



Universitat de Lleida

Aplicación de los Péptidos de Penetración Celular y de la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 en la modelización in vivo de carcinomas uterinos

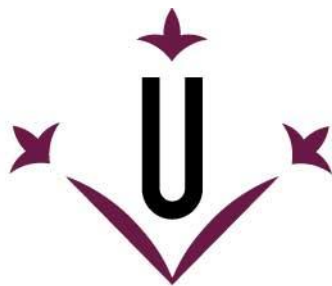
Raúl Navaridas Fernández de Bobadilla

<http://hdl.handle.net/10803/674992>

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

TESIS DOCTORAL

**Aplicación de los Péptidos de Penetración
Celular y de la herramienta de edición génica
CRISPR/Cas9 en la modelización *in vivo* de
carcinomas uterinos**

Raúl Navaridas Fernández de Bobadilla

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Lleida

Programa de Doctorado en Salud

Directores

Dr. Xavier Dolcet Roca

Dr. Xavier Matías-Guiu Guia

Tutor

Dr. Xavier Dolcet Roca

2022



Universitat de Lleida

**Aplicación de los Péptidos de
Penetración Celular y de la
herramienta de edición génica
CRISPR/Cas9 en la modelización
in vivo de carcinomas uterinos**

Raúl Navaridas Fernández de Bobadilla

2022



Universitat de Lleida

El Dr. **Xavier Dolcet Roca** y el Dr. **Xavier Matías-Guia Guia**, catedráticos de Anatomía Patología de la Universidad de Lleida,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral que lleva como título “**Aplicación de los Péptidos de Penetración Celular y de la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 en la modelización in vivo de carcinomas uterinos**” desarrollada y presentada por **Raúl Navaridas Fernández de Bobadilla** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Lleida, ha sido realizada bajo su supervisión y dirección, cumpliendo todos los requisitos necesarios para ser defendida delante del tribunal de evaluación correspondiente.

Y firman la presente tesis a efectos oportunos en Lleida, de junio de 2022

Director y tutor

Dr. Dolcet Roca

Director

Dr. Matías-Guiu Guia

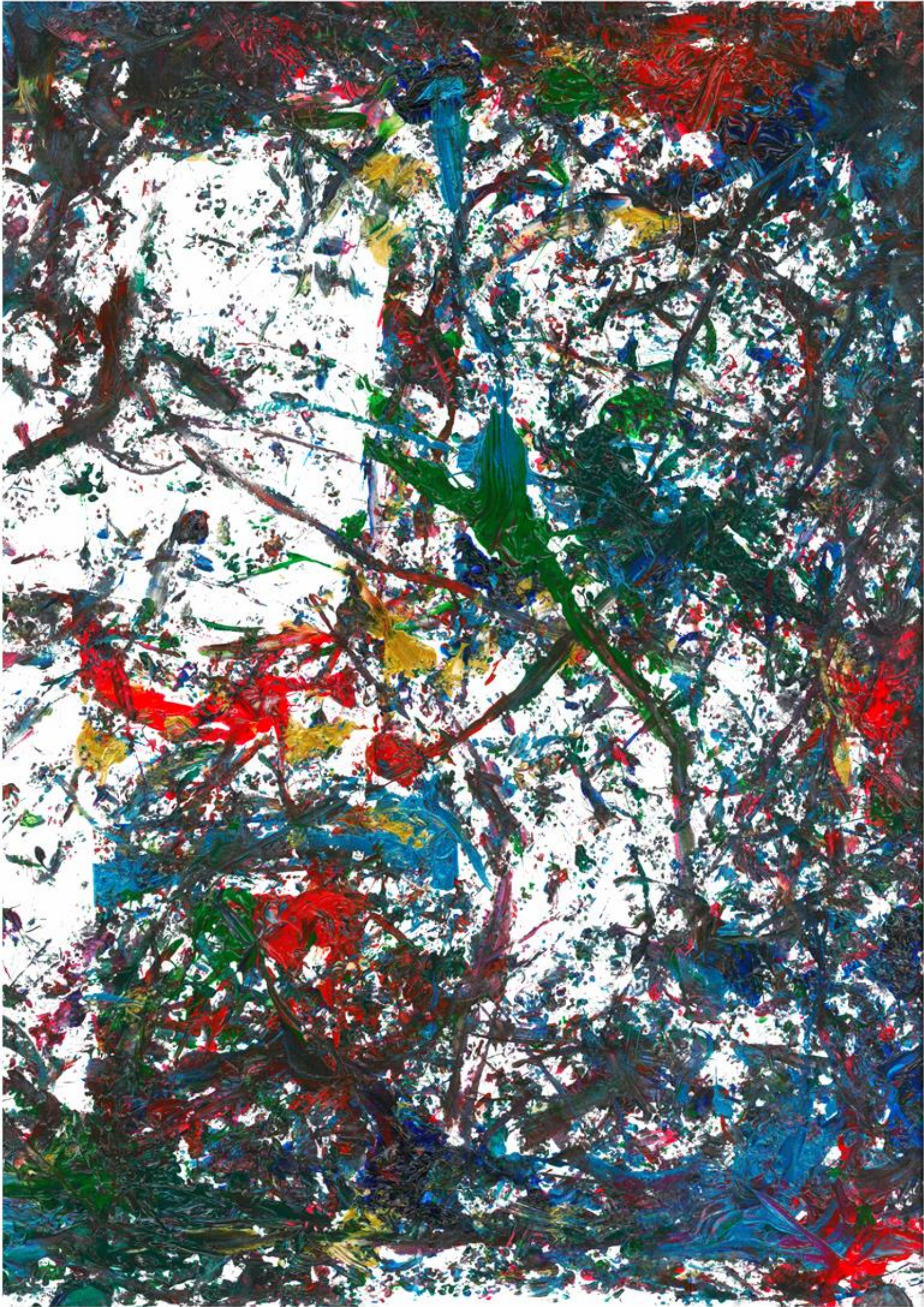
*"Si puedes soñarlo puedes hacerlo,
recuerda que todo esto comenzó con un ratón"*

Walter Elias Disney

A mis padres

A mis abuelos

A mi familia



AGRADECIMIENTOS

“En momentos como este, mi amigo Timón siempre dice que hay que dejar lo atrasado en el pasado”

Pumba (El rey león)

Y llegó el día....El momento de escribir los Agradecimientos, esa parte de la tesis que unos escriben, otros no, pero que si decides hacerlos, sabes que éste será el único apartado que todo el mundo que algún día tenga entre sus manos esta tesis se acabará leyendo, no nos vamos a engañar. Parece mentira sí, pero dentro de unos días una parte del esfuerzo de tantos años se verá reflejado en este "totxete". Solo queda unir unos archivos, imprimir y a disfrutar. Desde aquí te aviso que son largos, sí, pero al igual que el resto de la tesis, no estás obligado a leerlos, así que desde esta frase lees bajo tu responsabilidad (no quiero oír eso de... ¡que largos!, aunque es probable que ya me lo hayas dicho).

Sé que son muchos los años que llevo rulando por el edificio del IRBLleida, de hecho, en unas semanas hacen los... ¡7 años!, pero para aquellos que estéis leyendo esto y estéis empezando, deciros que esta grata experiencia se pasa en un abrir y cerrar de ojos, así que aprovechadla al máximo. Para mí ya se acaba esta etapa que comencé en 2015 siendo un chavalín de 19 años que quería hacer unas prácticas en un laboratorio para ver si era lo que le gustaba. En resumen esta etapa la definiría como intensa, donde vives en una montaña rusa de sentimientos (la mayoría muy buenos,... no os vayáis a pensar), pero ser estudiante de doctorado no es fácil, de hecho acabas sufriendo una especie de síndrome de Estocolmo con el proyecto de tu tesis y con el laboratorio; te tienen retenido, lo sabes, no te importa e incluso te acaba gustando. De hecho, a toro pasado volvería a repetirla "amb els ulls tancats".

Una tesis no es trabajo individual, en ella disfrutas con el trabajo del día a día, y esto se logra gracias a que estas rodeado de gente excepcional. Por ello antes de acabar este librito, os quería dar las gracias a todos los que me habéis acompañado y sufrido durante este tiempo, dentro y fuera del laboratorio, que como os podéis imaginar en 7 años no han sido pocos (de ahí que sean tan largos). Además no es por echarme flores pero creo que tengo que ser muy buena persona porque la lista de buenos amigos a los que tengo que agradecer ocupa casi dos hojas. Espero no haberme dejado a nadie, y si lo he hecho no ha sido con intención ninguna. Si alguien se echa de menos que me lo diga y como premio de consolación le invito a unas cervezas el GRAN DÍA. Mi intención es ser capaz de escribir de cada uno de vosotros lo que habéis representado para mí durante estos años, para que cuando dentro de un tiempo lea estas líneas, me recuerden las experiencias vividas y me hagan sacar una sonrisa y alguna lagrimilla. No prometo nada. Después de escribir la tesis mi inspiración y memoria no están en sus mejores momentos. ¡De hecho ésta no es la primera versión de agradecimientos! Pero de hoy no pasa que acabe con ellos, ¡al lio!

En primer lugar, querría agradecer a la Universidad de Lleida y su personal de Gestión de Ayudas, al IRBLleida, a la AGAUR y al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por permitirme hacer esta tesis y por haber sido mis mecenas durante este periodo... espero que nadie considere que he sido un gasto inútil, porque gastar he gastado, pero también le he sacado provecho.

Ahora tocaría agradecer a los directores, pero permitidme agradecer antes a "alguien" que realmente me ha acompañado durante todos estos años, día a día, noche a noche (24/7 todo el mes), a mi compañero fiel de tesis, *Mus Musculus*, vamos los ratones. Por mis manos han pasado tantos que si lo pongo por escrito estaría condenado al infierno roedor, pero poca gente entenderá la relación y cariño que se acaba estableciendo con esta especie. Literalmente, sin ellos, NADA de esta tesis hubiera sido posible. Gracias. Además ahora puedo decir con conocimiento de causa eso de "sabes más que un ratón colorao", y sí, porque aunque no os lo creáis existen ratones rojos!!!!.

Ahora sí, a mis directores de tesis, al Dr. Xavier Matías-Guiu por dejarme formar parte de su grupo, debido a las circunstancias no hemos podido pasar mucho tiempo juntos, he de reconocer que en gran parte por mí, ya que cada vez que me veías por los pasillos manifestabas el deseo de diagnosticar mis ratones con un... “Dr. Navaridas a ver cuándo me enseña esas laminillas!!”, pero a mí, remolón, me costaba pedir cita, en parte por no hacerle perder tiempo con resultados de los cuales yo ya sabía la respuesta....cáncer no invasivo. Pero aunque ha costado... ¡Al final lo conseguimos! Gracias por todas esas sesiones de diagnóstico de casos en las se plasmaba la ilusión y pasión que tiene por lo que hace y que poco a poco se me han acabado pegando. Gracias por enseñarme todo lo que hoy se de patología e histología, y te aseguro que no es poco. Al Dr. Xavier Dolcet, vamos, Xavi, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, a pensar por mí mismo, a resolver problemas y a otras muchas cosas más. Siempre me has dejado llevar a cabo las ideas que me surgían de un día para otro, algunas buenas otras no tanto, pero tú por muy locas que fueran me dejabas probarlas (ovariectomías, decidualización, xenos, tratamientos,...), probablemente algunas ya supieras que no funcionarían al momento de decírtelas, pero que no pusieras barreras a mi imaginación creo que me ha permitido disfrutar del laboratorio y madurar laboralmente, y eso que desde el día uno que nos daban un proyecto te salía la vena catalana y ya comenzabas a decir que íbamos justos de dinero...jajajaja. Hemos pasado muchas horas y cosas juntos, de hecho en muchos momentos he dejado de verte como un jefe para pasar a ser un compañero más del laboratorio, prueba de ello es que en algún momento has conocido de primera mano mi “carácter norteamericano”. Gracias por confiar en mí y valorar mi trabajo. Pero sobre todo, quería agradecerte la proximidad en momentos complicados. Deseo que vaya todo muy bien de aquí en adelante y espero que a partir de ahora se abran muchas botellas de champán en el laboratorio.

Como muchos de vosotros sabréis de primera mano, la ciencia no se hace sola, y para que ésta fluyera mejor, yo, un afortunado, no he podido tener mayor suerte que haberme rodeado de compañeros, mejor dicho, amigos, durante todo mi camino. En especial, a todos los que me han ido acompañando dentro del laboratorio de los PATONCOS. Porque sí, de todos he ido absorbiendo conocimientos y experiencias que me han hecho ser lo que hoy soy. Desde una chica gallega, Cris Mirantes, a la que vi elegir su “bonito y blanco” vestido de novia, la cual me dijo el primer día: “no te asustes hoy te parecen todos unos locos, pero mañana tú serás uno más de ellos” y, siguiendo su profecía, así he cumplido; hasta nuevas incorporaciones a las que he tenido que enseñar todos o gran parte de mis conocimientos, de los que, si algo he sacado en claro, es que enseñar también es aprender. Y enseñar a gente os aseguro que he enseñado... y cada vez que lo hacía no podía quitarme de la cabeza a mi maestra, Mari Alba, ella, fue por allí en 2015/16 la que me enseñó muchas de las cosas que se sobre los ratones, desde como cogerlos (he de confesar que los cogía a zarpazos) a cómo hacerles hasta COLONOSCOPIAS! El tiempo ha pasado y la chica que me enseñó, ahora es una señora embarazada..., todavía no me cabe en la cabeza... (Pero si solo fuera ella, porque de mis primeros años en el IRBLleida el único o casi que o no se ha prometido o no ha sido padre/madre he sido yo....). Saltándome un poco el orden cronológico, aunque no del todo ya que literalmente lleva más años en el IRB que yo, me gustaría dar las gracias a Maria, la Mery, como decía antes, enseñando se aprende, y yo contigo he aprendido muchísimo, gracias por ayudarme en todo momento, no he podido pedir mejor relevo. ¡¡¡ADVERTENCIA!!! Parece una chica tímida, pero en realidad es una chica de café solo, copa y puro, y como a los Gremlins (por edad ella igual ni los conoce) hay sustancias líquidas (y Aida!) que le hacen ser un ser totalmente desinhibido y malévolo, cuidado, cuando veáis a las Merys juntas CORRER!. De nuevo, gracias por todo, espero no dejarte muchos marrones cuando me vaya. ¡Perdón por adelantado! De los PATONC, he hecho mi familia

lleidatana, por un lado, la Núria, como yo le llamo cariñosamente “Eritjota”, ella ha sido un hombro donde apoyarme (literalmente...) y pedir consejo, una amiga, una fuente de cotilleos (de los que a mí me gustan jejeje). Si hablo de familia, mi madre lleidatana es Izaskun, la sudaca vasca, con la que he compartido codo con codo en el laboratorio momentos únicos e irrepetibles (y espero que no se repitan!!!, porque a Dios pongo por testigo que jamás volveré a tocar un ratón CD45 ni una médula ósea). Con ella no solo he vivido momentos científicos, puesto que ha hecho de su familia, mi familia, llevándome a excursiones, celebraciones y demás eventos familiares como uno más de los suyos, y que te pase eso en una ciudad que no es la tuya es de agradecer. Allí donde ponga el huevo a partir de ahora, tú y tu familia tendréis una casa donde quedaros, de momento solo puedo ofreceros Logroño, ¡que no es poco! Gracias también a Isidre, el Dandy del grupo, ninguna mujer de la segunda planta pudo, ha podido, ni podrá escapar a sus encantos, sino que se lo pregunten a Aida (o al menos así lo cree él y de momento dejaremos que lo siga pensando). De ti aprendí como ser un buen hermano mayor del laboratorio, siempre atento y disponible, capaz de dejar tus cosas con tal de ayudarme con las mías. Como la parte latina ya la teníamos cubierta, el toque exótico oriental de la familia Patonco lo pone Andree, no sé cuántas madres tiene, porque domina seis o siete idiomas maternos. Echaré de menos las charlas en tu despacho, los consejos científicos y personales, pero principalmente tus panes caseros, tus galletitas libanesas de dátiles y todas las comidas, siempre sanas, que me has suministrado mientras escribía esta tesis. À bientôt!!.

Gracias a Marta Hereu, gracias a ti sé cosas como por ejemplo como es la flor de la burundanga, de ti siempre recordaré las caras de incredulidad y asombro que pones desde tu tranquilo rincón cada vez que escuchas las locas cosas y planes que hacemos y decimos en el otro lado del laboratorio (creo que eres una de las pocas que conserva algo de cordura). Gracias a Anna Ruiz, la ilustrada del grupo, tanto es así que su tesis será su segundo libro escrito. Contigo como coetánea, he vivido momentos muy buenos en el laboratorio y fuera de él, sé que siempre que te necesite estarás allí (y lo mismo yo para ti), aunque hemos de confesar que, debido a nuestros fuertes caracteres, en veces contadas, aunque solo fuera por unos segundos, nos hubiéramos puesto un biombo entre los ordenadores para no vernos (pero eso es normal entre gente que pasa tanto tiempo espalda con espalda y codo con codo). Gracias a Anna Macià, tu ilusión por la ciencia anima al predoc más desanimado, y si no, ¿quién no ha recibido un QUE GUAPUUU!!! tuyo hacia algún resultado que en realidad igual era una PCR de colitas? jejeje. Me voy contento, porque veo que ya eres capaz de ver cuando Cristina miente, y eso, en ti que te crees literalmente todo, es un paso de gigante. Gracias a Carlita (otra que ha sido madre...) tú me ayudaste junto a Cris a convertir el PINKCORNER en el ZOOCORNER, estarías orgullosa de cómo lo tiene Cris ahora. Dicen que los mejores perfumes vienen en frascos pequeños, y a ti a pequeña no te gana nadie. Contigo hice tantos debates sobre nuestros resultados que creo que aún soy capaz, a pesar de haber pasado casi 4 años, de recitar de memoria tus resultados de la tesis. Gracias a Pol, el típico machito de BLG, después de darle muchas vueltas, me está costando encontrar algún cumplido que pueda agradar a alguien que se autodenomina el tercero de los Hemsworth jejeje. Te dejo al cargo de la defensa de nuestro color de pelo, claramente rubio, mal que les pese. Más de 3 años hemos coincidido y no has sido capaz de hacerme una de tus “ricas tortillas”, espero que antes de que te presentes a Masterchef con tappers de tu madre o del viaje a Vietnam, me hagas o la tortilla u otro de tus platos estrella: pollo a la plancha en su propio aceite. Gracias a Inés, por ayudarme con el QuPath, sin ti no hubiera conseguido hacer nada literalmente. No había conocido a nadie que le gustará más un karaoke que a mí, la diferencia..., que tú cantas bien. Cuando quieras repetimos el “Como una ola...”. No hace mucho tiempo llegaron a nuestras vidas el Manel y la Aida, pero de una manera sorprendentemente rápida ambos se ganaron mi confianza y cariño, y he de confesar que en la última etapa de la tesis

eso no es nada fácil. Con vuestra incorporación al grupo, Cristina y yo hemos respirado aliviados, puesto que vemos que el legado festivo de la segunda planta seguirá vivo en vosotros, porque si tiene que ser por el abuelo de Pol... Aunque tu Manel, mejor dicho, tu estómago, me arruinaste mi último cumpleaños en la Boite y eso, para alguien que ha estudiado en ESTEA no se perdona en la vida. A ti Aida, decirte que acabes siendo PATONC o MEM tienes madera de ser una buena científica, y por eso a pesar de haberte dicho al principio que no iba a tener tiempo ni ganas de enseñarte nada, he acabado guiándote y ayudándote en tu TFM de buena gana con todo lo que buenamente he podido. Espero que ambos disfrutéis tanto del laboratorio y de la segunda planta como lo he hecho yo durante estos años, sí algo no os sale (especialmente en el estabulario) recordar encender una velita a San Albert del PLUG (está al lado de la antigua pecera de P y TEN).

