

ETV5 I RUNX1, NOUS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA INVASIÓ MIOMETRIAL DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

MIGUEL ABAL,^{1,5} JESÚS PLANAGUMÀ,^{1,5} ANTONIO GIL-MORENO,^{2,5} ANDREAS DOLL,^{1,5}
MARTA MONGE,^{1,5} MARTA GONZÁLEZ,^{1,5} TERESA BARÓ,⁴ ÁNGEL GARCÍA,^{3,5} JOSEP CASTELLVÍ,^{3,5}
SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL,^{3,5} JORDI XERCAVINS,^{2,5} FRANCESC ALAMEDA^{4,5}
I JAUME REVENTÓS^{1,5}

¹ *Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca i Hospital Vall d'Hebron.*

² *Servei de Ginecologia, Institut de Recerca i Hospital Vall d'Hebron.*

³ *Servei d'Anatomia Patològica, Institut de Recerca i Hospital Vall d'Hebron.*

⁴ *Servei d'Anatomia Patològica, Hospital del Mar, Barcelona.*

⁵ *Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Jaume Reventós. Unitat de Recerca Biomèdica,
Institut de Recerca Vall d'Hebron. Pg. de la Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona.
Adreça electrònica: jreventos@ir.vhebron.net.

RESUM

Actualment, en càncer d'endometri, està àmpliament acceptat el model dualístic que, atenant a bases morfològiques, diferencia tumors de tipus I o endometrioides dels de tipus II o no endometrioides. La genètica molecular ha aportat dades que donen suport a aquest model dualístic de la tumorigènesi endometrial i algunes claus per a poder especular sobre la seqüència temporal de les alteracions moleculars que defineixen les rutes tumorigèniques. En els càncers endometrials endometrioides, o de tipus I, es coneixen alteracions majors, com poden ser el silenciament del gen PTEN, la inestabilitat de microsatèl·lits associada a defectes en els gens reparadors de DNA, o mutacions al gen K-ras. Aquestes alteracions defineixen la progressió de l'endometri normal cap a la hiperplàsia i posteriorment cap al carcinoma. Recentment, l'ús de la tecnologia de microxips de cDNA per a identificar les diferències en els patrons d'expressió gènica entre els diferents tipus histològics de càncer d'endometri han permès la identificació de gens expressats diferencialment que podrien ajudar-nos a entendre les diferències en la biologia i el pronòstic clínic dels diferents histiotips tumorals. En el nostre laboratori hem aïllat i caracteritzat dos nous factors de transcripció, ETV5 i RUNX1, que estan associats amb els passos inicials de la infiltració miometrial en el càncer d'endometri endometrioides. Aquests estudis, i els d'altres gens implicats en el control de la mitosi com a mecanisme major de carcinogènesi en els càncers d'endometri no endometrioides, representen exemples de la utilitat dels estudis genètics amplis per a comprendre el procés de tumorigènesi i les rutes implicades en la patogènesi molecular del càncer d'endometri.

Paraules clau: carcinoma endometrial endometrioid, patologia molecular, expressió gènica diferencial, RUNX1/AML1, ETV5/ERM.

SUMMARY

A dualistic model, which has been established on a morphological basis and that differentiates type I endometrioid from type II non-endometrioid endometrial cancer, is widely accepted. Molecular genetics have provided us with data supporting the dualistic model of endometrial tumorigenesis and with some clues to speculate about the sequence of the molecular alterations defining the tumorigenesis pathways. In type I endometrioid endometrial cancer, PTEN gene silencing, microsatellite instability associated with defects in DNA mismatch repair genes, or mutations in the K-ras gene are the known major alterations defining the progression from normal endometrium to hyperplasia and then on to carcinoma. Recently, cDNA microarray technology for identifying the differences in gene expression patterns between the histological types of endometrial cancer have permitted the identification of differentially expressed genes that could help us to understand differences in the biology and the clinical outcome between histotypes. In our laboratory, we have recently isolated and characterized two new transcription factors, ETV5 and RUNX1, which expression appears to be associated with initial steps of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. These studies, as well as those on other genes involved in the mitotic checkpoint as a major mechanism of carcinogenesis in non-endometrioid endometrial cancer, represent examples of how useful large genetic screenings can be for understanding the tumorigenesis process and the future directions in the molecular pathogenesis of endometrial cancer.

Keywords: endometrial endometrioid carcinoma, molecular pathology, differential gene expression, RUNX1/AML1, ETV5/ERM.

MODEL DUALÍSTIC PER A LA CARCINOGENÈSI ENDOMETRIAL

La tumorigènesi del càncer endometrial esporàdic, la malignitat ginecològica més comuna als països occidentals, es concep normalment d'acord amb un model dualístic tant des dels paràmetres biològics com des dels clínics (Lax i Kurman, 1997). Els carcinomes endometrials endometrioides de tipus I (EEC) representen la major part dels casos de càncer endometrial esporàdic (70-80%), amb l'estimulació d'estrògens sense oposició com a factor etiològic associat amb el desenvolupament del carcinoma (Potischman *et al.*, 1996). Els nivells alts d'estrògens en circulació, juntament amb els nivells baixos de progesterona, es poden

relacionar amb l'obesitat, l'anovulació, la teràpia substitutiva només amb estrògens (HRT) (Weiderpass *et al.*, 1999), la síndrome ovàrica policística, la nulliparitat o la neoplàsia productora d'estrògens. Els EEC es desenvolupen normalment en dones premenopàusiques i perimenopàusiques, expressen receptors de progesterona (PR) i d'estrògens (ER) (Lax *et al.*, 1998), i estan associats amb nivells alts d'estradiol sèric (Sherman *et al.*, 1997). Histològicament, la majoria dels tumors són de tipus endometrioides i de grau baix; són precedits freqüentment per una hiperplàsia endometrial i es caracteritzen per una prognosi favorable.

En contrast amb l'EEC de tipus I, un 10-20% dels casos de carcinoma endometrial, designats com a carcinomes no endometrioides de

tipus II (NEEC), segueixen una ruta no relacionada amb estrògens i apareixen dins d'una base d'endometri atrofíic. S'esdevenen en dones postmenopàusiques; l'expressió d'ER i PR normalment és negativa o feblement positiva, i els nivells sèrics d'estradiol no són elevats. Normalment són carcinomes serosos papil·lars o de cèl·lules clares de grau cellular elevat, normalment associats a carcinomes intraepitelials endometrials, i es caracteritzen per un desenvolupament clínic agressiu, una disposició molt gran a la disseminació primerenca i una prognosi pobre (Oehler *et al.*, 2003).

