et al. 2005. "Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGFβ Receptors

Referències

- Controls Epithelial Cell Plasticity." *Science*.
- De Palma, Michele, Daniela Biziato, and Tatiana V Petrova. 2017. "Microenvironmental Regulation of Tumour Angiogenesis." *Nature reviews. Cancer*.
- Papa, Antonella et al. 2014. "Cancer-Associated PTEN Mutants Act in a Dominant-Negative Manner to Suppress PTEN Protein Function." *Cell*.
- Pardali, Katerina, and Aristidis Moustakas. 2007a. "Actions of TGF- β as Tumor Suppressor and pro-Metastatic Factor in Human Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1775(1): 21–62.
- . 2007b. "Actions of TGF- β as Tumor Suppressor and pro-Metastatic Factor in Human Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.
- Parekh, Trilok V. et al. 2002. "Transforming Growth Factor β Signaling Is Disabled Early in Human Endometrial Carcinogenesis Concomitant with Loss of Growth Inhibition." *Cancer Research*.
- Perk, Jonathan, Antonio Iavarone, and Robert Benezra. 2005. "Id Family of Helix-Loop-Helix Proteins in Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Perlman, Riki et al. 2001. "TGF- β -Induced Apoptosis Is Mediated by the Adapter Protein Daxx That Facilitates JNK Activation." *Nature Cell Biology*.
- Pierce, D. F. et al. 1993. "Inhibition of Mammary Duct Development but Not Alveolar Outgrowth during Pregnancy in Transgenic Mice Expressing Active TGF-B1." *Genes and Development*.
- Piestrzeniewicz-Ulanska, Dagmara et al. 2004. "TGF- β Signaling Is Disrupted in Endometrioid-Type Endometrial Carcinomas." *Gynecologic Oncology*.
- Podsypanina, K. et al. 2002. "Mutation of Pten/Mmac1 in Mice Causes Neoplasia in Multiple Organ Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Pollock, P. M. et al. 2007. "Frequent Activating FGFR2 Mutations in Endometrial Carcinomas Parallel Germline Mutations Associated with Craniosynostosis and Skeletal Dysplasia Syndromes." *Oncogene*.
- Prakash, Varsha et al. 2019. "Ribosome Biogenesis during Cell Cycle Arrest Fuels EMT in Development and Disease." *Nature Communications*.
- Qin, Bin Y., Suvana S. Lam, John J. Correia, and Kai Lin. 2002. "Smad3 Allosteric Links TGF- β Receptor Kinase Activation to Transcriptional Control." *Genes and Development*.
- Quinn, M A et al. 2006. "Carcinoma of the Cervix Uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer." *International Journal of Gynecology and Obstetrics*.
- Ramesh, Sneha et al. 2008. "TGF β -Mediated BIM Expression and Apoptosis Are Regulated through SMAD3-Dependent Expression of the MAPK Phosphatase MKP2." *EMBO Reports*.
- Ramesh, Sneha, Gary M. Wildey, and Philip H. Howe. 2009. "Transforming Growth Factor β (TGF β)-Induced Apoptosis: The Rise and Fall of Bim." *Cell Cycle* 8(1): 11–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106608> (May 30, 2019).
- Ramjaun, A. R., S. Tomlinson, A. Eddaoudi, and J. Downward. 2007. "Upregulation of Two BH3-Only Proteins, Bmf and Bim, during TGF β -Induced Apoptosis." *Oncogene*.
- Ray, D. et al. 2005. "Transforming Growth Factor Facilitates -TrCP-Mediated Degradation of Cdc25A in a Smad3-Dependent Manner." *Molecular and Cellular Biology*.
- Remy, Ingrid, Annie Montmarquette, and Stephen W. Michnick. 2004. "PKB/Akt Modulates TGF- β Signalling through a Direct Interaction with Smad3." *Nature Cell Biology*.
- Reynisdóttir, Inga, and Joan Massagué. 1997. "The Subcellular Locations of P15(Ink4b) and P27(Kip1) Coordinate Their Inhibitory Interactions with Cdk4 and Cdk2." *Genes and Development*.
- Ribeiro, Afonso et al. 1999. "The Transforming Growth Factor B1-Inducible Transcription Factor, TIEG1, Mediates Apoptosis through Oxidative Stress." *Hepatology*.
- Rifkin, Daniel B. 2005. "Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- β Availability." *Journal of Biological Chemistry*.
- Roberts, A B et al. 1985. "Type Beta Transforming Growth Factor: A Bifunctional Regulator of Cellular Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Rodgarkia-Dara, Chantal et al. 2006. "The Activin Axis in Liver Biology and Disease." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.
- Rodon, Jordi, Rodrigo Dienstmann, Violeta Serra, and