Gracias a todo el resto de gente que ha ido pasando durante estos años por el grupo porque, poco o mucho, de todos he podido aprender algo. Desde Oscar, Montse, Cate, Noel, Valentín, Cafia, Manel, Paula, Maria (y su papelito-agenda), Mèlanie y un larguísimo etcétera de gente que, bien por trabajo o por prácticas, compartieron buenos momentos conmigo durante estos años. De la gente que estuvo y ya no está quiero hacer especial hincapié en Mónica, MoMo, cuando llegue al laboratorio ella era una de las técnicas que, a pesar de coincidir solo unas horas a la tarde, solo hicieron falta unos pocos días para que nuestra AMISTAD (con mayúsculas) se hiciera férrea. Laboralmente...creo que solo te tengo que agradecer dos cosas, por un lado, el orden que dejaste en todos los productos del laboratorio (congeladores, neveras, estanterías,...) que quieras o no, me ha facilitado el trabajo a la larga, y por otro que te fueras, porque aunque al principio fue duro, contigo estoy convencido que mi tesis hubiera sido la mitad de productiva, ya que durante tu jornada laboral yo hacía de todo menos ciencia, y menos aún si era primavera. Jamás me olvidaré de las operaciones negracos, de los vermouths, de viajes repentinos a Altafulla, ni mucho menos de los Estefis. Me va a costar quitarte de la lista de contactos como AaMonica (de hecho, igual no lo quito). Una de las próximas visitas que haré a Lleida será para ver a Lucas....que ganas!

Para el final de la familia Patonc, he dejado a Cristina (así le he obligado, al menos, a leer hasta aquí), ambos somos hijos únicos, pero estoy convencido que ambos somos lo más parecido a un hermano/a que tenemos, por lo menos en Lleida. Contigo, llevo compartiendo momentos 10 años!!! Así que todo lo que te tengo que agradecer no cabe en unas páginas de Word y además, tú ya sabes todo lo que te quiero. Mi compañera de maldades de ojos saltones, mi secretaria de eventos, mi agenda,... realmente he de confesar que no sé qué voy a hacer si no me organizas los eventos de mi vida, definitivamente mi tesis no hubiera sido ni de lejos lo mismo sin ti. Teq.

A continuación, quiero dar las gracias también a Natalia, "Natacha", aunque sobre el papel ahora no seas PATONC (y por el bien de Cris menos mal que solo lo fuiste durante unos meses), en esencia lo eres, y lo sabes... Gracias por los buenos momentos que me has hecho pasar dentro y fuera del laboratorio. Definitivamente, echaré de menos tener herpes labial cada 8 de noviembre..... Gracias por haber sido mi coche de confianza durante todo este tiempo en cada plan que hemos ido haciendo (Ni loco lo cambio por "coche diversión"!!!), no te preocupes, estoy convencido que seré copiloto tuyo durante mucho tiempo más, de hecho aún nos queda en la guantera algún que otro viaje y escapada a la playa. Eres una gran amiga, pero si algo te tengo que agradecer, es haberme presentado a tus dos perras, Karen y Arya. Sin ninguna duda ellas han sido parte fundamental en mi vida lleidatana, y ya sabes que siempre estaré para cuidarlas y entretenerlas mientras tú desconectas de su enérgica compañía jejeje (siempre precisan de atención, sobretodo Karen...). ¡Aaah! ¡Se me olvidaba! De nada por enseñarte todo mi conocimiento sobre la naturaleza y el

léxico, espero que la próxima vez que vayas a la montaña seas capaz de otear un manantial durante la travesía.

Quiero agradecer también a todos los que habéis formado o formáis parte de la segunda planta (porque no decirlo, la mejor planta del IRBLleida). Gracias por las charlas diarias (algo divagantes y repetitivas (hay que decirlo)) en las comidas y almuerzos (echaré de menos esos... *Som a baix!* en Rollito salado), carnavales, fiestas de cumpleaños, amigos invisibles, noches de fiesta, vermús, cenas, viajes y demás momentos compartidos. En primer lugar a los MEM, “los Marios”: Sara, Marta, Carlos, Gisela y Anna. Gracias a Marta Vaquero, la Marti, hace 6 años que te fuiste del IRBLleida y aún somos muy buenos amigos. Por los viajes al gimnasio (que nos servían para desahogarnos y ponernos al día), Aplecs, fiestas mayores de Almacelles, y resto de cosas que hemos vivido juntos, por las que seguro aún están por venir. No llores Martita, que “Martita siempre llora”... A ti Carlos Anerillas, el Charly, la única persona que sé que, si no le escribo algo, me va a dejar de hablar (y eso que él solo me dedicó una línea, compartida con Cristina, en sus agradecimientos), mi hermano (bro!), sin duda alguna una de las personas más importantes que han pasado durante mi tesis. Sabes de sobra que desde que te fuiste, Cris y yo echamos de menos nuestras tertulias científicas y personales, nunca hemos encontrado a alguien igual para desahogar nuestras maldades, aunque Polito ha sido un sustituto digno. Ahora no sé dónde te quedarás a dormir cada vez que vengas de visitilla a Lleida, pero allí donde yo esté tendrás un sofá donde pasar la noche. Ahora a mí, me queda pendiente una visitilla a tu sofá de Baltimore! A Gisela, la MEMA suprema, la que mueve el cotarro (que tiemblen las de la limpieza! y los camareros!), gracias por tu compañía en estos últimos meses que a pesar de ser de laboratorios distintos, el hecho de saber que no estábamos solos en el edificio hacia más amenas y llevaderas nuestras jornadas nocturnas (“*a quien no le va gustar*” empezar un WB a las 19h!). Sin duda alguna nuestras tardes de cafés será una de las cosas que recuerde cuando pasen los años (lo que nos gusta un buen chismorreo). Gracias por hacerme padrino de tu bautizo. Gracias a la nueva MEMA Anna, me hubiera encantado compartir más tiempo contigo. Aun así no hace falta mucho tiempo para darse cuenta de que eres buena persona y compañera, serás un buen relevo de la MEMA suprema, lo tengo claro. Agradecer también a los Sanchis: Nati, Gisel, Aida, Carlos y Leonor. Gracias a Nati, gracias a ti mi documento de la tesis ha llegado sano y salvo hasta aquí, cada párrafo que escribía, pensando en ti, guardaba un nuevo documento acordándome de cuando subiste llorando a mí diciendo que se te había borrado toda la tesis unas pocas semanas antes del depósito. Menos mal que conseguimos recuperarla!! Gracias a Gisel, si la ciencia estimula la locura de las personas, tú eres la máxima representante de este estímulo, cuando te fuiste se notó la falta de tus locuras y tu presencia (...esos gritos al otro lado del pasillo pidiendo azúcar entre otras muchas cosas). No había tarde en la que no vinieras a contarnos tus alegrías y penas (en su mayoría), o ¿acaso te tengo que recordar que eres gafe y te teníamos que hacerte un círculo de cirios para que tu mala suerte no se nos pegara al resto? Gracias a Aida, la gárgola, la dinosaurio de la planta, el día que se enteren en Atapuerca que hay un espécimen de *AustrAIDAlopithecus* vivo en Lleida, te hacen un monumento. Con la crisis de los “30 siglos” te volviste una enferma del deporte y el ciclismo, ¿quién te lo iba a decir a ti, que viste como se descubría la rueda, que te iba a gustar tanto la bici? Muchas gracias por todas las barbacoas en tus fincas *infinity*. Ten cuidado no se te suba la fama y el dinero a la cabeza por las américas trabajando para Mr. Amazon (creo que te han engañado y vas como modelo de eterna juventud). Gracias Carlos, eres un grande, y tus charlas en cultivos y laboratorio son del todo enriquecedoras, me tienen loco tus historias de vida, y sino que levante la mano a quien le han secuestrado a punta de pistola! Consejo: trabaja y deja a Manel trabajar, o sino una furia se cernirá

sobre ti. Tu céntrate en lo tuyo, ser un *snowboardista* profesional y mirar *pitutis* desde un coche. También quiero dar las gracias a las Herreros: a la Anna Visa, a la Lia (y sus palomas), a la Mireia y la Marta Crespi. Todas sois o habéis sido una parte clave, de una forma u otra en la esencia de la segunda planta. Gracias también a todos los jefes que me han ayudado en algún momento durante al tesis como son el Mario, el Eloi o Marta Llovera.

Quiero dar las gracias a Larindonga, a Anna y a Meli, por todos los momentos que hemos vivido juntos, ambas tres sois unas amigas que sé que me llevo para siempre. A ti Lara por tus tertulias políticas y feministas (siempre con máximo de intensidad) en las que a veces *no estaba pero me acuerdo*,... Desde que te fuiste, nadie se sienta en tu despacho de calle igual que tú... Tal día hará un año!... A Anna que sé de primera mano que si está leyendo estoy el día de la lectura, no es que haya venido a verme defender, sino por el pica-pica, como comes condenada... Gracias por enseñarme esquiar en tiempo record y por guiarme con tu gorra fosforita por rutas pirenaicas. A ti Meri, por estar siempre con una sonrisa en la cara, en los buenos y en los malos momentos. Gracias por las fiestas en el pub Meli y por ser la chofer estrella en Grecia. Os quiero mucho a las tres.

No quiero dejar de agradecer a los Purroys-Pinyols por aguantarme durante estos últimos meses, sé que os he dado guerra durante este año (bueno más bien he puesto algo de alegría a vuestras vidas....) y estoy seguro que notaréis mi falta en el día a día, yo también os echaré de menos. Al Dr. Purroy y su típico... cuanto trabaja este chico... A la Dra. Gloria, y tu eterna fuente de sabiduría (sabe de todo lo que le preguntes... un gusto). A Coral, y tus charlas científicas, tus galletitas de dinosaurios y chocolates. A Cristina, y la paz que trasmites en todo momento. A Farida (o Faride), y tú eterna discusión jejeje. Vamos chicas! Ya casi los tenéis!!! Un último empujón!! A la runner de Leila, que es la que realmente ha soportado mis chinchas y collejas (no haberte puesto en la puerta del despacho!), sé que echarás de menos mis consejos científicos y nuestras charlas por las tardes. A Marta Corral, que aun no siendo de Neurociencias, al dirigir a Leila, se pasa más rato en el 2.17 que en su laboratorio. Y por último a la Dra. Sara Salvany, por tu ayuda en estas últimas semanas, no sé qué formato hubiera tenido mi tesis sin tu ayuda. Estoy seguro que conseguirás generar ictus en los ratones, solo es cuestión de tiempo... Si lo ha conseguido Coral....

Quiero agradecer al resto de gente que, a pesar de no ser de la mejor planta, han compartido conmigo estos años en mi segunda casa, el IRBLleida, haciendo de mi estancia, una más amena y acogedora. A la Anaïs y Marta Rafel (y su ayuda con los servicios), a la Tània, a la Millica, a l'Èlia, a la Marionna, a la Rebe, al Pascual, a Rogelito, a Marina, a la reciente Dra. Marta Guasch, a las cuasi doctoras Alba Sansa y Marta Medina (ánimo!! ya os queda poco!!!), a Arabela, a Estefania, a Aurora, Lucia Pinilla (y sus *House Piniparties*), a Elena Britti (a su risa de delfín contagiosa y su "Castellano" C1). De todas podría escribir muchos párrafos sobre nuestras vivencias dentro y fuera del centro, en fiestas, cenas y carnavales,... pero por falta de espacio me las guardo en mi memoria. Todas podéis contar conmigo para cualquier cosa a partir de ahora.

No quiero acabar de agradecer a la gente del IRBLleida sin hacerlo a Loli, Anni y Marcia. Aunque ellas no hagan investigación, nuestro trabajo sería imposible sin ellas, o al menos mucho más guarro. Muchas gracias por vuestras charlas, que está claro que os gusta marujear más que trabajar. Especialmente a Loli, que ha sido como una más en la segunda planta del IRBLleida, y hace meses que no está....se te echa de menos. La guerra que me dio cuando la puse de lavandera en el Belén. También gracias a Fernando y a Georgina, como Cancerbero (os falta una cabeza!), custodian las puertas del IRB. Sus buenos días y sus buenas noches son de agradecer cuando estas dormido por

la mañana y cansado después de todo el día de trabajo. Si tenéis alguna duda ellos estarán allí para resolvértela, saben de todo. A la gente de la cafetería, a Lourdes, a Ceci, a Carmen, a Pili, a la Jose y a Paco, gracias por haberme dado la dosis de energía y de cafeína diaria que necesita mi cuerpo para poder comenzara a trabajar. Echaré de menos los rollitos salados y los cafés sabor y gusto sorpresa.

Y hasta aquí los agradecimientos a la gente del IRBLLeida, espero dejar tan buen recuerdo como buenos momentos me llevo...

Quiero dar las gracias a toda la gente del servicio de Anatomía Patológica del HUAV, todos habéis participado de una u otra forma en este trabajo: a Lidia, Andrea, Gatius, Carrelé, Santacana, Douglas, Pilar, Tarragona, Pallares, Bea, Anaïs, Sara, Anna, Subi, Velasco, Dolors,... Pero en especial a Andrea y a Sonia, he aprendido mucho con vosotras. Y a la gente del estabulario, por cuidar, como comentaba anteriormente, de los ciertamente responsables de esta tesis. En especial a Jessica y a Leti.

Y ahora ya, toca agradecer a la gente fuera del IRBLleida, porque fuera de estas cuatro paredes también me siento muy afortunado y orgulloso de toda la gente que me rodea. Y todos, sin exclusiones, os habéis preocupado por como llevaba la tesis, con mayor o menor conocimiento de lo que eso significaba. Gracias a los *viejitecs*, Oscar, Laura, Lauree, Zapa, Anna, Ori, Didi, Chato, Cito, Nil, Puki y Saretta, sois los mejores de la carrera y de ETSEA, y si Biotec y la vida universitaria me gustó tanto fue en su mayor parte por vosotros. Sois de las personas que por mucho que pase el tiempo sin vernos, todo sigue igual a como lo dejamos. Gracias a todos por preocuparos por como llevaba la tesis cada vez que hablábamos. Igual este año que hace ¡¡¡10 años!!!! que empezamos la carrera deberíamos hacer una quedada o viaje juntos...no sé..., solo propongo... Gracias a Juan y a Escu, aunque forestales, fuisteis siempre unos más de nosotros. Gracias por esos vermús, tardes de cerves, fiestas en la Biote,... Lo que la Promo ha unido que no lo separe nadie. Hay que quedar más! Vosotros también habéis sido parte importante de esta tesis.

Gracias a mis amigos y amigas de Logroño, mi cuadrilla de toda la vida, no os voy a nombrar a todos que somos ciento y la madre, por todas las fiestas, cumpleaños, cervezas, cafecitos Esperanto,... Gracias por estar siempre disponibles cuando me escapo de Lleida para desconectar de laboratorio, y eso, que he de confesar que han sido menos veces de las que os merecéis (sé que me he perdido muchas cosas juntos...). Como decís, este Erasmus en Cataluña me está dejando sin vida social.... Os quiero muchísimo y lo sabéis. Pero, creo que más de uno todavía no entiende muy bien en lo que consiste una tesis, aun así, es de agradecer que todos mostrarais interés y preguntarais cuando contaba algo de lo que estaba haciendo en ese momento del laboratorio. Ya no solo la tesis... creo que alguno no sabe a día de hoy decir ni qué carrera estudie...todavía recuerdo cuando os dije que me iba a estudiar Biotecnología a Lleida, y no sé muy bien quien dijo: "Mira como Ana Obregón... Biología Marina" y así con todo...y por eso os quiero.

Gracias a mi cuadrilla de Hormilleja, mi segunda familia, mi *Encurtidos family*, gracias por todas las fiestas de pueblos, noches y amaneceres en el chamizo, karaokes, tardes de piscineo y comemierda, cenas, comidas en el río, noches haciendo disfraces, noches de fresca, tardes de marujeos en los portalillos del Ayuntamiento, y miles de cosas que llevamos haciendo desde que tengo uso de razón. Parte esencial de hacer un buen trabajo es, sin ninguna duda, saber desconectar a veces de él, y vosotros en eso, me habéis ayudado cada festivo que tenía. Por eso y por mucho más que aún está por venir... ¡Gracias! Lo bueno de Hormilleja es que es un pueblo pequeño, y como tal, si

alguien tiene algún problema nos preocupamos todos, y si alguien tiene una buena noticia, la celebramos conjuntamente. Y es que *mi pueblo es el mejor*, y no lo digo yo... que lo saben en toda La Rioja! Por eso, que en un pueblo de menos de 100 habitantes (en verano igual llegamos a 300... no os vayáis a pensar!) alguien se doctore, es un evento social, y cada uno de vosotros así me lo habéis hecho saber cada vez que me veías paseando por el Soto, la Serna o cualquier otro de los pagos del pueblo. Gracias a todos!!! Aunque quiero agradecer especialmente a la cuadrilla de "La Bodega" de mis padres y a mis vecinos, pero vecinos vecinos, no sólo de los de pedir la sal, los de la casa de la Dora, a jóvenes y no tan jóvenes, a los que estáis, a los que ya no, y a los que están por venir (Lucia he vuelto a soñar que estabas embarazada... esta vez será pelirrojo), con los que por cercanía, el vínculo de afinidad es mayor y ha sido así desde hace generaciones, tanto es así que sin tener lazos sanguíneos (Inés, ya sé que somos primos octavos o algo así... jejej) somos como una misma familia. Gracias a Marisa, si a alguien tengo que agradecer el haber hecho esto creo que es a ti, porque no me confundo si digo que tu sembraste en mí la semilla y el gusanillo de aprender sobre ciencia cuando nos enseñabas de pequeños a mis primos y mi, fotos del laboratorio y conejos (cuando crecí supe que eran los conejos de tu abuela Dora...) con los que tú estabas haciendo la tesis. Gracias.

Y por supuesto, como no podía ser de otra manera, a mi familia, los que de manera incondicional me han apoyado en todo momento desde el principio y a los que les debo todo. A mi abuelo Adolfo, sé que estarías orgulloso de mí. A mi abuela Tomasa, tu morrete, tu amante ya es casi doctor! Sé que hoy en día será difícil que entiendas lo que eso significa, pero en tus buenos momentos, me haces saber que tú, mi abuela, me reconoces y me continúas queriendo y eso ya de por sí vale oro. Gracias por cuidarme, mimarme, apoyarme y por hacer de abuelos en Cárdenas junto al yayo desde que era pequeño. Gracias a mi abuelo Emilio, por tus consejos, tu preocupación irracional sobre mi estado (vamos lo que viene a ser un abuelo que se preocupa por su nieto). Gracias por los paseos por las choperas, por cuidar de mi pomal, y por retransmitirme la meteorología que hacía en el pueblo cada vez que hablábamos por teléfono (hubieras sido un buen meteorólogo!). Creo que eres una de las persona más trabajadoras y emprendedora que conozco y sé que lo has sido siempre, de hecho aún hoy, a tus 89 años, solo piensas en seguir bajando a regar las choperas y en tener un móvil táctil. Algo de se me habrá pegado digo yo.... Abuelo, cuando defienda la tesis no me digas eso de "no me quiero morir sin ser bisabuelo", ya te digo desde aquí y ahora que de momento por mi parte no, yo ya he cumplido con lo de "no me quiero morir sin verte ser doctor". No quiero más presión ahora le toca a mis primos... A mi abuela Menchu, gracias por todo, por tus largas charlas telefónicas cuando salía del trabajo, y yo te explicaba que había hecho durante el día, y tú lo que tenías de tarea en la escuela (Porque si! Tengo una abuela de 90 años que va a la escuela!), por ser mi segunda madre y por cuidarnos a mí a mis primos siempre como lo has hecho, por las noches de Salsa Rosa, de Noche de Fiesta, de Eurovisión y muchas más cosas que nos hacías tragarnos cada noche de sábado, ahora sé que esos momentos juntos valían su peso en oro. Os quiero mucho a los cuatro. A mis tíos y tías; Mari Carmen, Deme, Emilito, Lucia, Javier y Raquel. Siempre habéis sido un gran apoyo y sé que siempre podré contar con vosotros cuando lo necesite, como así lo he hecho hasta ahora. A mis primos y primas; Marc, Javier, Alejandro, Belén y Henar, hemos crecido juntos y por ello somos como hermanos. Ahora ya de mayores no nos vemos tanto como querríamos, pero cuando lo hacemos todo es como siempre, y eso es genial. Gracias al resto de mi familia paterna y materna, a la Mari Eli y las nenas, a los de la casa de la Trini, a los Herreros,....porque sé que también os alegráis de que ya sea todo un doctor! Por último a mis padres, mamá y papá (no me sale poner vuestros nombres), porque os debo todo lo que soy. Si hoy estoy aquí es sin lugar a discusión gracias

a vosotros. Gracias por vuestro apoyo y confianza cuando os dije que quería estudiar una carrera que apenas era conocida. Gracias por apoyarme y animarme de manera incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, ayudándome a decidirme en alguna de ellas, siendo el doctorado una de ellas. Siempre habéis estado disponibles cuando lo he necesitado, incluso cuando no hacía realmente falta. Por inculcarme grandes valores, por enseñarme a disfrutar de la vida siempre con cabeza y a no rendirme nunca. Por las cajas de vino, por los tupperes, por las llamadas telefónicas que me hacían el camino a casa más ameno y por un sinfín de cosas más. Soy un afortunado, y soy quien soy gracias a vosotros. Gracias.