La validesa d'aquest model dualístic per al càncer endometrial ha persistit durant més de vint anys (Bokhman, 1983) i, generalment, la diferència entre aquests dos tipus de tumor s'estableix correctament a partir d'una base morfològica (Burton i Wells, 1998). No obstant això, encara queden per aclarir algunes qüestions. Per exemple, cal aclarir si la hiperplàsia atípica hauria de considerar-se neoplàsica o no; queda per solucionar el fet que no tots els carcinomes endometrials casin amb aquest model dualístic, i també la classificació de tots els tumors que mostren característiques immunohistoquímiques i morfològiques mesclades o sobreposades de carcinomes endometrials tant de tipus I com de tipus II. De fet, s'ha proposat que el carcinoma serós ocasional es podria desenvolupar mitjançant la desdiferenciació d'un carcinoma endometriode preexistent (Matias-Guiu *et al.*, 2001).

GENÈTICA MOLECULAR ASSOCIADA AMB EL CARCINOMA ENDOMETRIAL ENDOMETRIOIDE

Recentment, la genètica molecular ens ha proporcionat dades que demostren el model dualístic de la tumorigènesi endometrial, i també algunes pistes que ens permeten especular sobre la seqüència de les alteracions moleculars que defineixen les rutes de tumo-

rigènesi per als carcinomes endometrials de tipus I i II.

S'han postulat dues alteracions genètiques principals com a esdeveniments inicials per a EEC: el silenciament del gen PTEN i la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) en les repeticions de la seqüència de DNA *short-tandem* distribuïdes al llarg del genoma, que conformen els loci del microsatèl·lit. PTEN, un gen supressor tumoral que fa derivar el seu nom del seu domini preservat tirosina-fosfatasa i de la seva homologia de seqüència amb la proteïna de matriu tensina, és el gen alterat més freqüent en el càncer endometrial, i està gairebé restringit a EEC. Fins al 80 % dels casos de carcinoma endometrial mostren una pèrdua d'expressió, deguda principalment a mutacions (Mutter *et al.*, 2000b) i, en menor mesura, a una pèrdua d'heterogeneïtat (LOH) (Simpkins *et al.*, 1998). A més, un subgrup al voltant del 20 % d'aquests tumors amb PTEN alterat presenten hipermetilació del promotor (Salvesen *et al.*, 2001). Cal esmentar que la vertadera transcendència de la metilació del promotor de PTEN és discutida, per tal com hi ha una certa controvèrsia en la bibliografia sobre la possible interferència d'un pseudo-gèn processat de PTEN (psiPTEN) amb PTEN (Zysman *et al.*, 2002). El psiPTEN es localitza al cromosoma 9, la seva seqüència genòmica té una regió d'1,2 kb amb un 98 % d'homologia amb la regió codificadora sencera de PTEN. Tanmateix, el grau elevat d'homologia pot portar a interpretacions errònies, i des que la freqüència de la supressió de PTEN en alguns tipus de tumors és superior a la de les mutacions o delecions de PTEN, és probable que els mecanismes epigenètics, com la hipermetilació de promotors, puguin justificar-ne la desactivació en alguns casos.

La proteïna PTEN té almenys dues funcions bioquímiques: té activitat lípid-fosfatasa i proteïna-fosfatasa. L'activitat lípid-fosfatasa de PTEN té implicacions importants en la ruta de transducció del senyal de la cinasa PI3 (PI3K). Controla negativament la fosfo-

rilació de la PI3, fa minvar els nivells intracel·lulars de PtdIns(3,4,5)P(3) i afecta la ruta de transducció en direcció 3' de la senyalització d'Akt. La progressió del cicle cel·lular s'atura al G1/S, mitjançada, almenys parcialment, a través de l'increment de l'inhibidor de cinasa dependent de ciclina p27. A més, l'apoptosi induïda per agonistes és mitjançada pel PTEN a través de l'increment de la maquinària proapoptòtica, que involucra caspases i BID, i el decrement de les proteïnes antiapoptòtiques, com la Bcl2. L'activitat proteïna-fosfatasa de PTEN està involucrada en la inhibició de la senyalització de MAPK estimulada pel factor de creixement. També, la combinació de les pèrdues d'activitat lípid-fosfatasa i proteïna-fosfatasa de PTEN pot produir un creixement de cèl·lules aberrants i una evasió de l'apoptosi, de la mateixa manera que una disseminació i migració de cèl·lules anormals (Wu *et al.*, 2003).

En relació amb les altres alteracions genètiques associades amb EEC, s'ha proposat que l'acumulació progressiva d'alteracions induïdes per la MSI en gens reguladors importants pot induir la carcinogènesi. La MSI ha estat descrita en un 20-45 % dels casos de què s'ha informat de carcinoma endometrial (MacDonald *et al.*, 2000), i s'ha vist amb major freqüència en EEC —33 % enfront de l'11 % en NEEC; (Catasus *et al.*, 1998). S'ha provat una relació més estreta entre la MSI i els defectes en els gens de reparació de DNA desaparellat (MSH-2, MLH-1, MSH6), els quals codifiquen enzims responsables de la reparació de nucleòtids desaparellats, insercions o delecions produïdes durant la replicació del DNA (Salvesen *et al.*, 2001; Koul *et al.*, 2002; Hardisson *et al.*, 2003). Les deficiències en la reparació dels desaparellaments que subjauen a la MSI sembla que involucren més aviat mecanismes epigenètics, més que no pas mutacions en els gens de reparació del DNA, ja que aquestes es troben en baixa freqüència en casos d'EC. De fet, la inactivació de l'MLH1 mitjançant la hipermetilació de les illes CpG normalment

no metilades del promotor ha estat descrita com la causa més comuna de MSI en carcinomes endometrioides esporàdics (Esteller *et al.*, 1998; Macdonald *et al.*, 2004), seguida de la pèrdua d'expressió de MSH2 i MSH6. Comparant els resultats dels patrons d'hipermetilació del promotor entre els carcinomes endometrials de tipus I i II, es veu que els EEC tenen freqüentment loci de gens hipermetilats, especialment en els promotors dels gens de l'MLH1, l'APC i l'MGMT, mentre que els NEEC no eren metilats sovint (Risinger *et al.*, 2003a).