Referències

- Josep Tabernero. 2013. "Development of PI3K Inhibitors: Lessons Learned from Early Clinical Trials." *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Rudd, Meghan L. et al. 2011. "A Unique Spectrum of Somatic PIK3CA (P110 α) Mutations within Primary Endometrial Carcinomas." *Clinical Cancer Research*.
- Saegusa, M., M. Hashimura, T. Yoshida, and I. Okayasu. 2001. " β -Catenin Mutations and Aberrant Nuclear Expression during Endometrial Tumorigenesis." *British Journal of Cancer*.
- Saltzman, Alan et al. 1998. "Transforming Growth Factor- β -Mediated Apoptosis in the Ramos B-Lymphoma Cell Line Is Accompanied by Caspase Activation and Bcl-X(L) Downregulation." *Experimental Cell Research*.
- Salvesen, H. B. et al. 2009. "Integrated Genomic Profiling of Endometrial Carcinoma Associates Aggressive Tumors with Indicators of PI3 Kinase Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Samuels, Yarden et al. 2004. "High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers." *Science*.
- Saxton, Robert A., and David M. Sabatini. 2017. "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell*.
- Schmierer, Bernhard, and Caroline S Hill. 2005. "Kinetic Analysis of Smad Nucleocytoplasmic Shuttling Reveals a Mechanism for Transforming Growth Factor Beta-Dependent Nuclear Accumulation of Smads." *Molecular and cellular biology*.
- Seeber, Laura M.S. et al. 2010. "Necrosis Related HIF-1 α Expression Predicts Prognosis in Patients with Endometrioid Endometrial Carcinoma." *BMC Cancer*.
- Semenza, Gregg L. 2003. "Targeting HIF-1 for Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer*.
- Seoane, Joan et al. 2001. "TGF β Influences Myc, Miz-1 and Smad to Control the CDK Inhibitor P15INK4b." *Nature Cell Biology*.
- . 2004. "Integration of Smad and Forkhead Pathways in Growth Control and Cancer." *Cell*.
- Seoane, Joan, Hong Van Le, and Joan Massagué. 2002. "Myc Suppression of the P21Cip1 Cdk Inhibitor Influences the Outcome of the P53 Response to DNA Damage." *Nature*.
- Sever, Richard, and Joan S. Brugge. 2015. "Signal Transduction in Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Shi, Yigong, and Joan Massagué. 2003. "Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus." *Cell*.
- Shima, Yuka et al. 1999. "Activation of Caspase-8 in Transforming Growth Factor- β -Induced Apoptosis of Human Hepatoma Cells." *Hepatology*.
- Shoji, K. et al. 2009. "The Oncogenic Mutation in the Pleckstrin Homology Domain of AKT1 in Endometrial Carcinomas." *British Journal of Cancer*.
- Shull, Marcia M. et al. 1992. "Targeted Disruption of the Mouse Transforming Growth Factor-B1 Gene Results in Multifocal Inflammatory Disease [14]." *Nature*.
- Siegel, Peter M., and Joan Massagué. 2003. "Cytostatic and Apoptotic Actions of TGF- β in Homeostasis and Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Siegel, Rebecca L, Kimberly D Miller, and Ahmedin Jemal. 2019. "Cancer Statistics, 2019." *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Sjöblom, Tobias et al. 2006. "The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers." *Science*.
- Slomovitz, Brian M. et al. 2004. "Her-2/Neu Overexpression and Amplification in Uterine Papillary Serous Carcinoma." *Journal of Clinical Oncology*.
- Sneddon, J. B. et al. 2006. "Bone Morphogenetic Protein Antagonist Gremlin 1 Is Widely Expressed by Cancer-Associated Stromal Cells and Can Promote Tumor Cell Proliferation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Song, Min Sup, Leonardo Salmena, and Pier Paolo Pandolfi. 2012. "The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Sorrentino, Alessandro et al. 2008. "The Type I TGF- β Receptor Engages TRAF6 to Activate TAK1 in a Receptor Kinase-Independent Manner." *Nature Cell Biology*.
- Staller, Peter et al. 2001. "Repression of P15INK4b Expression by Myc through Association with Miz-1." *Nature Cell Biology*.
- Stambolic, Vuk et al. 1998. "Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN." *Cell*.