Y hasta aquí, que casi escribo más agradecimientos que discusión... Si te has echado de menos. Lo siento y gracias.



RESUMEN·RESUM·ABSTRACT

*"En dos palabras puedo resumir cuanto he
aprendido acerca de la vida: Sigue adelante"*

Robert Lee Frost

RESUMEN

El cáncer de endometrio (CE) es el cáncer ginecológico más común en los países desarrollados y su incidencia está aumentando en todo el mundo. Los factores que han contribuido a esta tendencia son una población más envejecida y la disminución de la práctica de histerectomías benignas. Si bien es cierto que la mayoría de los cánceres de endometrio se curan mediante la histerectomía, las pacientes que padecen una enfermedad avanzada presentan un pronóstico malo.

La necesidad del tratamiento del cáncer de endometrio sigue, hoy en día, siendo un reto. También lo es la necesidad de una comprensión más profunda de la diversidad genética de esta enfermedad, así como la de los impulsores que desarrollan sus diferentes estados patogénicos. Todo esto ha permitido el desarrollo y el estudio de varios modelos murinos para entender las complejidades de este tipo de tumor. Además, los avances en el campo de la biología molecular han posibilitado el desarrollo de nuevas estrategias quimioterapéuticas dirigidas.

Pten y *p53*, que tienen función supresora de tumores, son dos de los genes con mayor número de alteraciones genéticas en CE. Así, el principal objetivo de este trabajo es conseguir la supresión específica y única de la función de estos genes en las células epiteliales endometriales.

En este estudio se han establecido varios modelos para el futuro estudio de la implicación de ambas mutaciones en el inicio y progresión de tumores ginecológicos, principalmente del CE. Los primeros modelos que se describen se han desarrollado mediante el sistema *Cre/loxP*, que permite la inducción temporal de la ablación génica con tamoxifeno utilizando la línea *Cre:ER^T* como fuente de recombinasa. En el segundo modelo se ha utilizado la recombinasa fusionada a un péptido de penetración celular (CPP), que genera la ablación génica *in situ* en las células en las que se ha administrado. Por último, hemos creado un método para generar mutaciones a demanda en células epiteliales endometriales mediante el sistema de edición génica CRISPR/Cas9, a través de la administración *in vivo* de ribonucleoproteína (RNP) en el útero del ratón con la técnica de la electroporación. Empleando este tercer modelo no sólo somos capaces de generar mutaciones en *Pten* y *p53*, sino que también podemos generar mutaciones en otros genes implicados en la carcinogénesis endometrial.

RESUM

El càncer d'endometri (CE) és el càncer ginecològic més comú als països desenvolupats i la seva incidència està augmentant a tot el món. Els factors que han contribuït a aquesta tendència són una població més envellida i la disminució de la pràctica d'histerectomies benignes. Si bé és cert que la majoria dels càncers d'endometri es curen mitjançant la histerectomia, les pacients que tenen una malaltia avançada presenten un pronòstic dolent.

La necessitat del tractament del càncer d'endometri continua, avui en dia, sent un repte. També ho és la necessitat d'una comprensió més profunda de la diversitat genètica d'aquesta malaltia, així com la dels impulsors que en desenvolupen els diferents estats patogènics. Tot això ha permès el desenvolupament i l'estudi de diversos models murins per tal d'entendre les complexitats d'aquest tipus de tumor. A més, els avenços en el camp de la biologia molecular han possibilitat el desenvolupament de noves estratègies quimioterapèutiques dirigides.

Pten i *p53*, que tenen funció supressora de tumors, són dos dels gens amb major nombre d'alteracions genètiques en CE. Així, l'objectiu principal d'aquest treball és aconseguir la supressió específica i única de la funció d'aquests gens en les cèl·lules epitelials endometrials.

En aquest estudi s'han establert diversos models per al futur estudi de la implicació d'ambdues mutacions en l'inici i la progressió de tumors ginecològics, principalment del CE. Els primers models que es descriuen s'han desenvolupat mitjançant el sistema Cre/loxP, que permet la inducció temporal de l'ablació gènica amb tamoxifè utilitzant la línia Cre:ER^T com a font de recombinasa. En el segon model s'ha utilitzat la recombinasa fusionada a un pèptid de penetració cel·lular (CPP), que genera l'ablació gènica *in situ* a les cèl·lules en les quals s'ha administrat. Finalment, hem creat un mètode per generar mutacions a demanda en cèl·lules epitelials endometrials mitjançant el sistema d'edició gènica CRISPR/Cas9, a través de l'administració *in vivo* de ribonulceoproteïna (RNP) a l'úter del ratolí amb la tècnica de l'electroporació. Emprant aquest tercer model no només som capaços de generar mutacions en *Pten* i *p53*, sinó que també podem generar mutacions en altres gens implicats en la carcinogènesi endometrial.

ABSTRACT

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecologic cancer in developed countries and its incidence is increasing worldwide. Factors that have contributed to this trend are an aging population and the decline in the practice of benign hysterectomies. While it is true that most endometrial cancers are treated by hysterectomy, patients with advanced disease have a poor prognosis.

The need for treatment of endometrial cancer remains a challenge today. So is the need for a deeper understanding of the genetic diversity of this disease, as well as that of the drivers that develop its different pathogenic states. All this has allowed the development and study of several murine models to understand the complexities of this type of tumor. In addition, advances in the field of molecular biology have enabled the development of new-targeted chemotherapeutic strategies.

Pten and *p53*, which have tumor suppressor functions, are two of the genes with the highest number of genetic alterations in SC. Thus, the main objective of this work is to achieve specific and unique suppression of the function of these genes in endometrial epithelial cells.

In this study, several models have been established for the future study of the involvement of both mutations in the initiation and progression of gynecological tumors, mainly EC. The first models described have been developed using the Cre/loxP system, which allows the temporary induction of gene ablation with tamoxifen using the Cre:ER^T line as a source of recombinase. In the second model, recombinase fused to a cell penetrating peptide (CPP) has been used, which generates *in situ* gene ablation in the cells in which it has been administered. Finally, we have created a method to generate on-demand mutations in endometrial epithelial cells using the CRISPR/Cas9 gene editing system through *in vivo* administration of ribonucleoprotein (RNP) in the mouse uterus using the electroporation technique. Using this third model, we are not only able to generate mutations in *Pten* and *p53*, but we can also generate mutations in other genes involved in endometrial carcinogenesis.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado"

Albert Szent-Györgyi

Índice de contenidos

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| EL CÁNCER DE ENDOMETRIO (CE) | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL: FISIOLÓGÍA DEL ÚTERO Y ENDOMETRIO HUMANO | 1 |
| REGULACIÓN HORMONAL DEL CICLO MENSTRUAL..... | 2 |
| EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO | 5 |
| EL ÚTERO EN ROEDORES | 7 |
| DIAGNÓSTICO, ESTADIO Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO | 8 |
| CLASIFICACIÓN TRADICIONAL O DUALISTA | 10 |
| CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA | 12 |
| CLASIFICACIÓN MOLECULAR | 18 |
| PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO | 20 |
| BASES MOLECULARES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CE..... | 22 |
| EL GEN SUPRESOR TUMORAL <i>PTEN</i> | 22 |
| EL GEN SUPRESOR TUMORAL <i>TP53</i> | 28 |
| OTRAS ALTERACIONES GENÓMICAS EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL..... | 31 |
| OTROS TIPOS DE CÁNCER EN EL ÚTERO: SARCOMAS UTERINOS | 36 |
| MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA TUMORIGÉNESIS ENDOMETRIAL | 40 |
| LÍNEAS CELULARES Y XENÓGRAFOS DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES | 40 |
| MODELOS TRIDIMENSIONALES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL | 41 |
| MODELOS ESFEROIDES, ORGANOIDES, EXPLANTES Y <i>ORGANS-ON-A-CHIP</i> | 41 |
| MODELOS <i>IN VIVO</i> DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO | 43 |
| MODELOS ESPONTÁNEOS DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO EN ROEDORES..... | 44 |
| MODELOS DE CARCINOMA ENDOMETRIAL INDUCIDOS QUÍMICAMENTE EN ROEDORES..... | 45 |
| MODELOS MURINO TRANSGÉNICOS DE CÁNCER ENDOMETRIAL | 46 |
| XENÓGRAFOS DERIVADOS DE PACIENTES Y RATONES HUMANIZADOS | 60 |

| | |
|---|------------|
| PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR (CPPs) | 62 |
| CLASIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES DE CÉLULAS | 64 |
| MECANISMO DE ENTRADA A LAS CÉLULAS DE LOS CPP | 66 |
| APLICACIONES DE LOS CPP | 68 |
| CPP EN EDICIÓN GENÓMICA | 68 |
| EL SISTEMA CRISPR/Cas9 COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER | 71 |
| LA INGENIERÍA GENÉTICA APLICADA A LA MODELIZACIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS | 71 |
| CRISPR/Cas9, EL ORIGEN | 71 |
| COMPONENTES Y ACTUACIÓN DE CRISPR/Cas9 | 75 |
| CRISPR/Cas9 COMO HERRAMIENTA DE MODIFICACIÓN GÉNICA | 77 |
| CRISPR/Cas9 COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER..... | 82 |
| CARCINOMA ENDOMETRIAL Y CRISPR | 86 |
| <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> | 93 |
| <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | |
| TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR..... | 97 |
| ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN | 102 |
| PROTEÍNA RECOMBINANTE TAT-CRE | 111 |
| HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA | 117 |
| TÉCNICA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR..... | 120 |
| SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/Cas9 | 126 |

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE *PTEN* Y/O *P53* EN EL DESARROLLO TUMORAL DEL ENDOMETRIO 140

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS ENDOMETRIALES DE ORIGEN EPITELIAL INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *P53* 140

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO *IN VIVO* PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *P53* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO. 159

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS ENDOMETRIALES CON MUTACIONES A LA CARTA GENERADAS *IN VIVO* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO CON EL SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/Cas9 209

DISCUSIÓN.....239

CONCLUSIONES.....257

BIBLIOGRAFÍA.....263

ANEXO



ABREVIATURAS

*“En la investigación es incluso más importante
el proceso que el logro mismo”*

Emilio Muñoz

Número o símbolo**2D**

Bidimensional

3D

Tridimensional

4E-BP1/EIF4E-BP1*Eukariotic translation initiation factor
4E-Binding Protein 1*

La proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E

αSMA*α-Smooth muscle actin*
α-Actina musculo liso**A****A**

Adenina

AAV

Virus adeno-asociado

ADN

Ácido desoxirribonucleico

ADNg

ADN genómico

ALK5

Receptor del factor de crecimiento transformante β1

Amhr2*Anti-Müllerian hormone receptor
type II***Antp**

Antennapedia

ARID1A*AT-Rich Interacting Domain-
containing protein 1A*

Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1

ARID5B

Proteína 5B que contiene un dominio interactivo rico en AT

ARN/RNA

Ácido ribonucleico

ARNcr/crRNA

ARN CRISPR/CRISPR RNA

ARNg

ARN genómico o ARN guía

ARNtracr/tracrRNA

ARN CRISPR transactivante / Trans-activating CRISPR RNA

ATM*Ataxia-Telangiectasia Mutated***ATR***Ataxia-Telangiectasia and Rad3-
related protein*

AV adenovirus

B**BAC***Bacterial artificial chromosome*
Cromosoma artificial bacteriano**BAD***BCL-2-associated agonist of cell
death***BAX***Bcl-2 Associated X***BCL-2***B cell lymphoma 2***BIM***BCL-2 Interacting Mediator of cell
death***Bp***Base pair*
Par de bases**C****C**

Citosina

CAG

CMV early enhancer/chicken beta actin promoter/ rabbit beta globina splice acceptor

Cas9*CRISPR-associated protein 9***CB**

Capa basal

CBF-1*Centromere binding factor 1***CCLE***Cancer Cell Line Encyclopedia***CCNE1**

Ciclina E1

CD10*Cluster of differentiation 10*
Clúster de diferenciación 10**CDH1**

Cadherina 1

CDK*Cyclin-Dependent Kinases*
Quinasas dependientes de ciclina**CDKN2A***Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2^a*
Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2^a**CE**

Cáncer/carcinoma endometrial/de endometrio

CEE

Carcinoma endometrial endometriode

CENE

Carcinoma endometrial no endometriode

CENP-C*CENtromere Protein C*
Proteína centrómera C**CF**

Capa funcional

Chr*chromosome*
cromosoma**CK8***Cytokeratin 8*
Citoqueratina 8**CPP***Cell-penetrating peptides*
Péptidos de penetración celular**Cre**

Recombinasa Cre

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Agrupaciones de repeticiones cortas palindrómicas regularmente interesparadas

crRNA

ver ARNcr

CS /CSE

Carcinoma endometrial

CTNNB1

β -catenina

CTOS

Cancer tissue-originated spheroids
Esféroides originados en tejidos cancerígenos

CUBIC-L

Clear, Unobstructed Body Imaging
Cocktails-delipidation

CUBIC-R

Clear, Unobstructed Body Imaging
Cocktails-RI-matching

CycD1

Ciclina D1

D**dCas9**

Catalytically inactive, or "dead," Cas9
Cas9 desactivada

dKO

doble *Knock-out*

dNTP

Deoxinucleósido trifosfato

dsDNA

double-strand DNA
ADN bicatenario

E**E1**

Estrona

E2

17 β -estradiol

ECS

Ver CSE

EGF

Epidermal Growth Factor
Factor de crecimiento epidérmico

EIF4E/eif4E

Ver 4E-BP1

EIN/NIE

Endometrial Intraepithelial neoplasia
Neoplasia intraepitelial endometrial

EMT

Epithelial-mesenchymal transition
Transición epitelio-mesénquima

EPO-GEMM

Electroporation-based genetically engineered mouse models
Modelos de ratones con ingeniería genética basados en la electroporación

ER/ α ER

Estrogen receptor alpha
Receptor alfa de estrógenos

ERBB2/erbB-2

Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2

ERG

ETS-related gene

F**FBXW7**

F-box and WD repeat domain-containing protein 7
Proteína 7 que contiene repetición F-box / WD

FIGO

Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

FSH

Hormona foliculoestimulante

G**G**

Guanina

GAPDH

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GEMM

Genetically engineered mouse models
Ratón modificado genéticamente

GFP

Green fluorescent protein
Proteína fluorescente verde

GSEA

Gene Set Enrichment Analysis
Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

GSK-3 β

Glycogen Synthase Kinase 3 β

H**H6/6xHis**

Six histidine-tag
Cola de seis histidinas

HDR

Homology directed repair
Reparación dirigida por homología

HE/H-E

1. Hiperplasia endometrioide
2. Hematoxilina-eosina

HER2

human epidermal growth factor receptor-related 2
receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HG-ESS

High-grade endometrial stromal sarcoma
Sarcoma estromal endometrial de alto grado

HIF1

Hypoxia-inducible factor-1
Factor 1 inducible por hipoxia

I**i.p.**

Inyección peritoneal

i.u.

Inyección uterina

| | | |
|---|--|--|
| i.v. Inoculación vaginal | LSFM <i>Light sheet fluorescence microscopy</i> Microscopía de lámina de luz fluorescente | mTORC1/2 <i>Mammalian target of rapamycin complex 1 y 2</i> |
| iCre Improved <i>Cre</i> Cre recombinasa mejorada | Ltf Lactoferrina o lactotransferrina | N |
| IHC Inmunohistoquímica | LV Lentivirus | nCas9 <i>Cas9 nickase</i> Nicasa Cas9 |
| IMS Inestabilidad de microsatélites | M | NGS <i>Next-generation sequencing</i> |
| InDel Inserciones o deleciones | MDM2 <i>Murine doble minute 2 protein</i> | NHEJ <i>Non-homologous DNA end joining</i> recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos |
| ITS Insulina-transferrina-selenio | mG Proteína fluorescente GFP membranaria | NIE ver EIN |
| K | MIG-6 <i>Mitogen-inducible gene 6</i> | NLS <i>Nuclear localization signals</i> Secuencia de localización nuclear |
| KI <i>Knock-in</i> | miRNA/ miR micro-RNA | NOD/SCID Non-Obese Diabetic/ <i>Severe Combined Immune Deficient</i> |
| KO <i>Knock-out</i> | MLC <i>mesonefric-like carcinoma</i> | NOXA daño en latín |
| KRAS o K-RAS <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogen</i> | MLH1 mutL Homology 1 | O |
| Ksp1.3 caderina 16 | MLH2 mutL Homology 2 | OMS Organización mundial de la salud |
| L | MMMT <i>Malignant mixed Müllerian tumor</i> Tumores Mülllerianos mixtos malignos | OV Ovariectomizado/ ovariectomía |
| L1CAM <i>L1 Cell Adhesion Molecule</i> Molécula de adhesión celular L1 | MMP2 <i>Matrix Metallopeptidase 2</i> Metaloproteínasa de matriz 2 | p |
| LG-ESS <i>Low-grade endometrial stromal sarcoma</i> Sarcoma estromal endometrial de bajo grado | MMR <i>Mismatch repair</i> Reparación de errores de coincidencia | p53 Proteína 53 |
| LH Hormona luteinizante | Msh2 <i>MutS, homolog 2</i> | P53KO <i>Knock-out para P53</i> |
| LMS Leiomiomasarcoma | MSH6 <i>MutS, homolog 6</i> | p70-S6K <i>ribosomal protein S6 kinase beta 1</i> |
| LOH <i>Loss of heterozygosity</i> Pérdida de heterocigosidad | mT proteína fluorescente tdTomato membranaria | pA Señal de poliadenilación de SV40 |
| loxP <i>locus of X-over in P1</i> | | PAM <i>Protospacer Adjacent Motif</i> Motivo adyacente de protoespaciador |

PAX2

Paired Box 2 protein
Proteína 2 de la caja emparejada

PAX8

Paired Box 8 protein
Proteína 8 de la caja emparejada

pCA

Promotor formado por potenciador de Citomegalovirus y el promotor de la β -Actina de gallina.

PCR

polymerase chain reaction
reacción en cadena de la polimerasa

PDE

Patient-Derived Explant
Explantos derivados de pacientes

PD(T)O

Patient-Derived (Tumor) Organoids
Organoides (tumoraes) derivados de pacientes

PDX

Patient derived xenograft
Xenoinjertos derivados del paciente

PFS

progression-free survival
supervivencia libre de progresión

pFWD

primer directo o *forward*.