S'ha descrit que les mutacions al gen de PTEN ocorren amb més freqüència en els tumors amb MSI (60-86 %) que en els que no en tenen (24-35 %); això suggereix que PTEN pot ser objecte de mutacions en un context de reparació deficient de DNA. L'associació de la inactivació de PTEN i la metilació i l'expressió baixa de l'MLH1 sembla que assenta els fonaments per als passos inicials envers la tumorigènesi endometrial endometrioides (Salvesen *et al.*, 2004). A més, s'ha postulat que els precàncers endometrials (per exemple, la neoplàsia intraepitelial endometrial) comparteixen alteracions genètiques comunes amb EEC, incloent-hi mutacions en PTEN i MSI. Les mutacions al gen supressor del tumor de PTEN s'han identificat en endometris amb aparença histològicament normal exposats a estrògens i en un 18-55 % dels casos de precàncer endometrial (Latta i Chapman, 2002). En un altre estudi, Mutter *et al.* van informar d'un 55 % de mutacions de PTEN en precàncers, mentre que els endometris normals no mostraven mutacions de PTEN. Encara que molts precàncers i càncers presentaven una mutació solament en un allel de PTEN, els adenocarcinomes endometrials endometrioides mostraven la pèrdua completa de l'expressió de la proteïna PTEN en un 61 % dels casos, i un 97 % mostraven almenys alguna disminució en l'expressió. Així, la pèrdua de la funció de PTEN pot ser un esdeveniment primerenc en la tumorigènesi endome-

trial, que ocorre en resposta a factors de risc endocrí coneguts (Mutter *et al.*, 2000b). I, de fet, PTEN s'expressa abundantment en la fase d'alts nivells d'estrògens i proliferativa del cicle menstrual normal, cosa que suggereix algun tipus de modulació d'estrògens. A més, els compartiments de l'estroma i de l'epiteli contribueixen als canvis menats per hormones en l'expressió del PTEN endometrial i dedueixen que en condicions hormonals anormals poden, al seu torn, trencar els patrons normals d'expressió de PTEN en aquest teixit (Mutter *et al.*, 2000c). Finalment, Campbell *et al.* van proposar que els receptors d'estrògens eren elements centrals en la ruta de supervivència de la cinasa PI3K/AKT i això implicava que un PTEN inactiu pogués tenir un increment d'AKT activat; van concloure que les mutacions inactivadores podien, de fet, fer que l'endometri fos més sensible a l'estimulació per estrògens (Campbell *et al.*, 2001).

Les alteracions genètiques menors en el carcinoma endometrial endometriode inclouen mutacions en l'oncogen K-Ras, descrites en el 10-30% dels casos de què s'ha informat de carcinoma endometriode, mentre que són gairebé absents en els carcinomes de cèl·lules clares i seroses papil·lars (Lax *et al.*, 2000). El K-Ras codifica una GTPasa plasmàtica petita de membrana intracel·lular, que funciona com a canvi molecular durant la senyalització cel·lular, i que està molt relacionada amb el creixement i la diferenciació dels tumors.

Les proteïnes activadores de GTPases (GAP) finalitzen la senyalització del K-Ras amb l'estimulació de l'activitat intrínseca de la GTPasa; els mutants oncogènics de K-Ras són resistents als GAP i són activats constitutivament. Entre els efectors de K-Ras ben estudiats hi ha les serina-treonina-cinases de la família Raf i la seva diana en direcció 3', la cascada de proteïna-cinases activades per mitògens (MAPK), que té un paper important en l'acció mitogènica del K-Ras oncogènic. L'activació de les MAPK té com a conseqüència la fosforilació i l'activació de factors de trans-

cripció com c-Jun, c-Myc i c-Fos, que causen l'increment en la transcripció de gens associats amb la proliferació cel·lular. El K-Ras també s'uneix directament a la subunitat p110 de la PI3K, incrementa l'activitat lípid-cinasa i pot activar la ruta PKB/Akt antiapoptòtica (Hancock, 2003). S'han trobat mutacions activadores constitutives del K-Ras amb més freqüència en tumors amb MSI, cosa que suggereix que els dos esdeveniments poden tenir lloc simultàniament abans de l'expansió clònica (Lagarda *et al.*, 2001). Continuant amb la mateixa línia d'evidència, la presència de mutacions K-Ras en el 16% dels casos d'hiperplàsia endometrial indica que les mutacions K-Ras poden representar un esdeveniment primerenc dins el subgrup de carcinomes endometrials (Sasaki *et al.*, 1993).

La freqüència de mutacions al gen de la β -catenina, crucial en l'adhesió cel·lular a cel·lula mitjançant un complex amb E-cadherina i en la senyalització cel·lular com a membre de la ruta Wnt, està al voltant del 20% i es troba restringida als carcinomes endometriodes (Machin *et al.*, 2002). Les mutacions en la β -catenina porten a l'acumulació de β -catenina citoplasmàtica. En absència del senyal Wnt, la fosforilació dels llocs d'unió de la β -catenina en APC mitjançant la glicogen-sintasa-cinasa-3 (GSK-3) promou l'associació APC/ β -catenina, que finalment mena a la reducció ràpida de la reserva de β -catenina mitjançant la seva degradació, a través de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Després de l'estimulació de la ruta Wnt, augmenta l'estabilitat de la β -catenina. L'augment de la concentració de β -catenina mena a la seva migració al nucli, on s'uneix a membres de la família TCF/LEF-1 de factors de transcripció (*T cell factor/lymphocyte enhancing factor*) i els activa. La funció de la β -catenina en la tumorigènesi endometriode encara és desconeguda; no s'ha trobat relació entre les mutacions K-Ras o PTEN, ni amb la MSI, cosa que suggereix que la ruta Wnt té un paper independent en el càncer endometrial (Palacios *et al.*, 2001).

Les mutacions al gen supressor de tumors p53 es detecten en un 20 % dels casos de carcinoma endometriode de grau alt, mentre que la hiperplàsia o els carcinomes de grau baix es caracteritzen per una manca de senyal (Lax *et al.*, 2000). A més, no s'ha descrit cap concurrència d'aquells amb les mutacions de PTEN (Koul *et al.*, 2002). De contrast amb tot això, les mutacions p53 s'esdevenen fins en el 90 % dels casos de carcinoma serós, una situació propera a la descrita per a l'oncògen Her2/neu (c-erbB2) que codifica un receptor transmembranós tirosina-cinasa involucrat en la senyalització celular. S'ha informat d'això en el 10-30 % de tots els EC i en el 80 % de les malignitats papil·lars sèriques uterines (Esteller *et al.*, 1995; Saffari *et al.*, 1995; Santin *et al.*, 2002). Les dues alteracions estan associades amb malalties molt avançades i una diagnòsi pobra, i es caracteritzen per un model de progressió alternativa per a carcinomes sèrics, en què la MSI és rara, i també les mutacions en PTEN i K-Ras (Lax, 2004).