Referències

- . 2000. "High Incidence of Breast and Endometrial Neoplasia Resembling Human Cowden Syndrome in Pten(+/-) Mice." *Cancer Research*.
- Steck, Peter A. et al. 1997. "Identification of a Candidate Tumour Suppressor Gene, MMAC1, at Chromosome 10q23.3 That Is Mutated in Multiple Advanced Cancers." *Nature Genetics*.
- Su, Yajuan et al. 2010. "The PI3K/Akt Pathway Upregulates Id1 and Integrin A4 to Enhance Recruitment of Human Ovarian Cancer Endothelial Progenitor Cells." *BMC cancer* 10(1): 459. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-459> (May 30, 2019).
- Suzuki, Akira et al. 1998. "High Cancer Susceptibility and Embryonic Lethality Associated with Mutation of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Mice." *Current Biology*.
- Tachibana, Issei et al. 1997. "Overexpression of the TGF β -Regulated Zinc Finger Encoding Gene, TIEG, Induces Apoptosis in Pancreatic Epithelial Cells." *Journal of Clinical Investigation*.
- Takehara, Kazuhiko, E. Carwile LeRoy, and Gary R. Grotendorst. 1987. "TGF- β Inhibition of Endothelial Cell Proliferation: Alteration of EGF Binding and EGF-Induced Growth-Regulatory (Competence) Gene Expression." *Cell*.
- Tang, Binwu et al. 1999. "Loss of Responsiveness to Transforming Growth Factor β Induces Malignant Transformation of Nontumorigenic Rat Prostate Epithelial Cells." *Cancer Research*.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y J Huang, and M Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell*.
- Thomas, Dori A., and Joan Massagué. 2005. "TGF- β Directly Targets Cytotoxic T Cell Functions during Tumor Evasion of Immune Surveillance." *Cancer Cell*.
- Thuault, Sylvie et al. 2006. "Transforming Growth Factor- β Employs HMGA2 to Elicit Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Cell Biology*.
- Tucker, Ronald F., Gary D. Shipley, Harold L. Moses, and Robert W. Holley. 1984. "Growth Inhibitor from BSC-1 Cells Closely Related to Platelet Type β Transforming Growth Factor." *Science*.
- Urlick, Mary E. et al. 2011. "PIK3R1 (P85 α) Is Somatic Mutated at High Frequency in Primary Endometrial Cancer." *Cancer Research*.
- Valderrama-Carvajal, Hector et al. 2002. "Activin/TGF- β Induce Apoptosis through Smad-Dependent Expression of the Lipid Phosphatase SHIP." *Nature Cell Biology*.
- Vanhaesebroeck, Bart, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, and Benoit Bilanges. 2010. "The Emerging Mechanisms of Isoform-Specific PI3K Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Vartanian, R. et al. 2011. "AP-1 Regulates Cyclin D1 and c-MYC Transcription in an AKT-Dependent Manner in Response to MTOR Inhibition: Role of AIP4/Itch-Mediated JUNB Degradation." *Molecular Cancer Research*.
- Vega, Sonia et al. 2004. "Snail Blocks the Cell Cycle and Confers Resistance to Cell Death." *Genes and Development*.
- Viñals, F, and J Pouyssegur. 2001. "Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-Beta1) Promotes Endothelial Cell Survival during in Vitro Angiogenesis via an Autocrine Mechanism Implicating TGF-Alpha Signaling." *Molecular and cellular biology*.
- Walker, Stephanie J., and Joan S. Brugge. 2006. "SePARating Polarity and Proliferation in ErbB2 Oncogenesis." *Nature Cell Biology*.
- Walker, Stephanie J., Laura M. Selfors, Ben L. Margolis, and Joan S. Brugge. 2018. "CRB3 and the FERM Protein EPB41L4B Regulate Proliferation of Mammary Epithelial Cells through the Release of Amphiregulin." *PLoS ONE*.
- Wang, H. et al. 2010. "Allele-Specific Tumor Spectrum in Pten Knockin Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Wang, Hong Rui et al. 2003. "Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation." *Science*.
- Wang, Li E. et al. 2012. "Roles of Genetic Variants in the PI3K and RAS/RAF Pathways in Susceptibility to Endometrial Cancer and Clinical Outcomes." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*.
- De Wever, Olivier, and Marc Mareel. 2003. "Role of Tissue Stroma in Cancer Cell Invasion." *Journal of Pathology*.
- Wiener, Z. et al. 2014. "Oncogenic Mutations in Intestinal Adenomas Regulate Bim-Mediated Apoptosis Induced by TGF-." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Referències