PI3K

Phosphatidylinositol 3-kinase
Fosfoinositol 3-quinasas

PI3KCA

Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic subunit Alpha
Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa

PIP₃

Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
Fosfato de fosfatidilinositol (3,4,5)

PIP₂

Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

POLE

Polymerase epsilon
ADN polimerasa ϵ

Pot1a

Protection of telomeres 1A

PP2A

Protein phosphatase 2A
proteína fosfatasa 2

PPAR γ

Peroxisome proliferator activated receptor γ
Peroxisome proliferator- activated receptor gamma

PPP2R1A

Protein phosphatase 2 scaffold subunit A alpha

pRb

Proteína del retinoblastoma

pREV

Primer reverso o *reverse*

Prg/PR/RP

Receptor progesterona

PTEN

Phosphatase and TENsin homoleg deleted on chromosome 10

PTENKO

Knock-out para PTEN

PTENP1

Pseudogen 1 de PTEN

PUMA

p53 upregulated modulator of apoptosis
Modulador de la apoptosis regulado de p53

R**RE**

Ver ER

RI

Refractive index
Índice refractivo

RMG

Ratón modificado genéticamente

RNP

Ribonucleoproteína

RP

Ver Prg

RTK

Receptor Tyrosine Kinase
Receptor tirosina quinasa

rtTA

Transactivador reverso regulado por tetraciclina

S**SCID**

Severe Combined Immune Deficient

SDS

Dodecilsulfato sódico

SEMM

Somatically Engineered Mouse Models

sgRNA

Single guide RNA

SH2

Src Homology 2

SNAI1

Snail Family Transcriptional Repressor 1

SNAI2

Snail Family Transcriptional Repressor 2

Sprr2f

Small Proline Rich Protein 2F

ssDNA

Single-strand DNA
ADN monocatenario

T**T**

Timidina

TALEN

Transcription activator-like effector nuclease
Nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción

TAM

Tamoxifeno

TATp o TAT

Transactivator of transcription TAT
Péptido transactivator of transcription

TCGA

The Cancer Genome Atlas Program

TGFβ

Transforming-growth factor-β
Factor de crecimiento transformante β

TP53

Ver p53

tracrRNA

Trans-activating crRNA
ARNcr trans-activante

Trp53

Transformation related protein 53

Trp53-ps

Pseudogen de *Trp53*

TTF1

Thyroid Transcription Factor-1
Factor de transcripción tiroidea 1

U**U**

Uracilo

V**VEGF**

Vascular Endothelial Growth Factor

VIH

virus de la inmunodeficiencia humana

W**WT**

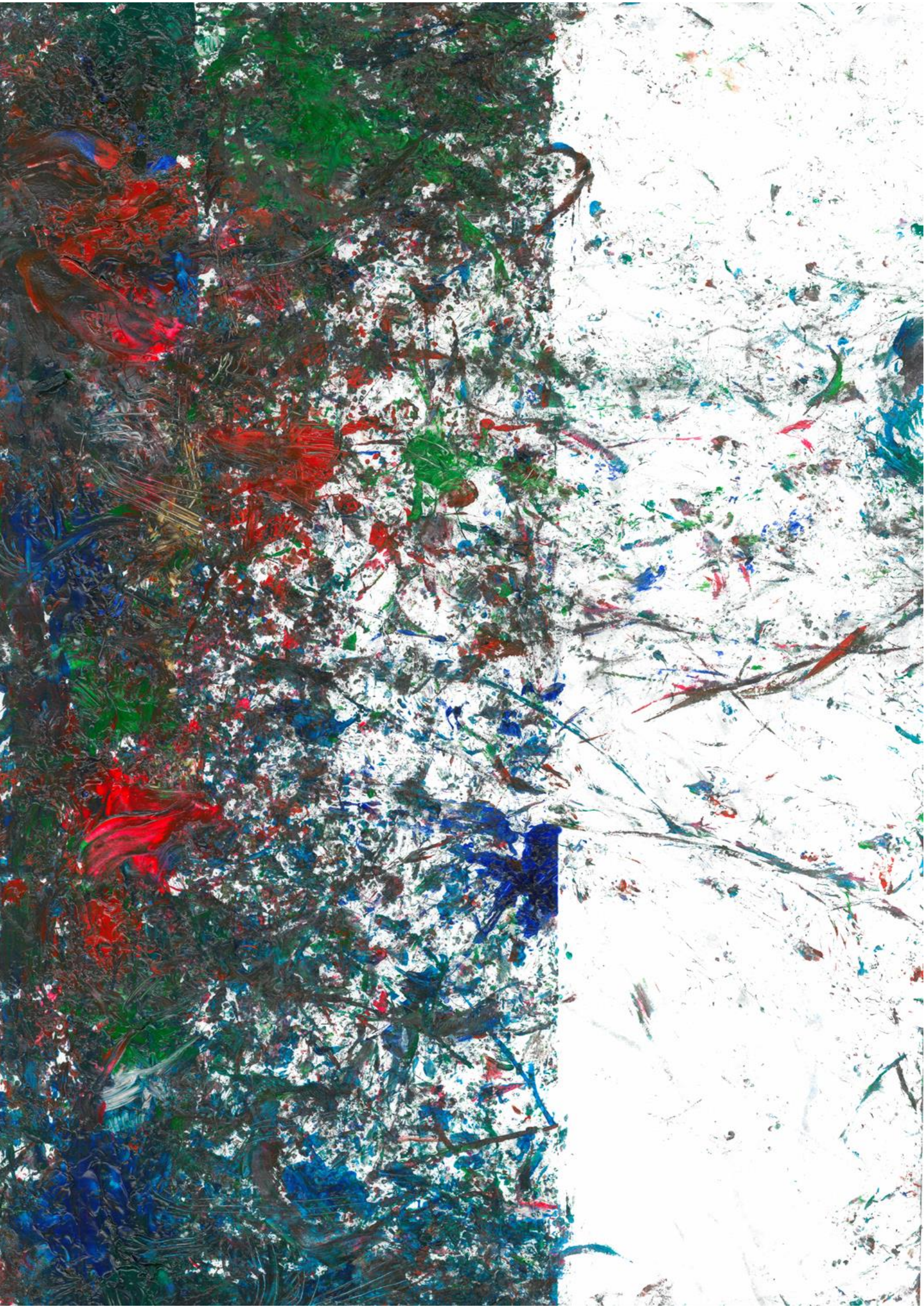
Wildtype
Control, salvaje

Z**ZEB1**

Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

ZFN

Zinc-finger nucleases
Nucleasas de dedos de zinc



INTRODUCCIÓN

*“Lo que es válido para la bacteria
lo es para el elefante”*

Jacques Monod

EL CÁNCER DE ENDOMETRIO (CE)

INTRODUCCIÓN GENERAL: FISIOLÓGÍA DEL ÚTERO Y ENDOMETRIO HUMANO

Los cánceres ginecológicos incluyen el cáncer de cuello de útero, el cáncer de ovario, el cáncer de endometrio, el cáncer de vulva, el cáncer de útero, el cáncer de trompa de Falopio y el coriónico, siendo el cáncer de cuello de útero, el de ovario y el de endometrio los más frecuentes (*Bhyan et al., 2019*).

El cáncer de endometrio o carcinoma de endometrio surge tras un crecimiento anómalo e incontrolado de las células epiteliales que forman el endometrio, el revestimiento interno del útero. Más del 95% de los cánceres uterinos son carcinomas. Si un carcinoma comienza en el cuello uterino, se le llama carcinoma cervical. Los carcinomas que comienzan en el endometrio, el revestimiento del lumen del útero, son carcinomas endometriales.

El útero, junto con los ovarios, es uno de los órganos primordiales del sistema reproductor femenino, ya que en él se produce la implantación y el desarrollo embrionario y fetal. En los humanos, el útero es un órgano muscular hueco y piriforme, que se encuentra ubicado en la pelvis femenina, entre la vejiga y el recto. El útero, además, ejerce un importante papel como fuente hormonal, autocrina y paracrina, por lo que la presencia de receptores hormonales en las diferentes capas que lo forman va variando durante del ciclo menstrual.

Desde el punto de vista anatómico, el útero está co

mpuesto por dos estructuras: el cérvix, o cuello del útero, zona más estrecha y que hace de nexo con la vagina, y el cuerpo del útero, la parte más ancha, formado por una pared gruesa. Histológicamente, la pared uterina está formada por tres capas diferentes las cuales son (Figura 1) (*Grossman et al., 2014; Ross and Pawlina W, 2020*):

- La **túnica serosa o perimetrio**: la capa más externa, es el peritoneo visceral del útero y está formada por una envoltura serosa de células. El peritoneo se extiende por la parte superior del útero o fundus y por la zona central o corpus, en las zonas laterales, constituye el ligamento ancho, que conecta junto con tejido conectivo y adventicio ambas caras del útero con el suelo de la pelvis.
- La **túnica muscular o miometrio**: la capa muscular del útero, y por tanto es la que proporciona al órgano la fuerza para las contracciones durante el parto. Esta parte es la más gruesa de la pared uterina, está constituida a su vez por tres capas de musculo liso débilmente diferenciadas entre sí: una capa longitudinal, una circular muy vascularizada, y otra fina capa de paquetes musculares.
- La **túnica mucosa o endometrio**: la más interna. Esta capa está formada por células epiteliales endometriales que se organizan con forma glandular y son muy secretoras, y células estromales,

las cuales incrementan durante la gestación dando lugar a la decidua. Todas ellas se encuentran embebidas en tejido conectivo, además, conviven con una amplia diversidad de células del sistema inmune, especialmente durante la menstruación (Agostinis *et al.*, 2019). Al mismo tiempo, el endometrio está formado por dos capas: la capa funcional superficial y la basal. La capa funcional es adyacente al lumen uterino y está integrada por epitelio cilíndrico con glándulas secretoras, que son sensibles a cambios hormonales, es por tanto la capa de células que se expulsa y se reconstruye durante la menstruación, y la capa basal, la más próxima al miometrio y vascularizada, que reconstruye la capa funcional superficial tras cada ciclo menstrual (Deligdisch-Schor and Mareş Miceli, 2020).

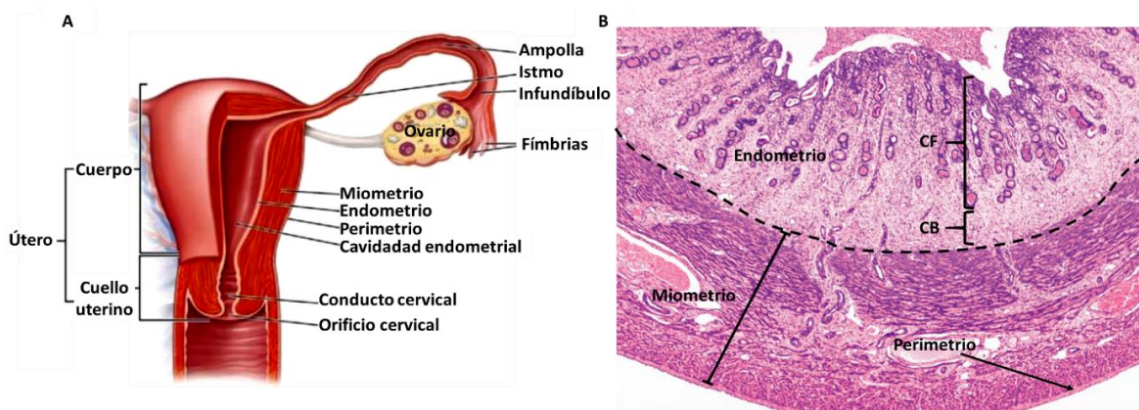


Figura 1: Anatomía e histología del útero humano. (A) Representación esquemática de los órganos reproductores internos femeninos humanos. Perspectiva frontal que muestra la apertura desde la vagina al útero y las trompas de Falopio. Se destacan las tres capas de la parte uterina: la capa interna, el endometrio, que recubre la cavidad uterina, la capa intermedia, más gruesa, el miometrio, y la capa externa, el perimetrio. (Modificado de Grossman *et al.*, 2014) (B) Fotomicrografía de un corte histológico de útero humano teñido con hematoxilina-eosina. CF: Capa funcional. CB: capa basal. (Adaptada de (http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab/uterus.php),)

REGULACIÓN HORMONAL DEL CICLO MENSTRUAL

En condiciones normales de fertilidad, el endometrio sufre alteraciones cíclicas. No fue hasta principios del siglo XX cuando se aceptó que estos cambios periódicos en el endometrio eran relevantes para la posible implantación del óvulo fecundado y posterior embarazo. Así, se observó que la activación de la glándula pituitaria y la subsecuente respuesta ovárica son responsables hormonalmente de que el endometrio experimente modificaciones estructurales mensualmente convirtiéndose en el receptáculo idóneo para dicha implantación del blastocisto y desarrollo embrionario. Estos cambios son lo que se conoce como ciclo menstrual, este se divide en fases diferentes fases que recogen procesos proliferativos y degenerativos, son: proliferativa, secretora y menstrual (Roura *et al.*, 2014) (Figura 2).

- **Fase proliferativa** (días 6-14). En el ovario se desarrollan los folículos que producen un aumento de estrógenos a nivel sanguíneo (distintivamente, la estrona y el 17β -estradiol, conocidos respectivamente como E1 y E2). Este estímulo hormonal, desempeña un papel mitógeno en el epitelio endometrial. Debido a ello este tejido comienza a proliferar y ensanchar su grosor, reconstruyéndose así la capa funcional del endometrio. El día 14 tiene lugar un pico de las hormonas pituitarias LH y FSH, sintonizándose con el momento de la ovulación. Una vez el oocito es liberado y transcurre por las trompas de Falopio, el folículo maduro acaba formando lo que se conoce como cuerpo lúteo.
- **Fase secretora** (días 15-28). Coincide con la fase lútea media y tardía. Una vez formado el cuerpo lúteo ocurre una segunda ola de estrógenos, pero esta contrariamente no estimula la proliferación de las células endometriales. Esto es debido a que el cuerpo lúteo provoca un aumento de progestágenos, concretamente la progesterona, que inhibe la acción del estrógeno, en consecuencia, el endometrio aumenta su irrigación y su nivel de secreción volviéndose un tejido edematoso que llega a alcanzar un grosor de 5-7mm. Este será así un tejido muy nutritivo y óptimo para la recepción del blastocito.
- **Fase descamativa o menstrual** (días 1-5). Si no se produce la fecundación, el ovocito es reabsorbido y el día 28 el cuerpo lúteo acaba degenerando, acabando así con la secreción de progesterona. En esta situación, la capa funcional, junto con los vasos sanguíneos formados en esta fase se desmoronan, provocando la secreción hemática característica del ciclo menstrual. Se caracteriza porque el endometrio reduce su grosor hasta unos 0.5-1mm y el estroma deja de ser tan edematoso. El estrato funcional se regenerará en la fase proliferativa del siguiente ciclo (*Messinis et al., 2014*).

La armonía entre estrógenos y progesterona frecuentemente está controlada por los estrógenos, de manera que, si sus niveles son elevados y no son neutralizados por la progesterona, aumentará la proliferación celular, contribuyendo de este modo en los primeros estadios de la formación del CE, como se ha observado en modelos animales (*Goad et al., 2018; Parkes et al., 2018*).

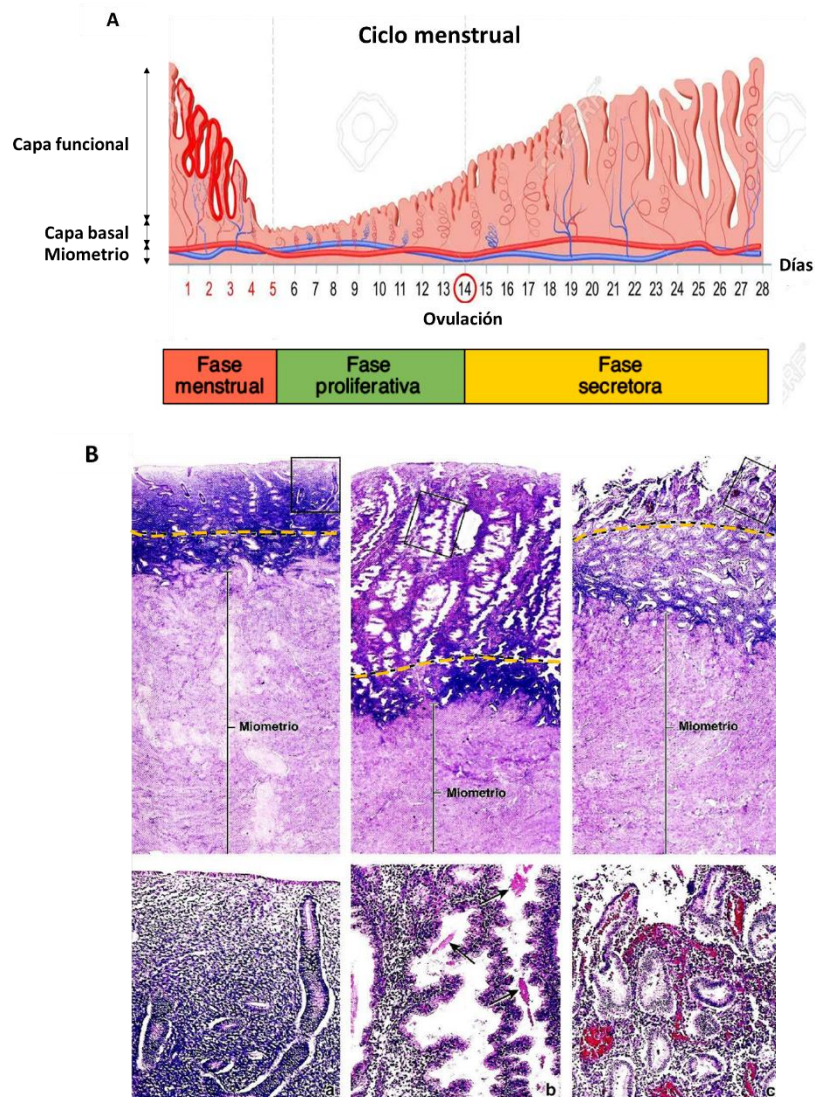


Figura 2: Esquema del ciclo menstrual. (A) Representación esquemática de la evolución del ciclo menstrual y los cambios ocurridos en el endometrio. **(B)** Fotomicrografías del revestimiento uterino en las fases proliferativa (izquierda), secretora (central) y menstrual (derecha). Durante la etapa proliferativa, la capa funcional, separada de la capa basal por una línea de puntos, aumenta mucho su espesor hasta llegar a la fase secretora, donde las glándulas adquieren un aspecto sinuoso a causa del crecimiento. Al final, en la fase menstrual, el estrato funcional colapsa y se desprende. (Modificado de *Ross and Pawlina W, 2020*)

EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

El CE es el tumor infiltrante más frecuente en el tracto genital inferior femenino, y es el cuarto cáncer más prevalente entre las mujeres europeas, tras el de mama, el colorrectal y el del pulmón. Globalmente, es la sexta neoplasia más frecuente en mujeres, la segunda ginecológica después del cáncer de cérvix. En 2020 en el mundo se diagnosticaron más de 417.367 nuevos casos y se registraron 97.370 muertes. En España, su tasa de incidencia en 2020 fue de 13.1 casos cada 100.000 mujeres, diagnosticándose un total de 6597 casos (GLOBACAN 2020). Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ese mismo año fue el cáncer del tracto genital con mayor incidencia en nuestro país, alcanzando una tasa de mortalidad en mujeres similares o superiores a la del cáncer de hígado o a la leucemia (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019). (Tabla 1)

| Incidencia | | | Mortalidad | | |
|--------------------|-----------------|------------|--------------------|-----------------|------------|
| Cáncer | Número de casos | Tasa cruda | Cáncer | Número de casos | Tasa cruda |
| Todos los cánceres | 118.691 | 499.2 | Todos los cánceres | 45.286 | 190.5 |
| Mama | 34.088 | 143.4 | Colorrectal | 6.830 | 28.7 |
| Colorrectal | 15.831 | 66.6 | Mama | 6.606 | 27.8 |
| Pulmón | 7.708 | 32.4 | Pulmón | 5.584 | 23.5 |
| Endometrio | 6.597 | 27.7 | Páncreas | 3.715 | 15.6 |
| Tiroides | 3.961 | 16.7 | Ovario | 2.106 | 8.9 |
| Páncreas | 3.944 | 16.6 | Estómago | 2.059 | 8.7 |
| Linfoma no Hodgkin | 3.882 | 16.3 | Hígado | 1.673 | 7.0 |
| Vejiga | 3.674 | 15.5 | Endometrio | 1.647 | 6.9 |
| Ovario | 3.513 | 14.8 | Leucemia | 1.625 | 6.8 |
| Melanoma | 3.144 | 13.2 | Cerebro | 1.470 | 6.2 |

Tabla 1: Número de casos nuevos y tasa de incidencia y mortalidad de los diez cánceres principales en mujeres en España en 2020. Adaptada de (GLOBACAN 2020). Tasa cruda: número de casos por cada 100.000 mujeres.