Resumint, s'ha proposat un model de progressió per al desenvolupament del carcinoma endometrial basat en les alteracions genètiques ja presents en la hiperplàsia atípica, en l'augment de la naturalesa i la prevalença d'aquestes alteracions genètiques en carcinomes ben diferenciats, comparant-ho amb la hiperplàsia atípica, i en un nombre més elevat d'aberracions cromosòmiques en lesions endometrioides que en hiperplàsies (Lax, 2004) (vegeu la figura 1). Primer, el bagatge genètic ens pot proporcionar informació sobre la susceptibilitat del carcinoma endometrial, especialment informació sobre els gens d'alta penetració (per exemple, els gens de reparació de DNA desaparellat), i també l'estat dels gens de baixa penetració associats amb el metabolisme dels estrògens (Schneider *et al.*, 1984; Esteller *et al.*, 1997c, 1997b). Aquesta hipòtesi proposa una progressió des de la hiperplàsia complexa a la simple com un procés reactiu a causa de l'hiperestrogenisme (Mutter *et al.*, 2000a), mentre que la MSI sembla que defi-

neix la progressió des de la hiperplàsia atípica al carcinoma endometriode (Sun *et al.*, 2002). S'ha demostrat que la detecció de la clonalitat en mostres de biòpsia endometrial obtingudes amb cànula d'aspiració és útil per a la diagnòsi primerenca del càncer endometrial (Esteller *et al.*, 1997a). Les dues alteracions, juntament amb la metilació del promotor de l'MLH1, co-existeixen en la hiperplàsia atípica juntament amb el carcinoma endometrial (Duggan *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1998; Esteller *et al.*, 1999; Kanaya *et al.*, 2003). Les mutacions en el p53 i l'amplificació i sobreexpressió de l'HER2/neu caracteritzen els esdeveniments tardans que tenen lloc durant la progressió i la desdiferenciació del carcinoma endometrial (Rolitsky *et al.*, 1999; Lax *et al.*, 2000). De manera alternativa, aquestes alteracions moleculars tardanes poden definir esdeveniments primerencs *de novo*, que tenen lloc en carcinomes endometrioides escassament diferenciats i en carcinomes serosos en desenvolupament a partir de carcinomes endometrioides, d'acord amb els descobriments obtinguts a partir de carcinomes serosos i endometrioides mixtos (Matias-Guiu *et al.*, 2001).

ORIENTACIONS FUTURES EN LA PATOGÈNESI MOLECULAR DEL CÀNCER ENDOMETRIAL

Malgrat el gran esforç realitzat per desembrallar les alteracions moleculars relacionades amb la tumorigènesi endometrial, i la utilitat clarament demostrada d'aquestes alteracions amb vista a entendre la patogènesi molecular dels carcinomes endometrials, els tumors que no presenten el fenotip MSI o mutacions en algun dels gens esmentats més amunt, donen a entendre l'existència de rutes no reconegudes. Fa molt poc, la tecnologia de microxips de cDNA per a identificar diferències en els patrons d'expressió dels gens entre tipus histològics d'EC ens permetia identificar els gens expressats diferencialment que ens podi-

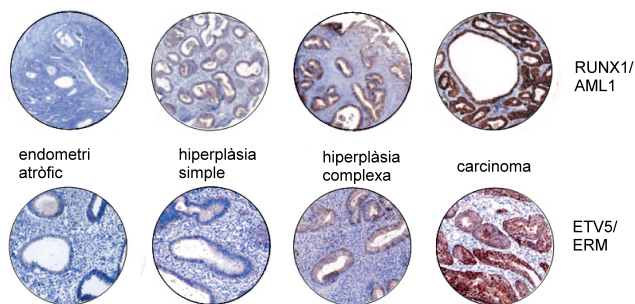


FIGURA 1. Model per a la tumorigènesi endometrial endometriode i les alteracions genètiques implicades en cada pas.

en ajudar a entendre les diferències en la biologia i les conseqüències clíniques dels diferents histiotips. Un article pioner de Mutter *et al.* comparava els patrons d'expressió gènica de teixits endometrials normals i malignes (Mutter *et al.*, 2001). Els gens reactius a hormones, seleccionats mitjançant comparació de subgrups secretoris i proliferatius de l'endometri normal, els van proporcionar una llista de cinquanta gens que discriminava entre grups normals i malignes, amb nivells d'expressió reduïts en els càncers. A més, els tumors s'assemblaven més a l'endometri proliferatiu que al secretori, i la transformació neoplàsica estava acompanyada d'una pèrdua predominant de l'activitat de molts gens expressats constitutivament en teixits provinents de fonts normals i en absència de perfils d'expressió, cosa que caracteritza la resposta antitumorigènica de la progestina (Mutter *et al.*, 2001).

La tecnologia de microxips de cDNA d'alt rendiment s'ha fet servir des de llavors amb l'objectiu de caracteritzar gens o grups de gens que podrien agrupar els diferents histiotips de manera separada entre els diferents càncers endometrials. Risinger *et al.* van descriure, en una anàlisi no supervisada, cent noranta-un gens expressats diferencialment en carcinomes endometrials endometriodes i no endometriodes. Entre aquests, les diferències en vint-i-quatre transcripcions els van permetre de distingir els carcinomes sèrics dels endometriodes. A més, les dades dels

microxips de cDNA van identificar rutes alternatives, cosa que suggeria diverses vies per a la investigació, com ara el silenciament genètic mitjançant per mecanismes epigenètics, la desregulació de les rutes del factor de creixement a causa de les interaccions inapropiades epiteli-estroma, o l'adhesió de cèl·lules desaparellades mitjançant l'expressió alterada de la proteïna *trefoil* intestinal TFF3 (Risinger *et al.*, 2003b). En una altra prova, amb vista a aclarir més endavant els esdeveniments moleculars involucrats en la carcinogènesi endometrial, Cao *et al.* van poder diferenciar entre carcinomes serosos i endometriodes en una anàlisi no supervisada. Les anàlisis supervisades dels dos grups definits portaven a la identificació de tres-cents quinze gens que diferenciaven de manera estadística carcinomes endometrials de tipus I dels de tipus II. A més, per corroborar l'expressió alterada dels marcadors coneguts, els autors van descriure alteracions noves relatives al cicle celular, l'adhesió celular, la transducció de senyals, l'apoptosi i la progressió del tumor (Cao *et al.*, 2004).

Fent un pas més endavant pel que fa als microxips de cDNA i els mecanismes subjacents a la tumorigènesi endometrial, Moreno-Bueno *et al.* van descriure una diferència de dos cops en l'expressió entre EEC i NEEC en seixanta-sis gens durant una anàlisi supervisada de microxips de cDNA que contenien 6.386 gens diferents. Els trenta-un gens incre-

mentats en les EEC n'inclouïen alguns que se sabia que estaven regulats per hormones durant el cicle menstrual i que eren importants en l'homeòstasi endometrial. De manera inversa, dels trenta-cinc gens sobreexpressats en les NEEC, tres gens, *STK15*, *BUB1*, i *CCNB2*, estaven involucrats en la regulació del control del fus mitòtic; i l'amplificació o sobreexpressió d'*STK15*, associada amb aneuploidia i un fenotip agressiu, conduïa a la hipòtesi que les alteracions en el control de la mitosi eren un mecanisme principal de carcinogènesi en NEEC (Moreno-Bueno *et al.*, 2003).