- Wildey, Gary M., Supriya Patil, and Philip H. Howe. 2003. "Smad3 Potentiates Transforming Growth Factor β (TGF β)-Induced Apoptosis and Expression of the BH3-Only Protein Bim in WEHI 231 B Lymphocytes." *Journal of Biological Chemistry* 278(20): 18069–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637528> (May 30, 2019).
- Wilkes, M. C., S. J. Murphy, N. Garamszegi, and E. B. Leof. 2003. "Cell-Type-Specific Activation of PAK2 by Transforming Growth Factor Independent of Smad2 and Smad3." *Molecular and Cellular Biology*.
- Wilkes, Mark C. et al. 2005. "Transforming Growth Factor- β Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Independent of Smad2 and Smad3 and Regulates Fibroblast Responses via P21-Activated Kinase-2." *Cancer Research*.
- Wu, Y. Linda et al. 2017. "Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells." *Translational Oncology*.
- Xu, Jian, Samy Lamouille, and Rik Derynck. 2009. "TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition." *Cell Research*.
- Yamashita, Motozo et al. 2008. "TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and P38 by TGF- β ." *Molecular Cell*.
- Yang, Jiayi, Reema Wahdan-Alaswad, and David Danielpour. 2009. "Critical Role of Smad2 in Tumor Suppression and Transforming Growth Factor- β -Induced Apoptosis of Prostate Epithelial Cells." *Cancer Research*.
- Yehia, Lamis, Joanne Ngeow, and Charis Eng. 2019. "PTEN-Opathies: From Biological Insights to Evidence-Based Precision Medicine." *Journal of Clinical Investigation*.
- Yeremian, A. et al. 2013. "Endometrial Carcinoma: Molecular Alterations Involved in Tumor Development and Progression." *Oncogene*.
- Yu, Li, Mindy C. Hébert, and Ying E. Zhang. 2002. "TGF- β Receptor-Activated P38 MAP Kinase Mediates Smad-Independent TGF- β Responses." *EMBO Journal*.
- Zhang, Long, Fangfang Zhou, and Peter ten Dijke. 2013. "Signaling Interplay between Transforming Growth Factor- β Receptor and PI3K/AKT Pathways in Cancer." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Zhang, Qian et al. 2013. "Chemopreventive Effects of Metformin on Obesity-Associated Endometrial Proliferation." *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Zhang, Ying E. 2009a. "Non-Smad Pathways in TGF- β Signaling." *Cell Research* 19(1): 128–39.
- . 2009b. "Non-Smad Pathways in TGF- β Signaling." *Cell Research*.
- Zhu, Hong Jian, and Andrew M. Sizeland. 1999. "A Pivotal Role for the Transmembrane Domain in Transforming Growth Factor- β Receptor Activation." *Journal of Biological Chemistry*.
- Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, and Maria S. Balda. 2016. "Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