Su tasa de incidencia y mortalidad es mayor en países desarrollados (Figura 3A), por ejemplo como se puede ver en la Figura 3B, en Europa, en 2020 con 16.6 casos y 2.9 muertes por cada 100.000 mujeres en Europa (GLOBACAN 2020). En estos países, la supervivencia a 5 años es del 90% si el tumor es localizado y de bajo grado histológico (grado I, correspondiente al 75-80% de los casos diagnosticados), aunque este porcentaje se ve alterado radicalmente si aparece diseminación regional o a distancia, siendo del 68% y del 17% respectivamente (Michael M Braun et al., 2016; SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica). Por consiguiente, el factor pronóstico más relevante en el CE es la extensión de la enfermedad en el momento de diagnóstico junto con el grado histológico (Santaballa et al., 2018).

El CE tiene una prevalencia del 90% en mujeres mayores de 50 años, siendo la edad media de diagnóstico de 63 años, afectando fundamentalmente a mujeres peri y postmenopáusicas. No obstante, en un 14% de los casos se produce en mujeres en edad fértil, y entorno al 5% de las

pacientes son menores de 40 años (SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica). En estos últimos años, a causa del aumento de la esperanza de vida, la obesidad y sus patologías asociadas como son la hipertensión y diabetes, se está observando una tendencia a al alza de la incidencia del CE. Éste aumento ha tenido lugar de una manera especialmente contundente en mujeres jóvenes (Lee et al., 2007; Moore and Brewer, 2017). Otro de los factores contraproducentes en el CE es el estímulo estrogénico, de modo que las mujeres que padecen de hiperestrogenismo, así como las que tienen una vida reproductiva extremadamente larga o las que reciben tratamiento con tamoxifeno (un análogo de los estrógenos endógenos empleado para el tratamiento de cáncer de mama) presentan un mayor riesgo de acabar desarrollando tumores en el endometrio (Ngô et al., 2014).

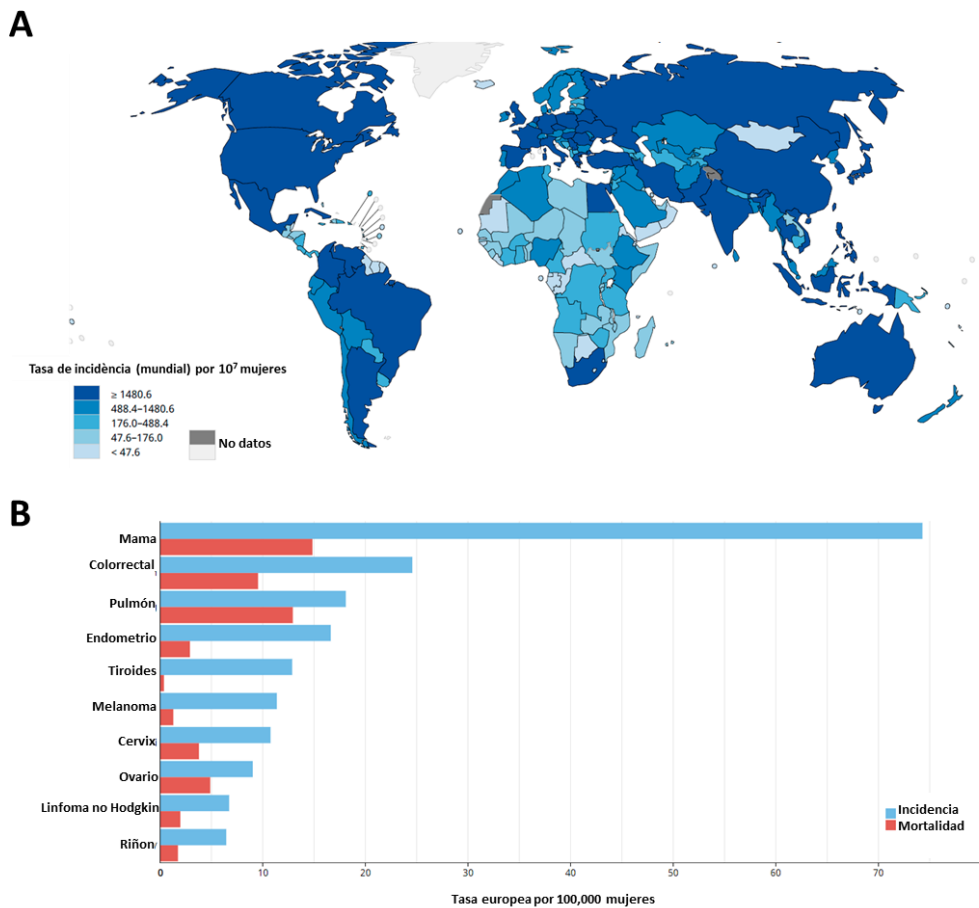


Figura 3: Tasa estimada de incidencia estandarizada en el cáncer de endometrio. (A) Mapa indicador de la tasa de incidencia a nivel global en 2020 por cada 10.000.000 mujeres. **(B)** Gráfica de la incidencia y la mortalidad del cáncer de endometrio en Europa en el año 2020. Adaptadas de *GLOBACAN 2020*.

EL ÚTERO EN ROEDORES

A diferencia de los humanos, el útero de los roedores es bicórneo, dicho de otro modo, está formado por dos prolongaciones que se originan desde los oviductos y, posteriormente, convergen caudalmente en forma de Y, conectando con la vagina a través del cérvix (Figura 4). Al nacer, el útero de los ratones no dispone de glándulas epiteliales en el endometrio, éste se basa simplemente en un epitelio simple luminal rodeado de tejido mesenquimal indiferenciado. No es hasta el día 5 post-natal cuando tiene lugar el inicio de la invaginación de este epitelio, produciéndose así la génesis de glándulas endometriales a partir del séptimo día. Inclusive en la edad adulta, las glándulas del endometrio de los roedores son más simples, presentando una disposición tubular y esférica, no tan ramificada y entrecruzada como los son las humanas (Anne Croy et al. 2013).

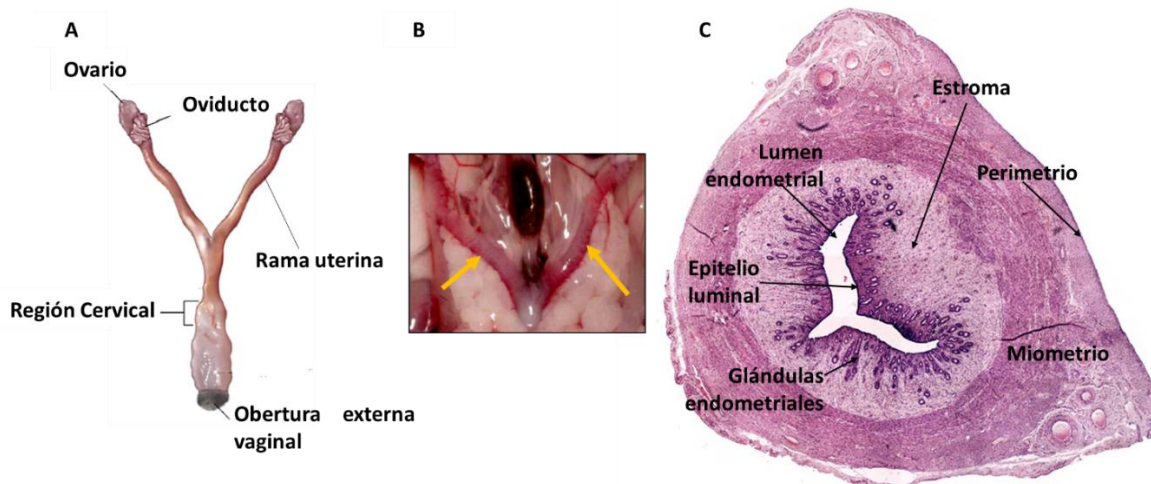


Figura 4: Anatomía e histología del útero murino. (Modificado de Treuting et al., 2018) (A) Representación del útero del ratón, donde se pueden distinguir los ovarios, las dos ramas uterinas y el cérvix. (B) Imagen real del útero de un ratón adulto, las flechas amarillas señalan las ramas o cuernos uterinos. (C) Fotomicrografía del corte histológico de un útero murino adulto.

De igual manera que sucede en los humanos, el útero de los roedores también experimenta cambios cíclicos para la preparación de la implantación de los blastocitos. La diferencia primordial entre ambos es que en el caso de los ratones se da lo conocido como ciclo estral en lugar del ciclo menstrual. Estos ciclos se dan de manera ininterrumpida durante todo el año desde el momento que la ratona adquiere la madurez sexual entorno la quinta y séptima semana de vida. El ciclo estral dura entre 4-5 días. Esta etapa está controlada por factores ambientales como puede ser el fotoperiodo, la temperatura, la disponibilidad de alimentos y la presencia de feromonas. Por ejemplo, el olor de la orina de los machos acorta el ciclo de 5 a 4 días en las hembras expuestas al

mismo. Esta fase puede dividirse en 4 etapas diferenciadas (*Groothuis et al., 2007; Sato et al. 1997; Tan et al., 2003*):

- **Proestro:** es la fase de acondicionamiento, dura aproximadamente unas 18 horas. Durante esta etapa se produce un pico hormonal gradual de estrógeno. Se caracteriza por un incremento en la proliferación de las células endometriales y del flujo sanguíneo.
- **Estro:** es el periodo receptivo de la hembra (vulva inflamada y lordosis refleja), dura unas 28 horas, en esta fase se da la ovulación y una abundante proliferación celular, el útero se prepara así para la factible implantación de los embriones.
- **Metaestro:** en el caso de que no se produzca la fecundación, es una etapa en la que las células epiteliales del endometrio sufren una apoptosis masiva que dura 8 horas. Esta fase está marcada por unos niveles muy bajos de estrógeno.
- **Diestro:** la hembra se mantiene en reposo unas 40 horas, durante las cuales permanece sexualmente inactiva (no receptiva al macho).

DIAGNÓSTICO, ESTADIO Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

En la población, el cribado rutinario para la detección precoz de CE no se considera salvo en los casos que presentan Síndrome de Lynch, una enfermedad asociada a un tipo de cáncer colorrectal hereditario no polipósico, en el que están afectados genes reparadores del ADN (MLH1, MLH2 o MSH6) dando lugar a inestabilidad de microsátélites (IMS). En estos casos clínicos la criba es necesaria ya que presentan un riesgo del 27-71% de padecer este tipo de neoplasia endometrial. En estos casos se realiza un estudio periódico con biopsias endometriales, estudiando la opción de llevar a cabo una cirugía profiláctica (*Lu and Daniels, 2013; Staff et al., 2016*).

El resto de las pacientes no recibirán un estudio hasta que no aparezcan los primeros síntomas, como puede ser el sangrado vaginal anormal (metrorragia) (*Goodman, 2000; Janet R Albers et al., 2004*) en mujeres mayores de 40 años, o que existan factores de riesgo en menores de 40, como pueden ser la obesidad, tener síndrome de ovarios poliquísticos, diabetes, tratamiento con tamoxifeno, entre otros (*Santaballa et al., 2018*).

Las pruebas que se realizan para el diagnóstico de este tipo de cáncer van desde citologías cervicovaginales (en el 50% de los pacientes con CE se encuentran células anormales), ecografías transvaginales (se valoran parámetros como grosor, morfología, vascularización e infiltración

miometrial y cervical) y biopsias endometriales (para conocer el tipo histológico y el grado de diferenciación) (Chi et al., 2017; Opolskiene et al., 2007; Torres et al., 2012). Estos últimos años existe un kit de diagnóstico molecular conocido como *GynEC-Dx* que permite estudiar el estado de 20 genes relacionados con el CE en un aspirado uterino (Sergi Fernández-González et al. 2019).

Para averiguar si se ha producido una invasión del miometrio y afectación del cérvix, la prueba más sensible es la resonancia magnética. En cuanto al estudio de la afectación de ganglios linfáticos pélvicos, se puede realizar una linfadenectomía pélvica y paraaórtica o bien un mapeo de los ganglios centinela, de esta última forma se incrementa la probabilidad de encontrar metástasis (Tran and Gehrig, 2017).

En este marco, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) generó en 1958 un sistema de clasificación y estadiaje tumoral para el CE. Éste, concede información notable para la evaluación de la propagación del tumor. Además, con la finalidad de aumentar su reproducibilidad y precisión, los criterios se van reestableciendo periódicamente. Estos criterios de clasificación se adaptan al estadio quirúrgico de un modo independiente del grado histológico (Concin et al., 2021), por tanto se tienen en cuenta el tamaño y la localización del tumor, su extensión en órganos anexos (ovarios y trompas de Falopio), la profundidad de la invasión miometrial y cervical, la invasión de vasos linfáticos y el estado de los ganglios. Por otro lado la clasificación TNM se focaliza en una distribución de los casos de una manera clínica y/o patológica (Tabla 2) (WHO, 2020).

| Clasificación TNM | Estadio FIGO | Características del tumor | Supervivencia a 5 años (%) |
|-------------------|--------------|---|----------------------------|
| TX | | Tumor primario no puede ser evaluado | |
| T0 | | Sin evidencias del tumor primario | |
| T1 | I | Tumor confinado en el cuerpo uterino | |
| T1a | IA | Ausencia de invasión miometrial, o <50% | 90 |
| T1b | IB | Invasión miometrial >50% | 78 |
| T2 | II | Invasión del estroma cervical pero no más allá del útero | 74 |
| T3 | III | Diseminación local o regional | |
| T3a | IIIA | Invasión de la serosa del cuerpo uterino y órganos anejos | 56 |
| T3b | IIIB | Afectación vaginal y/o parametrial | 36 |
| N1,N2 | IIIC | Afectación metastásica de ganglios pélvicos y paraaórticos | |
| N1 | IIIC1 | Ganglios pélvicos positivos | 57 |
| N2 | IIIC2 | Ganglios paraaórticos positivos independientes de los pélvicos | 48 |
| T4 | IV | Invasión de la mucosa vesical y/o rectal, y/o metástasis distales | |
| M0 | IVA | Invasión vejiga y/o recto | 22 |
| M1 | IVB | Metástasis distales, incluyendo intraabdominales y/o en ganglios inguinales | 21 |

Tabla 2: Estadiaje actual del CE según FIGO, junto con la clasificación TNM y la supervivencia asociada a cada estadio. Adaptación de Bartosch et al., 2017.

CLASIFICACIÓN TRADICIONAL O DUALISTA

De manera habitual el CE se ha clasificado según criterios clínicos, endocrinos y epidemiológicos. Así Bokhman en 1983 describió que existían dos manifestaciones clinicopatológicas (Tabla 3) (Bokhman, 1983).

| Características | Tipo I | Tipo II |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Edad | Pre-perimenopáusica | Postmenopáusica |
| Prevalencia | 80-90% | 10-20% |
| Estadio en el diagnóstico | Temprano | Avanzado |
| Relación con el hiperestrogenismo | Si | No |
| Lesión precursora | Hiperplasia endometrial | - |
| Progresión | Lenta | Rápida |
| Pronóstico | Buena | Mala |

Tabla 3: Clasificación de Bokhman, dualista o tradicional, del cáncer de endometrio. Adaptación de *Goebel et al., 2018*.

- Tipo I o carcinoma endometrial endometriode** (CEE, en inglés EEC): representan el 80-90% de los casos (*Concin et al., 2021*) y se suelen vincular con un estado hiperestrogénico. Esta es la causa que este tipo de carcinoma se asocie con factores de riesgo tales como la obesidad, la anovulación, nuliparidad y tratamiento con estrógenos exógenos no compensados con progesterona. Se desarrolla en mujeres pre, peri y postmenopáusicas relativamente jóvenes. Los CEEs son tumores dependientes de estrógenos, por lo que expresan elevados niveles de receptores de los mismos. Se desarrollan a partir de lesiones precursoras como puede ser hiperplasias endometriales o neoplasias intraepiteliales endometrioides, con o sin atipia. Suelen diagnosticarse en estadios iniciales y con bajo grado. Bajo el microscopio, los CEEs de bajo grado (CEE1-2) presentan glándulas tubulares, que recuerdan morfológicamente a un endometrio proliferativo, aunque con un patrón glandular cribiforme y fusionado, con un cierto grado de complejidad celular, y se asocian con un buen pronóstico cuando el tumor se encuentra confinado al útero. Los CEEs de alto grado (CEE3) presentan un patrón de crecimiento más sólido, representan un 10% de los casos de CEE, son más agresivos y suelen vincular con metástasis de ganglios linfáticos, produciendo el 39% de las muertes por cáncer de endometrio (*Bansal et al., 2009; Hamilton et al., 2006; Piulats et al., 2017*).
- Tipo II, carcinoma no endometriode** (CENE, en inglés NEECs) o carcinomas serosos: representan entorno al 20% de los casos (*Concin et al., 2021*), y no tienen relación con estímulos hormonales. Habitúan a desarrollarse en mujeres edad avanzada (postmenopáusicas), generalmente sobre una base de endometrio atrófico. En estos casos, suelen diagnosticarse en estadios más avanzados, ya que presentan una diseminación

temprana y por tanto un peor pronóstico. De hecho, a pesar de no ser el tipo tumoral más frecuente en endometrio, son responsables del 27% de las muertes por CE. En su mayoría son tumores serosos y entre sus características microscópicas predomina la presencia de papilas gruesas, fibrosas o edematosas, con una estratificación prominente de células tumorales, y de células anaplásicas con citoplasmas eosinófilos grandes (*Bansal et al., 2009; Hamilton et al., 2006; Piulats et al., 2017*).

Más allá de las diferencias histológicas, los tumores de Tipo I y Tipo II se asocian a ciertas alteraciones moleculares. De esta forma, los CEEs presentan inestabilidad de microsatélites (IMS) y mutaciones frecuentes en *PTEN* (77%), *PI3KCA* (53%), *CTNNB1* (36%), *ARID1A* (35%) y *KRAS* (24%), entre los más habituales. Por otro lado, los CENEs manifiestan inestabilidad cromosómica, LOH, mutaciones en *TP53* (90.7%), *PI3KCA* (41.9%) y otras alteraciones moleculares que afectan a *SKT1S*, *p16*, *E-cadherina* y *HER2* (*Getz et al., 2013; Piulats et al., 2017*).

| Clasificación clásica | Clasificación histológica |
|---|---|
| Tipo I Relacionados con estrógenos | Adenocarcinoma endometriode |
| Tipo II No relacionado con estrógenos | Carcinoma seroso |
| | Adenocarcinoma de célula clara |
| | Carcinoma indiferenciado y dediferenciado |
| | Adenocarcinoma mixto |
| Otros tipos de cáncer de endometrio | Carcinoma escamoso |
| | Carcinoma mucinoso de tipo gastrointestinal |
| | Adenocarcinoma mesonéfrico y <i>mesonefric-like</i> |

Tabla 4: Correlación aproximada de las clasificaciones tradicionales e histológicas del cáncer de endometrio.