En el nostre grup, ens vam centrar en la identificació de gens nous que poguessin provocar transformació en el càncer endometrial endometrioides (Planaguma *et al.*, 2004). Per a això, vam analitzar els diferents perfils d'expressió gènica d'especimens endometrials tumorals i no tumorals, amb la utilització d'hibridació de xips de cDNA. Entre els cinquanta-tres gens l'expressió dels quals es va trobar alterada en EEC, quaranta-set seqüències de cDNA van ser identificades com a gens coneguts i es van classificar en set categories funcionals: el 9% estaven involucrats en la regulació del cicle i la proliferació cel·lular (per exemple, *DNAJA2*, *RPS4X*); un 17% estava involucrat en la regulació de la transcripció (per exemple, *SNAPC1*, *TCEB3*); un 21% en la senyalització (per exemple, *ADD3*, *NPTX1*); un 6% en trànsit de proteïnes (per exemple, *NCALD*); un 8% en la resposta immunitària (per exemple, *SIAT1*); un 9% corresponien a proteïnes de membrana (per exemple, *MS4A6*) i, finalment, un 19% dels gens estaven involucrats en el metabolisme cel·lular (per exemple, *BTN2A1*). Els dos gens més incrementats eren el protooncogen de la leucèmia mieloide aguda *RUNX1/AML1* (*runt-related transcription factor 1/acute myeloid leukaemia 1*) i l'*ets variant gene 5/ets-related molecule* (*ETV5/ERM*). Les PCR quantitatives en temps real van validar l'increment de *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* en EEC i van demostrar un increment específic i significa-

tivament més potent en els estats tumorals associats amb infiltració miomètrica. A més, la immunohistoquímica en xips de teixits va mostrar que aquest increment es relacionava amb el procés de tumorigènesi de l'endometri normal atròpic a la hiperplàsia simple i complexa i, finalment, al carcinoma (Planaguma *et al.*, 2004, 2005; vegeu la figura 2).

Els nostres resultats ens porten a proposar que *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* poden tenir un cert paper en els esdeveniments primerencs de la tumorigènesi endometrial associada amb infiltració miometrial. Com a factor de transcripció d'unió a DNA, *RUNX1/AML1* pot estar involucrat en la regulació de l'expressió dels gens involucrats en EEC. Els membres de la família *RUNX* han estat implicats en l'activació de la transcripció fent de factors d'organització als promotors i estimuladors de gens diana, en què s'associen amb cofactors i altres factors de transcripció d'unió al DNA requerits per a la regulació gènica (Mao *et al.*, 1999). De manera alternativa, les proteïnes de *RUNX* són repressors potents de la transcripció de manera específica per cèl·lula, i d'això resulta una repressió temporal de la transcripció o un silenciament epigenètic irreversible (Taniuchi i Littman, 2004). En aquest context, s'ha vist que *RUNX1* forma complexos estables amb corepressors, tals com histona-desacetilases i histona-metiltransferases (Durst i Hiebert, 2004). A més, la cinètica de l'expressió de *RUNX1/AML1*, que mostra un pic en estadis primerencs d'invasió miometrial, ens porta a especular que l'increment de *RUNX1/AML1* en EEC pot estar associat amb la metilació dels promotors com a mecanisme per al silenciament transcripcional de gens involucrats en les primeres passes de la invasió tumoral del teixit adjacent. Finalment, no s'exclouen les translocacions dels gens de *RUNX1/AML1* d'una possible implicació en EEC.

D'altra banda, *ETV5/ERM* pertany a la subfamília *PEA3*, inclosa en la família *Ets* de factors de transcripció. Aquesta família està

Un model per a la tumorigènesi endometrial

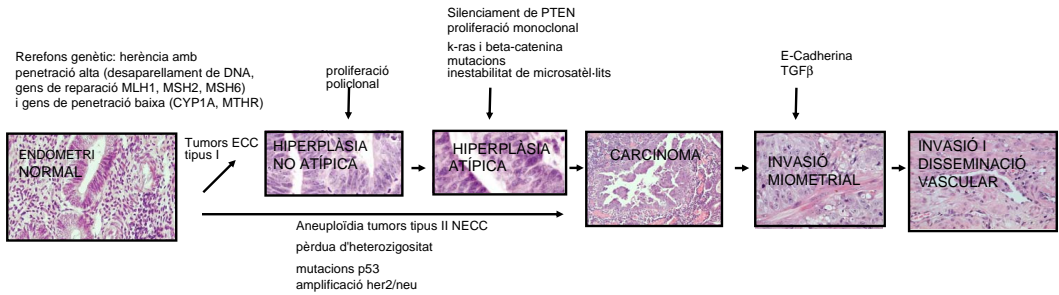


FIGURA 2. Exemples representatius de la gradació d'intensitat immunohistoquímica de RUNX1/AML1 i ETV5/ERM des de l'endometri atrofic fins al carcinoma endometrial endometriode.

caracteritzada per la presència d'uns vuitanta-cinc aminoàcids en un domini d'unió al DNA conservat durant l'evolució que regula l'expressió d'un conjunt de gens mitjançant la unió a un motiu central A/GGAA/T, en cooperació amb altres factors i cofactors de transcripció (Wasylyk *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992). S'ha suggerit que Ets, el fundador de la família Ets, que inclou ETV5/ERM, té un paper en la vascularització i invasió dels tumors mitjançant l'increment en l'expressió de les proteases degradadores de matriu (Takai *et al.*, 2000; Hahne *et al.*, 2005). A més, els elements de PEA3 conservats, que uneixen membres de factors de transcripció d'Ets, s'han trobat en tots els promotors de MMP induïbles (Westermarck i Kahari, 1999). Pel que fa al carcinoma endometrial, es va veure que l'expressió incrementada dels MMP i la progressió del tumor estaven estretament relacionats, i que l'activitat invasiva era dependent de la producció de MMP (Kaya *et al.*, 1996). A més, les gelatinases actives s'han descrit en carcinomes endometrials, i això ha portat a alteracions en el micromedi que promouen la invasió tumoral i la metastasi (Di Nezza *et al.*, 2002). Vam demostrar que ETV5/ERM pot tenir un paper en el canvi inicial envers la infiltració miometrial, mitjançant la inducció de l'expressió dels gens involucrats en el remodelament de la matriu extracel·lular (resultats per publicar).