ANNEX

Cytoplasmic cyclin D1 regulates glioblastoma dissemination.

Cemeli T, Guasch-Vallés M, Nàger M, **Felip I**, Cambray S, Santacana M, Gatus S, Pedraza N, Dolcet X, Ferrezuelo F, Schuhmacher AJ, Herreros J, Garí E. *J Pathol.* 2019 Apr 7. doi: 10.1002/path.5277. [Epub ahead of print] PMID:30957234

Therapeutic potential of the new TRIB3-mediated cell autophagy anticancer drug ABTL0812 in endometrial cancer.

Felip I, Moiola CP, Megino-Luque C, Lopez-Gil C, Cabrera S, Solé-Sánchez S, Muñoz-Guardiola P, Megias-Roda E, Pérez-Montoyo H, Alfon J, Yeste-Velasco M, Santacana M, Dolcet X, Reques A, Oaknin A, Rodríguez-Freixinos V, Lizcano JM, Domènech C, Gil-Moreno A, Matias-Guiu X, Colas E, Eritja N. *Gynecol Oncol.* 2019 May;153(2):425-435. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.03.002. Epub 2019 Mar 7. PMID:30853360

Tumor suppressive function of E2F-1 on PTEN-induced serrated colorectal carcinogenesis.

Dosil MA, Navaridas R, Mirantes C, Tarragona J, Eritja N, **Felip I**, Urdanibia I, Megino C, Domingo M, Santacana M, Gatus S, Piñol C, Barceló C, Maiques O, Macià A, Velasco A, Vaquero M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *J Pathol.* 2019 Jan;247(1):72-85. doi: 10.1002/path.5168. Epub 2018 Nov 27. PMID:30206933

A Smad3-PTEN regulatory loop controls proliferation and apoptotic responses to TGF- β in mouse endometrium.

Eritja N, **Felip I**, Dosil MA, Vigezzi L, Mirantes C, Yeramian A, Navaridas R, Santacana M, Llobet-Navas D, Yoshimura A, Nomura M, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *Cell Death Differ.* 2017 Aug;24(8):1443-1458. doi: 10.1038/cdd.2017.73. Epub 2017 May 19. PMID: 28524854

Palbociclib has antitumour effects on Pten-deficient endometrial neoplasias.

Dosil MA, Mirantes C, Eritja N, **Felip I**, Navaridas R, Gatus S, Santacana M, Colàs E, Moiola C, Schoenenberger JA, Encinas M, Garí E, Matias-Guiu X, Dolcet X. *J Pathol.* 2017 Jun;242(2):152-164. doi: 10.1002/path.4896. Epub 2017 Apr 28. PMID:28349562

Effects of the multikinase inhibitors Sorafenib and Regorafenib in PTEN deficient neoplasias.

Mirantes C, Dosil MA, Eritja N, **Felip I**, Gatus S, Santacana M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *Eur J Cancer.* 2016 Aug; 63:74-87. doi: 10.1016/j.ejca.2016.04.019. Epub 2016 Jun 9. PMID:27288872

Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer.

Fusté NP, Castelblanco E, **Felip I**, Santacana M, Fernández-Hernández R, Gatus S, Pedraza N, Pallarés J, Cemeli T, Valls J, Tarres M, Ferrezuelo F, Dolcet X, Matias-Guiu X, Garí E. *Oncotarget.* 2016 May 10;7(19):26979-91. doi: 10.18632/oncotarget.8876. PMID:27105504