Desde el punto de vista patogénico este tipo de distribución clásica y dualista es interesante, pero según las circunstancias a veces es complicado aplicarlo a la clínica, ya que el CE incluye mecanismos patogénicos muy heterogéneos y estos deben de plasmarse de alguna forma en los sistemas de organización de los casos. Ésta es la causa de que la clasificación histológica, definida por la OMS (Organización Mundial de la Salud, en inglés: WHO, *World Health Organization*) hace unos años, sea a día de hoy la más utilizada (Tabla 4), aunque, desde hace un tiempo, la caracterización y clasificación molecular de los tumores de CE está cogiendo relevancia y se está imponiendo sobre las otras (*Piulats et al., 2017*).

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La OMS ha acostumbrado a clasificar de manera habitual los diferentes CE en función a su histología y características celulares (*WHO, 2020*). En cambio, en su nueva clasificación, han introducido nuevos tipos de CE. No obstante, los CEE y los carcinomas serosos continúan formando la mayor parte de los casos. La división de estos nuevos subtipos de CE (enumerados en la Tabla 4) es definida tomando en cuenta las características microscópicas y las moleculares. Esta nueva organización ha ayudado a perfeccionar la separación clínica de los pacientes y por tanto predecir mejor el pronóstico de los mismos (*Soslow et al., 2019*). Desde el punto de vista histopatológico, el carcinoma endometrial puede clasificarse como endometriode y sus variantes, mucinoso, seroso, de células claras, neuroendocrino, mixto, indiferenciado o desdiferenciado. Además, un pequeño porcentaje de carcinomas muestra una diferenciación mesenquimal y se denomina carcinosarcoma. Entre los casos recién diagnosticados, aproximadamente el 85% o más son carcinomas endometriodes, entre el 3 y el 10% son carcinomas serosos, entre el 2 y el 3% son carcinomas de células claras y menos del 2% son carcinosarcomas, y el resto corresponde a otros histotipos (*Dedes et al., 2011*).

De esta manera, los diferentes tipos histológicos de CE descritos en la actualidad son los siguientes:

ADENOCARCINOMA ENDOMETRIOIDE

Este tipo de tumor representa alrededor del 80% de todos los CE diagnosticados. Se trata al CE de tipo I en la clasificación de Bokhman. Como su nombre indica se trata de un adenocarcinoma en el endometrio, este se caracteriza por presentar una estructura semejante a la de un endometrio sano, glandular o villoglandular, formada por un epitelio estratificado cúbico, pero con una arquitectura enrevesada y ramificada. Las células epiteliales alineadas acostumbran a ser columnares y comparten la zona apical con las células contiguas, por lo que también derivan en lúmenes glandulares. En el adenocarcinoma endometriode las células característicamente tienen un citoplasma eosinofílico y granular así como una atipia nuclear de leve a moderada (*WHO, 2020*). Por otra parte, las neoplasias endometriales pueden presentar una gran diversidad de tipos epiteliales diferenciados, como son las células escamosas, mucinosas o ciliadas, y variaciones arquitecturales, incluyendo formaciones papilares. Cuando estas variedades prevalecen en un adenocarcinoma endometriode, éste pasa a nombrarse como “variante especial”: variante con diferenciación escamosa, variante villoglandular, variante de células ciliadas y variante secretora (*Murali et al., 2014*).

Es por ello que este subtipo de CE comprende de un amplio espectro de diferenciación histológica, que se valora con el grado nuclear y arquitectural, parámetros que especifican la agresividad celular del tumor.

El principal parámetro que define el grado histológico es la arquitectura, dividiéndose así en 3 grados:

- **Grado 1:** adenocarcinoma con un patrón glandular reconocible y un 5% o menos de crecimiento sólido (Figura 5A).
- **Grado 2:** glándulas bien formadas con láminas solidas de células neoplásicas intercaladas con entre 6 y 50% de crecimiento sólido.
- **Grado 3:** con más de un 50% de crecimiento sólido, con glándulas prácticamente irreconocibles y células tumorales con atipia nuclear y elevada actividad mitótica (Figura 5B). Los tumores de grado 3 tienen un peor pronóstico que los de grado 1 y 2, y aunque comparten algunas alteraciones moleculares con los tumores de grado 1 y 2, aproximadamente el 50% muestran mutaciones en el *TP53*, que son raras en los tumores de grado inferior (*Lax et al., 2000*). Curiosamente, aproximadamente el 20% de los tumores de grado 3 se encuentran en el subtipo TCGA de número de copias alto (tipo seroso), mientras que la gran mayoría de los tumores de grado 1 y 2 se encuentran en los otros tres subtipos TCGA de carcinoma endometrial (explicados más adelante). Cuando el adenocarcinoma endometriode se compone de más de un 50% de focos de grado 3, este tumor se relaciona con una mayor agresividad, de ahí que el grado histológico incremente en un grado (*Soslow et al., 2019*).

CARCINOMA SEROSO (FIGURA 5C)

Es el CE de tipo no endometriode más reiterado entre los casos diagnosticados de tumores al endometrio. Su histomorfología es papilar, compleja y con núcleos fibrovascular. El 30% de los casos se caracterizan por contener cuerpos de Psamoma (calcificaciones laminadas acelulares). A diferencia del adenocarcinoma endometriode en estos tumores la histología celular preponderante es redondeada en vez de columnar, además, acostumbran a presentar células multinucleadas. Al no presentar una forma glandular, los núcleos ya no están organizados perpendicularmente a la membrana basal. Estos núcleos son poco diferenciados, grandes y con nucléolos eosinófilos. En los carcinomas serosos las mitosis son numerosas, y generalmente atípicas y aberrantes. Asimismo, presentan nidos celulares y focos de necrosis (*WHO, 2020*).

Contrariamente que los adenocarcinomas endometriales, los serosos se califican siempre como tumor de alto grado histológico, y acostumbran a diagnosticarse en estadios avanzados. El pronóstico es muy bueno si el tumor está confinado en el endometrio, aunque cualquier difusión fuera del útero asiduamente resulta en una recurrencia del tumor y en la muerte de la paciente.

Así, aunque este tipo de tumor se diagnostique en menos de un 10% de los CE, es el culpable de la defunción del 40% de los casos de CE (*Murali et al., 2014; WHO, 2020*).

CARCINOMA DE CÉLULA CLARA (FIGURA 5D)

Por lo que respecta este tipo de CE, las células son poliédricas, con citoplasmas claros o aunque menos usual eosinófilos y granulares. Estas células siguen unos patrones papilares, túbulos-quísticos, solidos o mixtos. Tanto el grado de la atipia nuclear como el índice mitótico, de manera general, son altos, aunque en algunos casos solo sea de forma focal. Esta clase tumoral no suele ser frecuente, representando menos del 10% de los casos (*WHO, 2020*), y tienen una prognosis inferior al endometriode. Acostumbran a diagnosticarse en mujeres mayores en estadios avanzados (*Murali et al., 2014*).

CARCINOMA INDIFERENCIADO Y DESDIFERENCIADO (FIGURA 5E Y 5F)

En este tipo de neoplasia no existe una diferenciación celular clara. El carcinoma desdiferenciado está formado en diferentes proporciones por un componente de carcinoma indiferenciado y un componente diferenciado, que suele ser endometriode de grado 1 o 2. La zona límite entre los dos componentes no suele ser evidente, acostumbrando a ser abrupta y mezclada. Una gran parte de estos tumores, establecen enormes masas polipoides, intraluminales y con frecuencia necróticas. En este tipo de tumor, la recurrencia y la mortalidad es del 55-95% de los casos, esto es debido a que son tumores altamente agresivos, a pesar de representar solo un 2% de la incidencia en CE (*WHO, 2020*).

ADENOCARCINOMA MIXTO

Este tipo de CE se conforma de una mezcla de carcinomas de dos o más tipos histológicos, donde al menos uno de ellos es seroso o de célula clara. Es por ello que dentro del tumor puede haber características superpuestas y una cierta mezcolanza y ambigüedad molecular. Los más habituales tienen componentes endometrioides y serosos. Son el 10% de los casos de CE y la gravedad de estos viene dada por el componente de mayor grado, de esta forma siempre se consideran de alto grado dando igual el porcentaje relativo que presenten de carcinoma seroso o de célula clara (*Ruhul Quddus et al., 2010; WHO 2020, 2020*). El componente minoritario ha de estar presente en casi un 5% de todo el tumor. El pronóstico de estos tumores ha sido determinado por la agresividad del componente con mayor peso.

CARCINOMA ESCAMOSO

Las células de este tipo tumoral de CE son exclusivamente células epiteliales con diferenciación escamosa, aunque en algunos casos tengan una apariencia engañosamente blanda. Están compuestos por epitelio glucogénico y presentan un amplio frente invasivo. Están vinculados a

condiciones inflamatorias crónicas, piometra prolongada e ictosis uterina. Conforman el 0,5% de los casos de CE, y su agresividad y pronóstico varía según el estadio del tumor (WHO, 2020).

CARCINOMA MUCINOSO DE TIPO GASTROINTESTINAL

Es el CE que se da con menor frecuencia. Presenta características mucinosas gástricas y/o gastrointestinales. Las glándulas epiteliales de las que se compone este tumor son secretoras de mucina. Los núcleos son de bajo grado y el desarrollo del tumor dependerá del grado que presente según el momento del diagnóstico de la paciente (WHO, 2020).

ADENOCARCINOMA MESONÉFRICO Y MESONEFRIC-LIKE (MLC)

Los carcinomas mesonéfricos tienen como origen restos de los conductos mesonéfrico, por lo que pueden originarse en la pared uterina. No presentan receptores hormonales. Su aparición no es muy habitual (1% de los CE). En lo relativo a los “mesonefric-like” son un tipo de adenocarcinoma similar a los de diferenciación mesonéfrica. Todos los MLC tienen una mezcla de características arquitectónicas y citológicas, sobre todo arquitectura ductal y/o tubular, núcleos parecidos a los del carcinoma papilar de tiroides, y secreciones eosinófilas intraluminales focales (Figura 5G-5I). Hasta 2020 solo se habían descrito unos 50 casos de este tipo de tumor. Al tratarse de subtipos tumorales recientemente descritos, no está claro su pronóstico, pero los pocos datos que hay marcan un comportamiento agresivo (Euscher et al., 2020; WHO 2020, 2020).

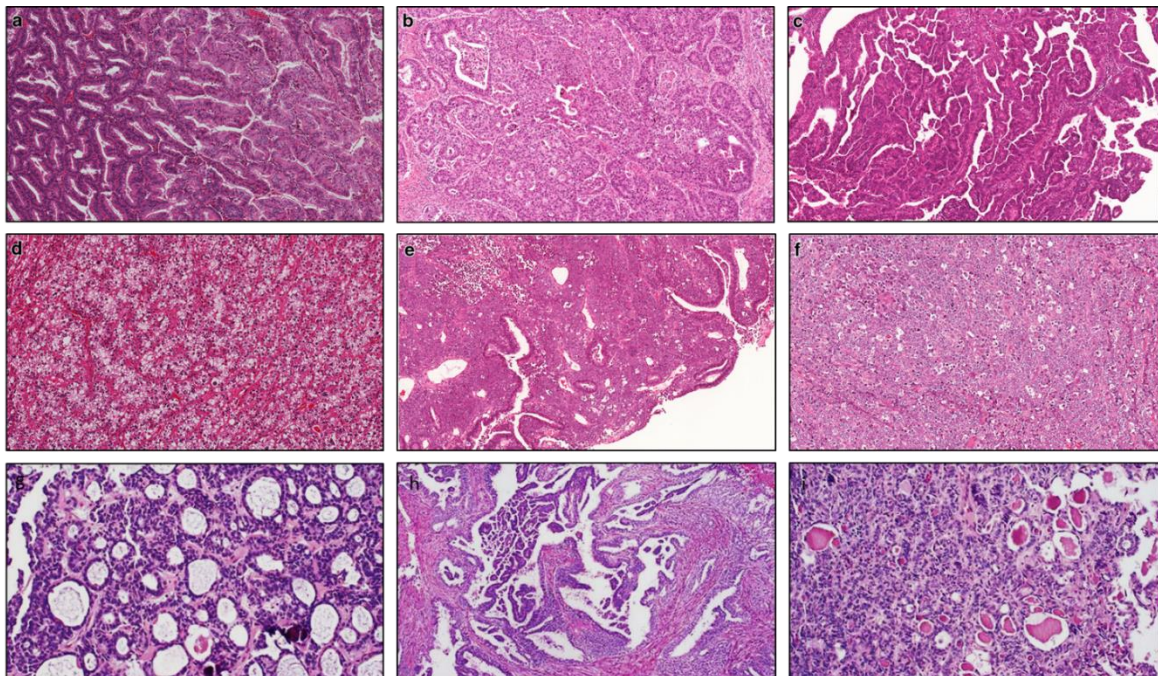


Figura 5: Histopatología del carcinoma de endometrio. (Modificado de Euscher et al., 2020; Goebel et al., 2018) (A) Fotomicrografías de adenocarcinoma endometriode de bajo grado. (B) Fotomicrografías de adenocarcinoma endometriode de alto grado. (C) Fotomicrografías carcinoma seroso. (D) Fotomicrografías de carcinoma de célula clara. (E) Fotomicrografías de carcinoma desdiferenciado, que muestra componente de bajo grado endometriode y de alto grado (indeferenciado). (F) Fotomicrografías de carcinoma desdiferenciado de alto grado (indeferenciado). (G-I) Fotomicrografías de carcinoma mesonefric-like. Patrón glandular (G), papilar (H) y ductal con secreciones eosinófilas (I).

CARCINOSARCOMA ENDOMETRIAL

Los carcinosarcomas endometriales (CSE o ECS, del inglés *endometrial carcinosarcoma*) o tumores müllerianos mixtos malignos (*malignant mixed Müllerian tumor*, MMMT) son una neoplasia de alto grado (y agresiva) que tiene lugar entre el 2 y el 5% de los carcinomas ginecológicos (Dedes et al., 2011). A pesar de esta baja presentación, son los causantes de casi el 16% de las muertes asociadas a patologías uterinas (De Jong et al., 2011; Gonzalez Bosquet et al., 2010) ya que presentan una peor supervivencia que los carcinomas endometriales de alto grado (Amant et al., 2005; De Jong et al., 2011; Ferguson et al., 2007; George et al., 1995; Wright et al., 2008). Así, los ECS, son uno de los tumores que presenta mayor heterogeneidad tumoral en el grupo de cánceres uterinos junto con los carcinomas mixtos endometrioides-serosos y los carcinomas desdiferenciados. Estos tumores presentan un patrón bifásico, con un componente epitelial maligno, que puede ser tanto endometrioide (en la mayoría de los casos) o no endometrioide (seroso, célula clara, indiferenciado o mixto) (Abdulfatah et al., 2019; Buza and Tavassoli, 2009; De Jong et al., 2011; Ferguson et al., 2007; Kurnit et al., 2019; M J Costa et al., 1994; Matsuo et al., 2016; Silverberg et al., 1990), y un componente sarcomatoide mesenquimal que puede representar una parte grande o pequeña del tumor (Gotoh et al., 2019). El componente sarcomatoide del ECS se denomina o sarcoma homólogo (fibrosarcoma, leiomiomasarcoma o sarcoma estromal endometrial) o sarcoma heterólogo, donde el componente sarcomatoide presenta diferenciación hacia otro tipo de tejidos como por ejemplo hueso, cartílago o músculo (R Vajpeyi, 2005). Así, el tipo más común de carcinosarcoma está compuesto por carcinoma de alto grado y sarcoma homólogo (un 40,8% de los casos) (Abdulfatah et al., 2019; Matsuo et al., 2016). La posterior diferenciación a diferentes tipos de tejidos mesenquimales aumenta la heterogeneidad del tumor y probablemente modula el comportamiento clínico y la respuesta terapéutica.

La mayoría de los carcinosarcomas endometriales pertenecen al subtipo molecular de carcinoma endometrial de alto número de copias, caracterizado por la mutación del *TP53* y frecuentemente acompañado por un gran número de alteraciones del número de copias de los genes, incluyendo la amplificación de importantes oncogenes, como el *CCNE1* y el *c-MYC*. Sin embargo, una proporción de casos (20%) probablemente representa la progresión de tumores inicialmente pertenecientes al subtipo molecular de bajo número de copias de tipo endometrioide (caracterizado por mutaciones en genes como *PTEN*, *PI3KCA* o *ARID1A*), tras la adquisición de las mutaciones *TP53* (Leskela et al., 2019). Sólo unos pocos ECS pertenecen al tipo molecular hipermutado con inestabilidad de microsatélites y al tipo molecular ultramutado con mutaciones *POLE* (estas clasificaciones moleculares se explican en apartados posteriores). Una característica común a todos los ECS es la modulación de los genes implicados en el proceso de conversión de epitelial a mesenquimal (Mirantes et al., 2013b). Así, la adquisición de un fenotipo mesenquimal se asocia a un cambio de

E a N-cadherina, a la regulación al alza de represores transcripcionales de la *E-cadherina*, como el represor transcripcional 1 y 2 de la familia Snail (SNAI1 y SNAI2), *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 y 2* (ZEB1 y ZEB2), y a la regulación a la baja, entre otros, de miembros de la familia miR-200 implicados en el mantenimiento de un fenotipo epitelial (Leskela et al., 2019).

Históricamente se han sugerido tres teorías principales (colisión, combinación, conversión) para explicar la naturaleza bifásica de los carcinosarcomas uterinos (McCluggage, 2002). La teoría de la colisión propone que los componentes del carcinoma y del sarcoma tienen orígenes independientes y chocan para formar un único tumor. La teoría de la combinación propone una única célula madre precursora y su posterior diferenciación para dar lugar a dos componentes histológicos. La teoría de la conversión propone un origen monoclonal y una transición metaplásica del carcinoma al sarcoma. Estudios moleculares han demostrado que las alteraciones en el componente epitelial y el mesenquimal son las mismas, por lo que a día de hoy, a pesar de haber discrepancias en la literatura, está aceptado que casi el total de los carcinosarcomas son carcinomas metaplásicos en los cuales el componente sarcomatoso deriva del epitelial como resultado de la transdiferenciación epitelio-mesénquima (epitelial-to-mesenchymal transition, EMT) durante la progresión tumoral (Castilla et al., 2011; Chiyoda et al., 2012; Mcconechy et al., 2015; Taylor et al., 2006; Zhao et al., 2016). Sin embargo, un pequeño porcentaje de los ECS se constituyen posiblemente de la confluencia de dos tipos tumorales, ya que son molecularmente biclonales y muy probablemente se desarrollan a partir de dos poblaciones celulares independientes (H Wada et al., 1997).

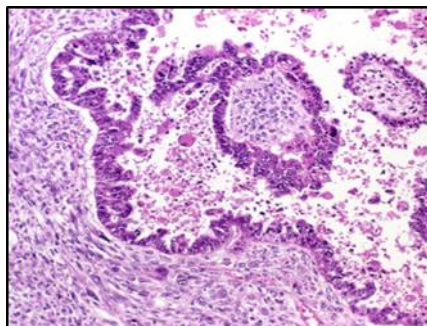


Figura 6: Fotomicrografías de carcinosarcoma endometrial. Modificados de D'Angelo and Prat, 2010.

CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Una adecuada clasificación de los tipos tumorales es crítica para seleccionar la terapia adyuvante apropiada para cada caso. En esta dirección, para combatir las limitaciones derivadas de una falta de precisión en la clasificación dualista (que no tiene en cuenta la heterogeneidad del tumor), se han realizado importantes estudios moleculares que han proporcionado información útil para predecir el pronóstico y la respuesta a tratamientos. La red de investigación de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) realizó en 2013 un estudio en 373 casos de CE que integraba técnicas genómicas, transcriptómicas y proteómicas para caracterizar más extensivamente este tipo de patología tan heterogénea. De esta manera estableció un tipo de clasificación independiente de la histológica. Así, esta nueva organización de los CE incluye 4 subtipos moleculares diferentes en función del espectro de mutaciones, de alteraciones en el número de copias y de la inestabilidad de microsatélites, las cuales han permitido generar un nuevo algoritmo para el diagnóstico del CE, tal y como se especifica en la Tabla 5 y en la Figura 7 (Getz et al., 2013; Murali et al., 2014; Piulats et al., 2017):

- **Grupo 1 o POLE (ultramutado) (7%):** con mutaciones somáticas inactivantes en el dominio exonucleasa de la ADN polimerasa ϵ (POLymerase Epsilon, POLE) y altas tasas de mutación ($232 \cdot 10^6$ mutaciones/Mb), que tienen lugar en *PTEN* (94%), *PIK3CA* (71%), *FBXW7* (82%), *ARID1A* (76%), *KRAS* (53%) y *ARID5B* (47%). Este grupo incluye carcinomas endometrioides de bajo y alto grado. Aunque la mayor proporción son de grado 3, los tumores de este grupo están asociados a un buen pronóstico.
- **Grupo 2 o de inestabilidad de microsatélites (28%):** con IMS, suelen presentar hipermetilación del promotor de *MLH1* así como altas tasas de mutación ($18 \cdot 10^6$ mutaciones/Mb). Los principales genes donde se encuentran estas mutaciones son *PTEN* (88%), *RPL22* (37%), *KRAS* (35%), *PIK3CA* (54%), *PIK3R1* (40%) y *ARID1A* (37%). También suelen ser carcinomas endometriales, en este caso de alto grado; su pronóstico es intermedio.
- **Grupo 3 o de bajo número de copias (39%):** en este caso con baja modificación del número de copias, tienen una baja tasa de mutación ($2,9 \cdot 10^6$ mutaciones/Mb), con mutaciones en *PTEN* (77%), *CTNNB1* (52%), *PIK3CA* (53%), *PIK3R1* (33%), *ARID1A* (42%). Acostumbran a ser CE endometrioides de cualquier tipo histológico, o con histologías mixtas. Su pronóstico también es intermedio.
- **Grupo 4 o de alto número de copias y mutaciones en TP53 o serous-like (26%):** muestra bajos niveles de mutación ($2,3 \cdot 10^6$ mutaciones/Mb), entre las cuales la más frecuente es en *TP53* (92%), *PPP2R1A* (22%), *PIK3CA* (47%). Además, tienen inestabilidad cromosómica, con amplificaciones recurrentes en *MYC*, *ERBB2*, *CCNE1*, *FGFR3*, *SOX17*. Este tipo molecular

está asociado con CE de tipo seroso (94%), mixto (62%) y endometriode de alto grado (12%). Presenta un peor pronóstico.

| | POLE (Ultramutado) | MSI (Hipermutado) | Bajo número de copias (endometriode) | Alto número de copias (pseudoseroso) |
|--|---|---|---|--|
| Alteraciones en el número de copias | Bajo | Bajo | Bajo | Alto |
| MSI/Metilación MLH1 | Variable | MSI elevado | MSI estable | MSI estable |
| Tasa de mutaciones | Muy elevada | Elevada | Baja | Baja |
| Prevalencia de mutaciones | <i>POLE</i> (100%) <i>PTEN</i> (94%) <i>PIK3CA</i> (71%) <i>FBXW7</i> (82%) <i>ARID1A</i> (76%) <i>KRAS</i> (53%) <i>ARID5B</i> (47%) | <i>PTEN</i> (88%) <i>RPL22</i> (37%) <i>KRAS</i> (35%) <i>PIK3CA</i> (54%) <i>PIK3R1</i> (40%) <i>ARID1A</i> (37%) | <i>PTEN</i> (77%) <i>CTNNB1</i> (52%) <i>PIK3CA</i> (53%) <i>PIK3R1</i> (33%) <i>ARID1A</i> (42%) | <i>TP53</i> (92%) <i>PPP2R1A</i> (22%) <i>PIK3CA</i> (47%) |
| Tipo histológico | Endometriode | Endometriode | Endometriode | Seroso, endometriode y mixto |
| Grado | Variable (1-3) | Variable (1-3) | Grado 1 y 2 | Grado 3 |
| PFS | Bona | Intermedia | Intermedia | Baja |

Tabla 5: Clasificación de las 4 clases de tumores de endometrioides y serosos en función de sus características genómicas. PFS: *progression-free survival*. Modificado de *Murali et al., 2014*.

Esta nueva forma de organizar los CE ha permitido demostrar que alrededor del 25% de los tumores clasificados como endometrioides de alto grado presentaban semejanzas con carcinomas serosos, tales como mutaciones en *TP53* y alto número de copias (*Piulats et al., 2017*). Ahondar en la caracterización de los diversos subtipos de CE a la larga repercutirá en el diagnóstico de las pacientes, la elección de las terapias de las mismas, además, posibilitará la generación de tratamientos personalizados según las mutaciones que presente cada tumor.

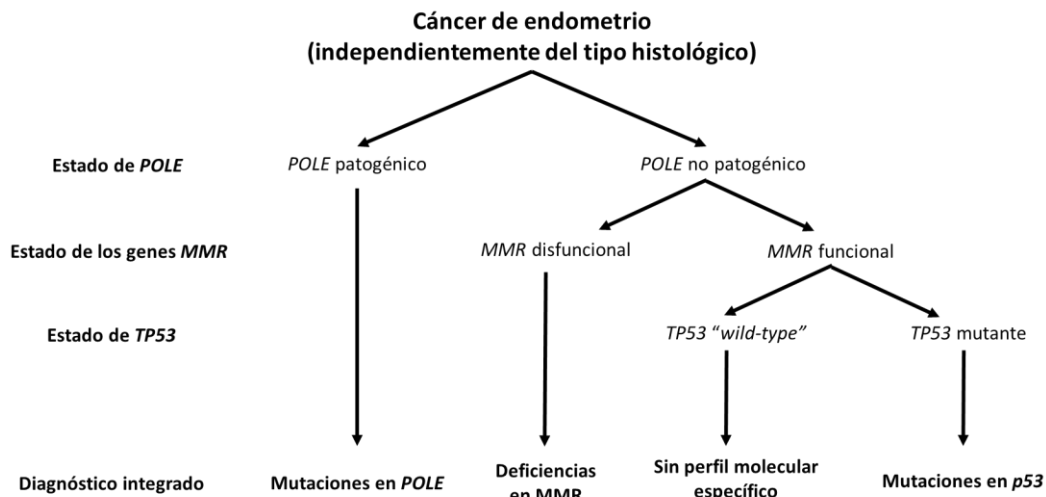


Figura 7: Algoritmo de diagnóstico para la clasificación histomolecular integrada del cáncer de endometrio, aplicable a todos los tipos histológicos. Las diferencias en *mismatch repair* (MMR) se definen por la pérdida de una o más proteínas de MMR (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6).

PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO

Aparte del CE, en el útero aparecen otras lesiones vinculadas a alteraciones hormonales que pueden ser tanto benignas, como es el caso de los pólipos endometriales, los leiomiomas o las adenomiosis, como malignas, como pueden ser por ejemplo las hiperplasias endometriales (Kossai and Penault-Llorca, 2020). En el caso de estas últimas, se desarrollan debido a un crecimiento anormal del endometrio, presentando un incremento de la relación glándula/estroma mayor a 1. En las hiperplasias endometriales las glándulas presentan diversos grados de complejidad y atipias celulares y nucleares. Así, clásicamente se clasifican basándose tanto en el patrón arquitectónico de las glándulas pudiendo ser este simple o complejo, como en la presencia o carencia de atipia nuclear (núcleos grandes y redondeados, nucléolos marcados, pérdida de polaridad) (Singh G and Puckett Y., 2022). Asimismo, en 2020 la OMS ha sintetizado la clasificación de estas lesiones precursoras de carcinoma endometrial diferenciando solamente entre hiperplasias endometriales (HE) no atípicas o simples (HS) y las hiperplasias complejas (HC) con atipia o neoplasias intraepiteliales endometriales (NIE; en inglés: EIN, *Endometrial Intraepithelial neoplasia*) también llamadas adenocarcinomas *in situ* (AIS) (WHO, 2020).

Las HS se caracterizan por la presencia de glándulas simples, acumuladas en una zona del endometrio, pero que a pesar del hacinamiento glandular aún conservan un abundante estroma entre las glándulas. El riesgo de padecer CE en las pacientes que son diagnosticadas de hiperplasia endometrial sin atipia, que en la mayoría de los casos surge debido a la presencia de un ambiente

hiperestrogénico, es 3 a 4 veces mayor que en aquellas mujeres que no sufren esta lesión pretumoral. Por otro lado, en las NIE, también se considera un factor de riesgo la exposición prolongada de estrógeno, pero tras la proliferación glandular clonal, esta deja de estar localizada y puede expandirse ocupando la totalidad del compartimento endometrial. Además, el espacio estromal entre glándulas se reduce considerablemente (Figura 7). Entre un 25 y un 33% de las mujeres que sean diagnosticadas con EIN acaban presentando CE durante el primer año después de la diagnosis. Tanto es así, que muchas de las alteraciones génicas presentes en el CE como pueden ser IMS, mutaciones en *PTEN*, en *PAX2*, en *KRAS*, en *CTNNB1* entre otras, se detectan con gran asiduidad en este tipo de lesiones (Getz et al., 2013; Sanderson et al., 2017).

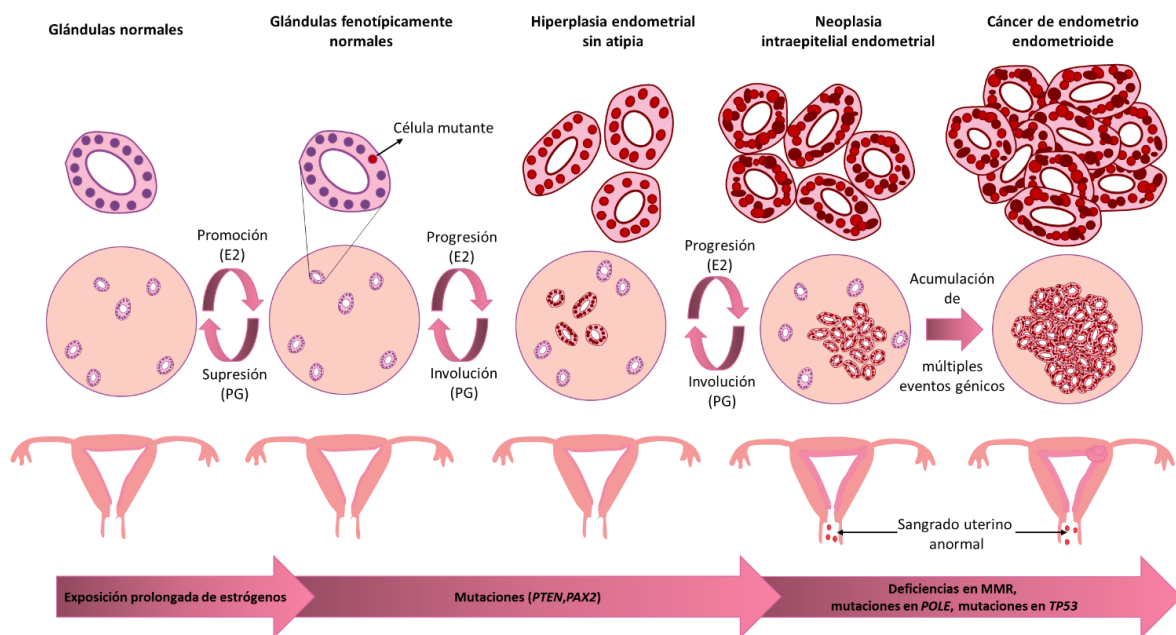


Figura 7: Esquema ilustrativo del mecanismo propuesto para el desarrollo y progresión del carcinoma endometrial. En el endometrio, la exposición de estrógenos (E2) sin un efecto neutralizante de las progestinas (PG), promueve la proliferación de las glándulas endometriales produciéndose así las hiperplasias endometriales. En los casos donde la paciente sufre algún riesgo extra, es probable que se dé un clon mutante. Éste será fenotípicamente normal, pero la alta exposición a estrógenos puede hacer que se siga desarrollando. Con el transcurso del tiempo, el clon puede acumular más daños genéticos que le ayuden a progresar y proliferar, dando lugar en el endometrio a una neoplasia intraepitelial endometrial. La paciente puede presentar síntomas como un sangrado uterino y/o un incremento en el grosor del endometrio. Si persiste el acumulo de daños genéticos, la lesión puede progresar a un CE. Imagen modificada de Sanderson et al., 2017.

El CE se propaga por extensión directa a través del miometrio, por exfoliación de las células que se desprenden a través de las trompas de Falopio, por diseminación linfática y/o por diseminación hematológica (Hanahan and Weinberg, 2011). La vía de diseminación más común es la extensión directa de un tumor al miometrio (Abal et al., 2007). El proceso de invasión miometrial de las células epiteliales se caracteriza por el proceso en diferentes grados de transición epitelio a mesenquima (*epithelial to mesenchymal transition*, EMT), bien de forma transitoria, o bien de forma estable (Colas et al., 2012).

BASES MOLECULARES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CE

Los cambios genéticos, epigenéticos y funcionales en las células son los que marcan la evolución del tumor, ya que son estos diversos cambios son los que modifican la regulación génica, el metabolismo y la división celular del mismo. En cuanto a las alteraciones génicas, es decir, las mutaciones, aquellas que se dan en los oncogenes o en los genes supresores tumorales desempeñan un rol clave en el desarrollo del cáncer. Aquellas perturbaciones en los genes supresores, si llegan a producir la pérdida de función en los dos alelos, promueven la tumorigenicidad permitiendo que el tumor crezca escapando de la muerte celular. En cuanto a los proto-oncogenes, cuya función celular está relacionada con crecimiento y mantenimiento de tejidos y órganos, mediante el estímulo de la división celular, bloqueo de la apoptosis y control de la diferenciación celular entre otros procesos celulares. Las mutaciones que hacen que uno de los alelos de un proto-oncogén se active más de la cuenta, lo que se conoce como “ganancia de función”, convierte a este gen en un oncogén. A nivel celular, los oncogenes actúan de forma dominante, es decir, con un único alelo mutado la célula ya es capaz de modificar su fenotipo.

EL GEN SUPRESOR TUMORAL *PTEN*

En los seres humanos, el gen *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homoleg deleted on chromosome 10*) de 105kb de extensión, se encuentra localizado en la región 10q23 del cromosoma 10, una región del genoma objeto de muchas alteraciones génicas (mutaciones y deleciones) en una gran variedad de cánceres humanos primarios (*Li et al., 1997; Steck et al., 1997*). Así, a día de hoy, *PTEN* se considera uno de los genes supresores tumorales más importantes que se conocen (*Pulido, 2015*). Tanto es así, que, en 2010, se realizó un estudio donde se analizaron las mutaciones de más de 3100 muestras pertenecientes a 12 tipos de tumores, en él, *PTEN* se situó entre los 20 supresores tumorales que mayor frecuencia de mutación tienen (*Beroukhim et al., 2010*).

PTEN está formado por 9 exones diferentes (*Hollander et al., 2011; Li et al., 1997; Steck et al., 1997*). Este gen codifica para una proteína multifuncional de 403 aminoácidos con un peso molecular de 47 KDa. A través de un estudio cristalográfico se vio que *PTEN* contiene dos dominios funcionales para su actividad como supresor: el dominio fosfatasa y el dominio C2. El primero de estos dos, que comprende desde el aminoácido 14 al 185, es el encargado de la actividad catalítica fosfatasa de la proteína, ya que posee un sitio activo HCxxGxxR entre el aminoácido 123 y el 130. El segundo dominio, el C2, que ocupa la región desde el aminoácido 190 al 350, tiene la capacidad de unirse a fosfolípidos de membrana, de esta manera ayuda a que el dominio fosfatasa quede orientado de manera adecuada enfrentándolo al sustrato lipídico (*Hollander et al., 2011; Lee et al., 1999; M M Georgescu et al., 2000*). Además de estas dos regiones, la proteína contiene otros dos dominios funcionales en los extremos N y C terminal. Al extremo N-terminal tiene entre los aminoácidos 7 y 13 un dominio PBD de unión a PIP₂ (*Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate Binding Domain*), que

conjuntamente con el dominio C2 permite que PTEN quede unido a la membrana. Por otro lado, el dominio C-terminal de PTEN se compone de una cola (aminoácidos 351-400) secuencial de repeticiones PEST (prolina- ácido glutámico-serina-treonina) seguida de tres aminoácidos con capacidad de unión PDZ (PDZ binding domain, PDZ-BD). Este extremo hace de estabilizador tanto a nivel proteico como de la actividad enzimática, asimismo, la región PDZ-BD proporciona a PTEN la capacidad de unirse a múltiples proteínas con este dominio (*Hollander et al., 2011; Lee et al., 2018; M M Georgescu et al., 2000; Worby and Dixon, 2014*).

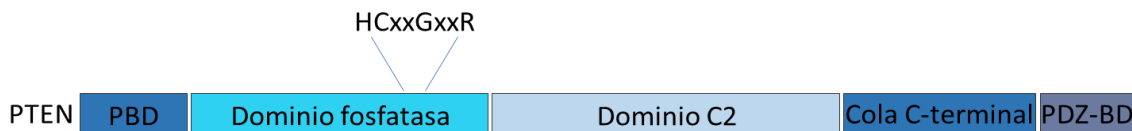


Figura 8: Esquema de la estructura de la proteína PTEN. PTEN está compuesta por 4 dominios funcionales: PBD, dominio fosfatasa, dominio C2 y el extremo carboxil, que engloba la cola C-terminal y el dominio de unión PDZ. Imagen modificada de *Lee et al., 2018*.

Curiosamente, la secuencia aminoacídica de PTEN ha permanecido evolutivamente conservada entre especies, principalmente entre los vertebrados. En el ratón (*Mus musculus*), *Pten* se localiza en el cromosoma 19 y al igual que el humano tiene 403 aminoácidos de longitud. La secuencia murina y la humana son similares al 99,75%, tanto es así que a nivel proteico la única diferencia entre las dos es un cambio aminoacídico de una serina a una treonina en la cola C-terminal (*Leslie et al., 2016*).

La función molecular de PTEN en la vía PI3K/AKT

Desde su descubrimiento en los años 90, han sido muchos los recursos y esfuerzos empleados para estudiar y caracterizar la función de PTEN en contextos celulares normales y patológicos. A este respecto, PTEN, y por ende su función fosfatasa lipídica, no solo está implicada en procesos de desarrollo y evolución del cáncer, de hecho, participa en una gran variedad de etapas biológicas que van más allá de la supresión tumoral. Además, es una proteína cuya actividad funcional varía según su disposición a nivel celular, pudiendo estar localizada en el núcleo o el citosol (*Pulido, 2015; Worby and Dixon, 2014*).

PTEN es una fosfatasa dual no redundante, que tiene como sustratos tanto lípidos como proteínas. Su función catalítica más estudiada es su actividad como fosfatasa lipídica, actuando como regulador negativo de la vía PI3K/AKT (*Stambolic et al., 1998; Wu et al., 1998*). Esta vía, es una ruta de señalización evolutivamente muy conservada, que regula procesos fisiológicos claves en la homeostasis celular. Tal es la importancia de dicha vía que su desregulación conlleva a la aparición

de patologías neurodegenerativas, diabetes o cáncer, donde en la mayoría de los casos es debida a una hiperactivación de la vía (Courtney et al., 2010; Vivanco and Sawyers, 2002).