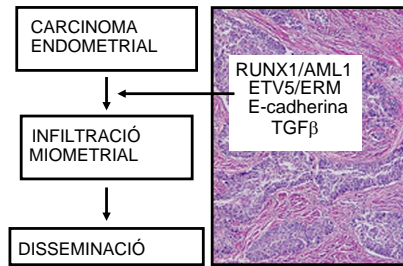


FIGURA 3. Gens associats amb la infiltració miometrial, juntament amb una imatge representativa amb hematoxilina-eosina d'un carcinoma endometrial endometriode en estadi IC infiltrador.

Per acabar, el fet que tant l'expressió gènica com els perfils de nivell de proteïna per a ERM/ETV5 fossin semblants als trobats en RUNX1/AML1 en EEC, ens porta a analitzar estadísticament la magnitud i la direcció de l'associació entre els dos gens. Fent servir el test d'Spearman i l'anàlisi de Wilcoxon, ambdós mitjançant RT-Q-PCR ($p < 0,001$) i TMA ($p < 0,0001$), vam trobar que l'increment de RUNX1/AML1 es relacionava significativament amb el d'ERM/ETV5 (Planaguma *et al.*, 2005). Aquesta possible interacció es veia reforçada amb l'observació que NERF-2, un membre nou de la família de factors de transcripció Ets, estava unit a RUNX1/AML1 mitjançant un lloc d'interacció situat en una regió bàsica cap a l'extrem 5' del domini Ets (Cho *et*

al., 2004). A més, s'ha vist que l'activitat d'unió al DNA del factor de transcripció Ets-1 estava modulada mitjançant una interacció flexible amb RUNX1/AML1 i ETV5/ERM durant els esdeveniments primerencs de la tumorigènesi endometrial, cosa que es pot associar amb un canvi inicial a la infiltració miometrial. L'expressió de l'E-cadherina també es va relacionar positivament amb la invasió miometrial (Mell *et al.*, 2004). A més, les alteracions en l'expressió de SMAD4 i TGF- β RII, i també la localització dels SMAD, pot ser important en les infiltracions de la paret miometrial mitjançant carcinomes endometrials de tipus I (Pistrzeniewicz-Ulanska *et al.*, 2004). Finalment, la invasió miometrial de càncers endometrials implicava un augment en l'activitat de la gelatina, regulada fins a cert punt pel TGF- β 1, de manera autocrina o paracrina (Yabushita *et al.*, 2000) (vegeu la figura 3).

CONCLUSIÓ

Avui dia, i gràcies principalment a l'aparició primerenca de símptomes tals com la metrorràgia postmenopàusica, el 80 % dels casos d'EEC es diagnostiquen en l'estadi I FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), amb bona resposta al tractament quirúrgic. L'estadi I FIGO comprèn tres subtipus determinats per l'existència d'endometria afectada (estadi IA) i infiltració miometrial per sota o per damunt del 50 % (estadis IB i IC, respectivament). L'estadi IC està relacionat amb tumors més indiferenciats, invasió limfovascular i complicacions en els ganglis limfàtics en un 10-20 %. El grup darrer és el dels pacients amb un risc més elevat de recurrència entre els carcinomes d'estadi I i el dels que reben tractament adjuvant després de la cirurgia, gairebé sempre basat en la radioteràpia. En aquest context, la caracterització de RUNX1/AML1 durant les passes inicials envers la infiltració miometrial representa un exemple de la utilitat dels cribratges genètics

grans en la comprensió del procés de tumorigènesi des de les primeres passes de la invasió. Mitjançant la combinació de cribratges grans de microxips de cDNA amb la microdissecció d'àrees tumorals corresponents al front invasiu, en tots els estats d'EEC des de l'I al III, el resultat hauria de ser un perfil diferencial d'expressió gènica associat amb el càncer endometrial endometriode centrat en la invasió. Idealment, això hauria de concloure amb la validació de marcadors nous, amb vista a la propera estratificació dels subtipus de càncer endometrial, a fi de millorar l'impacte del diagnòstic i dotar-nos d'objectius nous per a la teràpia.

AGRAÏMENTS

Els autors volen agrair el finançament rebut per a aquesta recerca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (beques 99/08:97, 01/10076, 02/0733), del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (beques SGR00231, 00391), de l'Institut de Salut Carlos III (Red de Genómica del Cáncer y Genotipado de Tumores C03/10), del Ministeri d'Educació i Ciència (SAF2005-06771) i de l'Institut Català de la Salut.

BIBLIOGRAFIA

- BOKHMANN, J. V. (1983). «Two pathogenetic types of endometrial carcinoma». *Gynecol. Oncol.*, 15: 10-17.
- BURTON, J. L.; WELLS, M. (1998). «Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium». *Histopathology*, 33: 297-303.
- CAMPBELL, R. A.; BHAT-NAKSHATRI, P.; PATEL, N. M.; CONSTANTINIDOU, D.; ALI, S.; NAKSHATRI, H. (2001). «Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance». *J. Biol. Chem.*, 276: 9817-9824.
- CAO, Q. J.; BELBIN, T.; SOCCI, N.; BALAN, R.; PRYSTOWSKY, M. B.; CHILDS, G.; JONES, J. G. (2004). «Distinctive gene expression profiles by cDNA microarrays in endometrioid and serous carcinomas of the endometrium». *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 23: 321-329.

- CATASUS, L.; MACHIN, P.; MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J. (1998). «Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases». *Hum. Pathol.*, 29: 1160-1164.
- CHO, J. Y.; AKBARALI, Y.; ZERBINI, L. F. G.; GU, X.; BOLTAX, J.; WANG, Y. [et al.] (2004). «Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific blk gene». *J. Biol. Chem.*, 279: 19512-19522.
- DI NEZZA, L. A.; MISAJON, A.; ZHANG, J.; JOBLING, T.; QUINN, M. A.; OSTOR, A. G. [et al.] (2002). «Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion». *Cancer*, 94: 1466-1475.
- DUGGAN, B. D.; FELIX, J. C.; MUDERSPACH, L. I.; TSAO, J. L.; SHIBATA, D. K. (1994). «Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma». *Cancer Res.*, 54: 1604-1607.
- DURST, K. L.; HIEBERT, S. W. (2004). «Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing». *Oncogene*, 23: 4220-4224.
- ESTELLER, M.; CATASUS, L.; MATIAS-GUIU, X.; MUTTER, G. L.; PRAT, J.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. (1999). «hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis». *Am. J. Pathol.*, 155: 1767-1772.
- ESTELLER, M.; GARCIA, A.; MARTINEZ I PALONES, J. M.; CABERO, A.; REVENTOS, J. (1995). «Detection of c-erbB-2/neu and fibroblast growth factor-3/INT-2 but not epidermal growth factor receptor gene amplification in endometrial cancer by differential polymerase chain reaction». *Cancer*, 75: 2139-2146.
- ESTELLER, M.; GARCIA, A.; MARTINEZ-PALONES, J. M.; XERCAVINS, J.; REVENTOS, J. (1997a). «Detection of clonality and genetic alterations in endometrial pipelle biopsy and its surgical specimen counterpart». *Lab. Invest.*, 76: 109-116.
- (1997b). «Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility». *Carcinogenesis*, 18: 2307-2311.
- (1997c). «Susceptibility to endometrial cancer: influence of allelism at p53, glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and cytochrome P-450 (CYP1A1) loci». *Br. J. Cancer*, 75: 1385-1388.
- ESTELLER, M.; LEVINE, R.; BAYLIN, S. B.; ELLENSON, L. H.; HERMAN, J. G. (1998). «MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas». *Oncogene*, 17: 2413-2417.
- GARVIE, C. W.; PUFALL, M. A.; GRAVES, B. J.; WOLBERGER, C. (2002). «Structural analysis of the autoinhibition of Ets-1 and its role in protein partnerships». *J. Biol. Chem.*, 277: 45529-45536.
- HANCOCK, J. F. (2003). «Ras proteins: different signals from different locations». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 373-384.
- HAHNE, J. C.; OKUDUCU, A. F.; KAMINSKI, A.; FLORIN, A.; SONCIN, F.; WERNERT, N. (2005). «Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth». *Oncogene*, 24: 5384-5388.
- HARDISSON, D.; MORENO-BUENO, G.; SANCHEZ, L.; SARRIO, D.; SUAREZ, A.; CALERO, F.; PALACIOS, J. (2003). «Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability». *Mod. Pathol.*, 16: 1148-1158.
- KANAYA, T.; KYO, S.; MAIDA, Y.; YATABE, N.; TANAKA, M.; NAKAMURA, M.; INOUE, M. (2003). «Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers». *Oncogene*, 22: 2352-2360.
- KAYA, M.; YOSHIDA, K.; HIGASHINO, F.; MITAKA, T.; ISHII, S.; FUJINAGA, K. (1996). «A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells». *Oncogene*, 12: 221-227.
- KOUL, A.; WILLEN, R.; BENDAHL, P. O.; NILBERT, M.; BORG, A. (2002). «Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis». *Cancer*, 94: 2369-2379.
- LAGARDA, H.; CATASUS, L.; ARGUELLES, R.; MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J. (2001). «K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability». *J. Pathol.*, 193: 193-199.
- LATTA, E.; CHAPMAN, W. B. (2002). «PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia». *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 14: 59-65.
- LAX, S. F. (2004). «Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification». *Virchows Arch.*, 444: 213-223.
- LAX, S. F.; KENDALL, B.; TASHIRO, H.; SLEBOS, R. J.; HEDRICK, L. (2000). «The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways». *Cancer*, 88: 814-824.
- LAX, S. F.; KURMAN, R. J. (1997). «A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses». *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 81: 228-232.
- LAX, S. F.; PIZER, E. S.; RONNETT, B. M.; KURMAN, R. J. (1998). «Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation». *Hum. Pathol.*, 29: 924-931.
- LEVINE, R. L.; CARGILE, C. B.; BLAZES, M. S.; REES, B. VAN; KURMAN, R. J.; ELLENSON, L. H. (1998). «PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma». *Cancer Res.*, 58: 3254-3258.
- MACDONALD, N. D.; SALVESEN, H. B.; RYAN, A.; IVERSEN,

- O. E.; AKSLEN, L. A.; JACOBS, I. J. (2000). «Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas». *Cancer Res*, 60: 1750-2.
- MACDONALD, N. D.; SALVESEN, H. B.; RYAN, A.; MALATOS, S.; STEFANSSON, I.; IVERSEN, O. E.; AKSLEN, L. A.; DAS, S.; JACOBS, I. J. (2004). «Molecular differences between RER+ and RER- sporadic endometrial carcinomas in a large population-based series». *Int. J. Gynecol. Cancer*, 14: 957-965.
- MACHIN, P.; CATASUS, L.; PONS, C.; MUNOZ, J.; MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J. (2002). «CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas». *Hum. Pathol.*, 33: 206-212.
- MAO, S.; FRANK, R. C.; ZHANG, J.; MIYAZAKI, Y.; NIMER, S. D. (1999). «Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8,21)-positive leukemias». *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3635-3644.
- MATIAS-GUIU, X.; CATASUS, L.; BUSSAGLIA, E.; LAGARDA, H.; GARCIA, A.; PONS, C.; MUNOZ, J.; ARGUELLES, R.; MACHIN, P.; PRAT, J. (2001). «Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma». *Hum. Pathol.*, 32: 569-577.
- MELL, L. K.; MEYER, J. J.; TRETIAKOVA, M.; KHRAMTSOV, A.; GONG, C.; YAMADA, S. D.; MONTAG, A. G.; MUNDT, A. J. (2004). «Prognostic significance of E-cadherin protein expression in pathological stage I-III endometrial cancer». *Clin. Cancer Res.*, 10: 5546-5553.
- MORENO-BUENO, G.; SANCHEZ-ESTEVEZ, C.; CASSIA, R.; RODRIGUEZ-PERALES, S.; DIAZ-URIARTE, R.; DOMINGUEZ, O.; HARDISSON, D.; ANDUJAR, M.; PRAT, J.; MATIAS-GUIU, X.; CIGUDOSA, J. C.; PALACIOS, J. (2003). «Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas». *Cancer Res.*, 63: 5697-5702.
- MUTTER, G. L.; BAAK, J. P.; CRUM, C. P.; RICHART, R. M.; FERENCZY, A.; FAQUIN, W. C. (2000a). «Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry». *J. Pathol.*, 190: 462-469.
- MUTTER, G. L.; BAAK, J. P.; FITZGERALD, J. T.; GRAY, R.; NEUBERG, D.; KUST, G. A.; GENTLEMAN, R.; GULLANS, S. R.; WEI, L. J.; WILCOX, M. (2001). «Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation». *Gynecol. Oncol.*, 83: 177-185.
- MUTTER, G. L.; LIN, M. C.; FITZGERALD, J. T.; KUM, J. B.; BAAK, J. P.; LEES, J. A.; WENG, L. P.; ENG, C. (2000b). «Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers». *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 924-930.
- MUTTER, G. L.; LIN, M. C.; FITZGERALD, J. T.; KUM, J. B.; ENG, C. (2000c). «Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85: 2334-2338.
- OEHLER, M. K.; BRAND, A.; WAIN, G. V. (2003). «Molecular genetics and endometrial cancer». *J. Br. Menopause Soc.*, 9: 27-31.
- PALACIOS, J.; CATASUS, L.; MORENO-BUENO, G.; MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J.; GAMALLO, C. (2001). «Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability». *Virchows Arch.*, 438: 464-469.
- PIESTRZENIEWICZ-ULANSKA, D.; BRYN, M.; SEMCZUK, A.; RECHBERGER, T.; JAKOWICKI, J. A.; KRAJEWSKA, W. M. (2004). «TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas». *Gynecol. Oncol.*, 95: 173-180.
- PLANAGUMA, J.; DIAZ-FUERTE, M.; GIL-MORENO, A.; ABAL, M.; MONGE, M.; GARCIA, A.; BARO, T.; THOMSON, T. M.; XERCAVINS, J.; ALAMEDA, F.; REVENTOS, J. (2004). «A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma». *Cancer Res.*, 64: 8846-8853.
- PLANAGUMA, J.; ABAL, M.; GIL-MORENO, A.; DIAZ-FUERTE, M.; MONGE, M.; GARCIA, A. [et al.] (2005). «ERM/ETV5 Up-regulation correlates to infiltration stages in endometrioid endometrial carcinoma». *Journal of Pathology*, 207: 422-429.
- POTISCHMAN, N.; HOOVER, R. N.; BRINTON, L. A.; SIITERI, P.; DORGAN, J. F.; SWANSON, C. A.; BERMAN, M. L.; MORTEL, R.; TWIGGS, L. B.; BARRETT, R. J.; WILBANKS, G. D.; PERSKY, V.; LURAIN, J. R. (1996). «Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer». *J. Natl. Cancer Inst.*, 88: 1127-1135.
- RISINGER, J. I.; MAXWELL, G. L.; BERCHUCK, A.; BARRETT, J. C. (2003a). «Promoter hypermethylation as an epigenetic component in Type I and Type II endometrial cancers». *Ann. NY Acad. Sci.*, 983: 208-212.
- RISINGER, J. I.; MAXWELL, G. L.; CHANDRAMOULI, G. V.; JAZAERI, A.; APRELIKOVA, O.; PATTERSON, T.; BERCHUCK, A.; BARRETT, J. C. (2003b). «Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer». *Cancer Res.*, 63: 6-11.
- ROLITSKY, C. D.; THEIL, K. S.; MCGAUGHY, V. R.; COPELAND, L. J.; NIEMANN, T. H. (1999). «HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma». *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 18: 138-143.
- SAFFARI, B.; JONES, L. A.; EL-NAGGAR, A.; FELIX, J. C.; GEORGE, J.; PRESS, M. F. (1995). «Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival». *Cancer Res.*, 55: 5693-5698.
- SALVESEN, H. B.; MACDONALD, N.; RYAN, A.; JACOBS, I. J.; LYNCH, E. D.; AKSLEN, L. A.; DAS, S. (2001). «PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma». *Int. J. Cancer*, 91: 22-26.
- SALVESEN, H. B.; STEFANSSON, I.; KRETZSCHMAR, E. I.; GRUBER, P.; MACDONALD, N. D.; RYAN, A.; JACOBS, I. J.; AKSLEN, L. A.; DAS, S. (2004). «Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based

- study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression». *Int. J. Oncol.*, 25: 1615-1623.
- SANTIN, A. D.; BELLONE, S.; GOKDEN, M.; PALMIERI, M.; DUNN, D.; AGHA, J.; ROMAN, J. J.; HUTCHINS, L.; PECORELLI, S.; O'BRIEN, T.; CANNON, M. J.; PARHAM, G. P. (2002). «Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer». *Clin. Cancer Res.*, 8: 1271-1279.
- SASAKI, H.; NISHII, H.; TAKAHASHI, H.; TADA, A.; FURUSATO, M.; TERASHIMA, Y.; SIEGAL, G. P.; PARKER, S. L.; KOHLER, M. F.; BERCHUCK, A. [et al.] (1993). «Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma». *Cancer Res.*, 53: 1906-1910.
- SCHNEIDER, J.; HUH, M. M.; BRADLOW, H. L.; FISHMAN, J. (1984). «Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells». *J. Biol. Chem.*, 259: 4840-4845.
- SHERMAN, M. E.; STURGEON, S.; BRINTON, L. A.; POTISCHMAN, N.; KURMAN, R. J.; BERMAN, M. L.; MORTEL, R.; TWIGGS, L. B.; BARRETT, R. J.; WILBANKS, G. D. (1997). «Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas». *Mod. Pathol.*, 10: 963-968.
- SIMPKINS, S. B.; PEIFFER-SCHNEIDER, S.; MUTCH, D. G.; GERSSELL, D.; GOODFELLOW, P. J. (1998). «PTEN mutations in endometrial cancers with 10q LOH: additional evidence for the involvement of multiple tumor suppressors». *Gynecol. Oncol.*, 71: 391-395.
- SUN, H.; ENOMOTO, T.; SHROYER, K. R.; OZAKI, K.; FUJITA, M.; UEDA, Y.; NAKASHIMA, R.; KURAGAKI, C.; UEDA, G.; MURATA, Y. (2002). «Clonal analysis and mutations in the PTEN and the K-ras genes in endometrial hyperplasia». *Diagn. Mol. Pathol.*, 11: 204-211.
- TAKAI, N.; MIYAZAKI, T.; FUJISAWA, K.; NASU, K.; MIYAKAWA, I. (2000). «Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma». *Cancer*, 89: 2059-2067.
- TANIUCHI, I.; LITTMAN, D. R. (2004). «Epigenetic gene silencing by RUNX proteins». *Oncogene*, 23: 4341-4345.
- WANG, C. Y.; PETRYNIAK, B.; HO, I. C.; THOMPSON, C. B.; LEIDEN, J. M. (1992). «Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities». *J. Exp. Med.*, 175: 1391-1399.
- WASYLYK, C.; GUTMAN, A.; NICHOLSON, R.; WASYLYK, B. (1991). «The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins». *EMBO J.*, 10: 1127-1134.
- WEIDERPASS, E.; ADAMI, H. O.; BARON, J. A.; MAGNUSON, C.; BERGSTROM, R.; LINDGREN, A.; CORREIA, N.; PERSSON, I. (1999). «Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins». *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 1131-1137.
- WESTERMARCK, J.; KAHARI, V. M. (1999). «Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion». *FASEB J.*, 13: 781-792.
- WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F. G. (2003). «PTEN signaling pathways in melanoma». *Oncogene*, 22: 3113-3122.
- YABUSHITA, H.; NARUMIYA, H.; HIRATAKE, K.; YAMADA, H.; SHIMAZU, M.; SAWAGUCHI, K.; NOGUCHI, M.; NAKANISHI, M. (2000). «The association of transforming growth factor-beta 1 with myometrial invasion of endometrial carcinomas through effects on matrix metalloproteinase». *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 26: 163-170.
- ZYSMAN, M. A.; CHAPMAN, W. B.; BAPAT, B. (2002). «Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene». *Am. J. Pathol.*, 160: 795-800.