Las PI3Ks (*Phosphatidylinositol 3-kinases*) conforman una familia de quinasas lipídicas que se separan según su especificidad de sustrato y su estructura en tres familias (I-III). Las quinasas de la clase I se activan a través de una amplia cantidad de receptores de membrana. Estas a su vez se subdividen en dos categorías, la IA y la IB. Las que pertenecen a la primera son heterodímeros formados por la combinación de las distintas variantes de un componente regulador, p85 (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α o p55 γ), una subunidad catalítica, p110 (p110 α , p110 β o p110 δ). Por otro lado, las de la clase IB son PI3K compuestas por el componente catalítico p110 γ y o la subunidad reguladora p101 o la p87. Por último, la caracterización e implicación de las quinasas de clases II y III en el cáncer aún permanecen algo desconocidas. No es así en las de tipo IA, cuya participación en procesos tumorales es ampliamente conocida (Courtney et al., 2010; Thorpe et al., 2015).

La activación clásica de las PI3Ks de la clase IA (Figura 9) resulta de la unión de un factor de crecimiento (*growth factor*, GF) al dominio extracelular de un receptor tirosina quinasa (*Receptor Tyrosine Kinase*, RTK). Cuando esta unión receptor-ligando ocurre se desencadena la activación de la vía PI3K/AKT. Entre los RTKs iniciadores de esta vía se encuentran proteínas como el EGFR (*human epidermal growth factor receptor*), el PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) y el IGFR-1 (*Insulin Growth Factor 1 Receptor*). La actividad quinasa de estos receptores se ve incrementada al unirse el ligando correspondiente a cada uno de ellos, ya que en ese momento estos RTKs se activan, dimerizan y se autofosforilan en el dominio interior del receptor. Es entonces cuando de forma intrínseca o con ayuda de adaptadores (como lo son IRS1 y IRS2; *Insulin receptor substrates*), esta zona fosforilada del receptor puede interactuar con el dominio SH2 (*Src Homology 2*) de p85 (subunidad reguladora de la PI3K), que por su parte reclutará hacia la membrana y dejará de inhibir la subunidad catalítica p110. Alternativamente, la PI3K (p110 α y p110 γ), y por tanto la vía, también puede estimularse por medio de la GTPasa RAS, que se une directamente a la subunidad p110 (Courtney et al., 2010; Pacold et al., 2000; Thorpe et al., 2015). Por lo que afecta a las subunidades p110 β y p110 γ se pueden activar a través de receptores acoplados a proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR) (Guillermet-Guibert et al., 2008).

Una vez la PI3K está activa, cataliza la fosforilación de PIP₂ (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*), convirtiéndolo en PIP₃ (*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). Estos lípidos actúan como mensajeros secundarios de la propagación intracelular de la señal de activación, reclutando y anclando a la membrana diversas proteínas. Esto es posible gracias a que son capaces de unirse a los dominios PH (*pleckstrin homology*) que presentan algunas proteínas citosólicas. Concretamente, facilitan el acercamiento de las proteínas serina/treonina quinasas PDK1

(*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) y AKT, también conocida como PKB (protein kinase B). En condiciones normales, la AKT se mantiene en un estado inactivo mediante la interacción intramolecular de sus dominios PH y quinasa. En cambio, cuando interactúa con PIP₃, a través de su dominio PH, sucede un cambio conformacional que facilita la fosforilación, en la Thr308 de su dominio de activación a través de la PDK-1 (Alessi et al., 1997), y en la Ser473 del motivo hidrofóbico del dominio regulador al complejo mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) (Sarbasov et al., 2005) y a la quinasa DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Surucu et al., 2008). Estas modificaciones en la proteína provocan su activación completa. En este punto, la AKT se disocia de la membrana y actúa fosforilando múltiples proteínas señalizadoras al citosol, que tienen como finalidad promover la proliferación, la supervivencia, el crecimiento y el metabolismo celular, y la angiogénesis, entre otras (Engelman, 2009; Hers et al., 2011; Vivanco and Sawyers, 2002).

Los efectores sobre los que actúa AKT son una gran variedad de proteínas responsables de transmitir la señal por múltiples procesos celulares. Entre estos, se encuentran proteínas reguladoras de la apoptosis, como FoxO (*forkhead box O transcription factors*), BAD (*BCL-2-associated agonist of cell death*) y BIM (*BCL-2 Interacting Mediator of cell death*), entre otros. Otro efector de la AKT es MDM2, que al fosforilarse es capaz de translocarse al núcleo de manera más efectiva lo que le permite unirse a p53 e inducir su degradación. Por otra parte, la AKT activa también la proliferación celular, frenando la acumulación de p27, o potenciando la de Ciclina D1 a través de GSK-3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*). Asimismo, la AKT fosforila TSC2 (*Tuberous Sclerosis 2*) lo que conlleva a su inactivación, induciendo, además, la activación de RHEB (*Ras homologue enriched in brain*), que a su vez estimula la actividad fosfotransferasa de mTOR. Por el contrario, cuando TSC2 no se encuentra fosforilada, forma un complejo con TSC1 (*Tuberous Sclerosis 1*), inhibiendo a RHEB. Finalmente, el AKT puede activar también el complejo mTORC1 por fosforilación inhibitoria de PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40 Kilodaltons*), que es un regulador negativo de este complejo. Además, el complejo mTORC1 activa la traducción proteica por medio de la fosforilación activadora de p70-S6K (*ribosomal protein S6 kinase beta 1*) e inhibidora de 4EBP1 (*Eukariotic Translation initiation factor Binding Protein 1*), permitiendo, esta última, que se libere eIF4E (*eukariotic translation initiation factor 4E*), también activa la traducción y activación de HIF1 (*Hypoxia-inducible factor-1*), que a su vez promueve formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la transcripción de genes como VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Hollander et al., 2011; Vivanco and Sawyers, 2002).

Por todo lo explicado anteriormente, la cascada de señalización PI3K/AKT está implicada en la regulación de una enorme cantidad de procesos celulares esenciales. De ahí que el control estricto de ésta sea muy importante. Entre los mecanismos de inhibición de esta vía, por un lado, está la neutralización de la señal producida por los residuos fosforilados de la AKT (Thr308 y la Ser473),

estos aminoácidos son defosforilados respectivamente por la PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) (*Andjelković et al., 1996*) y PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) (*Brognard et al., 2007*). No obstante, el componente regulador negativo por excelencia de la vía es PTEN. PTEN ejecuta la acción antagonista de la PI3K, generando PIP₂ a partir de PIP₃, impidiendo así con su función de fosfatasa lipídica que se acumule este lípido en la membrana, eludiendo de esta forma la activación de AKT, y consecuentemente, conduciendo a la bajada de la fosforilación de sus sustratos (*Hers et al., 2011; Maehama and Dixon, 1998*). Esta actividad es imprescindible para su papel como supresor tumoral regulando procesos como de metabolismo celular, migración y polaridad, apoptosis o mantenimiento de células madre tumorales (CSC, *Cancer Stem cells*) (*Song et al., 2012*).

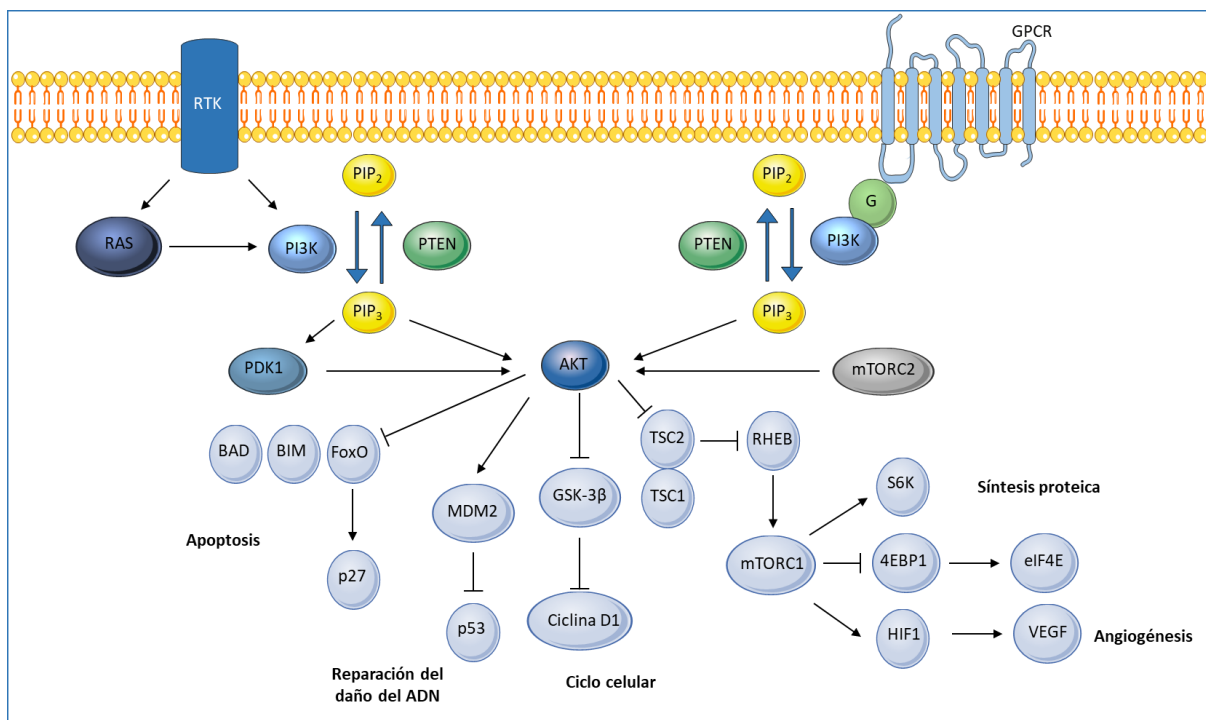


Figura 9: Esquema de la vía de señalización PI3K/AKT. Modificado de *Engelman, 2009*.

Además de su participación en la vía PI3K/AKT en el citoplasma como fosfatasa lipídica, el avance en técnicas y anticuerpos revelaron que PTEN también se podía localizar en el núcleo celular (*Hollander et al., 2011; Planchon et al., 2008*), donde actúa como fosfatasa proteica, regulando por ejemplo el manteniendo de la estabilidad cromosómica uniéndose a CENP-C (*CENTromere Protein C*), o controlando el daño al DNA, regulando la transcripción de RAD51 (*Shen et al., 2007*), o coordinando la condensación de la cromatina, inhibiendo la transcripción génica, al unirse a la histona H1 (*Chen et al., 2014*). Además, gracias a su propiedad de fosfatasa proteica, PTEN puede actuar en las adhesiones focales, con consecuencias sobre la migración celular. En este sentido, por ejemplo, se ha descrito que uno de sus sustratos es la tirosina quinasa SRC (*proto-oncogen tyrosine-protein kinase scr*). Además, la inactivación de PTEN como fosfatasa proteica provoca la activación

de SRC, confiriendo resistencia a los inhibidores de HER2 (*human epidermal growth factor receptor-related 2*), como el Trastuzumab, en células de cáncer de mama (Zhang et al., 2011). Por lo tanto, en la función nuclear de PTEN se integra en su papel como supresor tumoral.

La regulación de *PTEN*

La importancia de *PTEN* como supresor tumoral hace que su regulación a nivel de expresión y activación esté controlada de diversas maneras y para ello estén implicados mecanismos tanto a nivel transcripcional como modificaciones post-traduccionales. Asimismo, su ubicación celular, nuclear y citoplasmática, y las interacciones con otras proteínas también contribuyen a la regulación de su función tanto positiva como negativamente. Gracias a estos mecanismos es posible mantener una actividad robusta y apropiada de PTEN, regular el contingente celular de PIP₃ y restringir así, una posible proliferación y supervivencia celular aberrante promovida por la señalización a través de la PI3K (Song et al., 2012; Tamguney and Stokoe, 2007; Worby and Dixon, 2014). Así, algunos de los reguladores transcripcionales son EGR1 (Virolle et al., 2001) (*early growth response protein 1*), PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) (Patel et al., 2001), la vía NOTCH-1, a través de HES-1 (*Hairy and Enhancer of Split-1*) (Wong et al., 2012), CBF-1 (*c-repeat binding factor 1*) (Whelan et al., 2007) y MYC (Kaur and Cole, 2013). En el cáncer endometrial (H B Salvesen et al., 2001), así como en otros tipos de cáncer (Khan et al., 2004; Rennie and Nelson, 1998; Yazdani et al., 2016) el silenciamiento epigenético del promotor de *PTEN* producido por hipermetilaciones en islas CpG, regula de manera negativa la transcripción del gen.

A nivel post-transcripcional, PTEN es regulado por micro-RNAs (miRNAs), la expresión de estos se ha visto subida en diversos tipos de tumores, correlacionándose con una bajada del mRNA y de la proteína PTEN, entre estos miRNAs destacan por ejemplo miR-17, miR-19, miR-21, miR-25, miR-200, y miR-205, entre otros (Ghafouri-Fard et al., 2021). En EC, tanto el miR-206 (Zheng et al., 2020) como el miR-181a (Geletina et al., 2018) se han descrito su implicación en la modulación de la actividad de PTEN.

Finalmente, PTEN puede experimentar múltiples modificaciones post-traduccionales (PTMs) que regulan la actividad catalítica, la estabilidad, la localización subcelular y las interacciones con otras proteínas. Concretamente, PTEN es susceptible de fosforilización, ubiquitinización, oxidación, acetilación y sumoilación (Milella et al., 2015; Worby and Dixon, 2014).

PTEN en cáncer el cáncer de endometrio

Desde su descubrimiento en los años 90, *PTEN* se ha identificado como uno de los genes supresores tumorales que con mayor frecuencia está mutado en CE, en el 83% de los cánceres y en el 55% de las hiperplasias pretumorales (Risinger et al., 1997). Siendo el CE uno de los tipos de cáncer donde más frecuentemente se encuentra mutado *PTEN*. Como se ha explicado anteriormente, este gen

codifica para una proteína con función fosfatasa lipídica (*Phosphatase and TENSin*, PTEN) que antagoniza la vía PI3K/AKT, por lo que la reducción de la actividad de PTEN en el endometrio aumenta la actividad de dicha vía desencadenando en este tejido un incremento en la proliferación celular y la inducción de la angiogénesis y modifica la adhesión celular y la capacidad migratoria (Tamura et al., 1998). A pesar de ser un supresor tumoral, al contrario de la premisa clásica que afirma que se necesita la pérdida de ambas copias para que surja cáncer (Knudson, 1971), se ha visto que la modificación de uno solo de sus alelos genera ya un modelo de haploinsuficiencia, donde una pequeña reducción de su expresión acaba desarrollando neoplasias (Alimonti et al., 2010). En PTEN, el 60% de las mutaciones suelen ser inserciones o deleciones que generan cambios en la pauta de lectura (en muchos casos producidas por la IMS). Dentro de estas mutaciones la más reiterada en PTEN se da en el exón 5, que codifica para el dominio fosfatasa de la proteína, esto produce que el aminoácido 130 (perteneciente a su sitio activo HCxxGxxR), la arginina sea sustituida por una glutamina (R130Q), la cual produce inestabilidad estructural y genera un mutante catalíticamente inactivo. Por otro lado, también se ha observado LOH (*loss of heterozigosity*) por deleción en un 40% de los CE (Eritja et al., 2015; Hollander et al., 2011). La hipermetilación de su promotor es otro de los mecanismos descritos para la inactivación de este gen en el CE (H B Salvesen et al., 2001). Por último, se ha visto que en tumores endometriales con IMS presentan una mayor tasa de mutaciones en PTEN, esto sugiere que gran parte de las mutaciones que acontecen en este gen pueden ser debidas a un fallo en el mecanismo de reparación del ADN. La deleción o hipermetilación de MLH1, por ejemplo, se ha asociado con una temprana LOH de PTEN (Getz et al., 2013; H B Salvesen et al., 2001).

EL GEN SUPRESOR TUMORAL TP53

En humanos gen TP53 o p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y codifica para una proteína nuclear de 53 KDa, de ahí su nombre. En ratones, denominado Trp53 o p53, se encuentra en el cromosoma 11 (Levine et al., 1994). Se considera un gen supresor de tumores mutado en aproximadamente el 50% de los tumores (Olivier et al., 2010). La proteína de p53 presenta tres regiones: un dominio N-terminal que corresponde a la región de transactivación, una zona intermedia que es la responsable de la unión al ADN y un dominio C-terminal en el que tiene el dominio de tetramerización, ya que la proteína activa se encuentra en forma de tetrámero (Joerger and Fersht, 2010). El gen de TP53 está formado por 11 exones, y es del exón 5 al 8 donde se han encontrado el 80% de las mutaciones descritas (Murray et al., 1965).

P53 actúa como un detector del estrés celular que responde a las señales de daño al ADN (se activan proteínas como ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), ATR (*Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related protein*) y CHK1/2 (*CHeckpoint Kinase 1*)), la hipoxia, la privación de nutrientes y la disfunción de los ribosomas causando la parada del ciclo celular (Brosh and Rotter, 2009; Horn and Vousden,

2007). P53 puede provocar la parada del ciclo celular en la fase G1/M a través de la activación de p21, la cual inhibe la formación de los complejos cdk2/Ciclina E impidiendo la fosforilación de pRb. Además, p53 también participa en la parada del ciclo celular a la fase G2/M permitiendo la reparación de las lesiones. En el caso de que esto no sea posible, se activa el sistema de muerte programada, también conocido como apoptosis, forzando a que las células que contienen lesiones en ADN no proliferen. Es por ello que se conoce al gen *TP53* como el “guardián del genoma” (Lane, 1992) (Figura 10).

Por lo tanto, p53 en situaciones con poco estrés celular desencadena toda una serie de mecanismos de reparación del ADN, tales como pro-supervivencia y producción de proteínas antioxidantes (Giono and Manfredi, 2006). Y en el caso de que el estrés celular continúe hasta alcanzar niveles más altos y no se pueda reparar el daño al ADN, p53 promueve la apoptosis o la senescencia (estado permanente de aturdimiento celular) para evitar que las células malignas con alteraciones proliferen, para ello, activa proteínas como BAX (Bcl-2 Associated X), FAS (*Fas cell surface death receptor*), NOXA (daño en latín) y PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Gottlieb and Vousden, 2010; Joana D Amaral et al., 2010) (Figura 10).

La cantidad de p53 dentro de la célula está muy controlada, su principal elemento regulador es MDM2, que causa la degradación de p53 mediante su ubiquitinización y posterior degradación por el proteosoma. De hecho, MDM2 actúa sobre p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el citoplasma, MDM2 provoca la ubiquitinización de p53 y la marca para su degradación en el proteosoma. En el núcleo, MDM2 se une a p53 y enmascara su dominio de activación transcripcional y, además, también ubiquitina a p53, estimulando su migración al citoplasma donde será degradada (Ute M Moll and Oleksi Petrenko, 2003; Waning et al., 2010) (Figura 10).

A su vez, la expresión de MDM2, también está regulada negativamente por p53 de manera una vez se ha reparado el daño en el ADN y los niveles de p53 bajan y suben los de MDM2. Por otra parte, la activación de la vía de PI3K, a través de AKT, provoca la fosforilación de MDM2 provocando que migre del citoplasma al núcleo y generando la ubiquitinización de p53 (Manfredi, 2010) (Figura 10).

Por otro lado, PTEN y p53 comparten un complejo sistema de regulación. En primer lugar, p53 se une al promotor de PTEN, de manera que potencia su expresión. Por consiguiente, PTEN puede estabilizar p53 a través de mecanismos dependientes e independientes de su actividad fosfatasa. En la primera situación, la inhibición de la vía PI3K/AKT por PTEN da lugar a la inactivación de MDM2, de manera que se evita la degradación de p53. En este contexto, PTEN se asocia físicamente por su dominio C2 a p53, estabilizando y potenciando su unión al ADN (Freeman et al., 2003) (Figura 10).

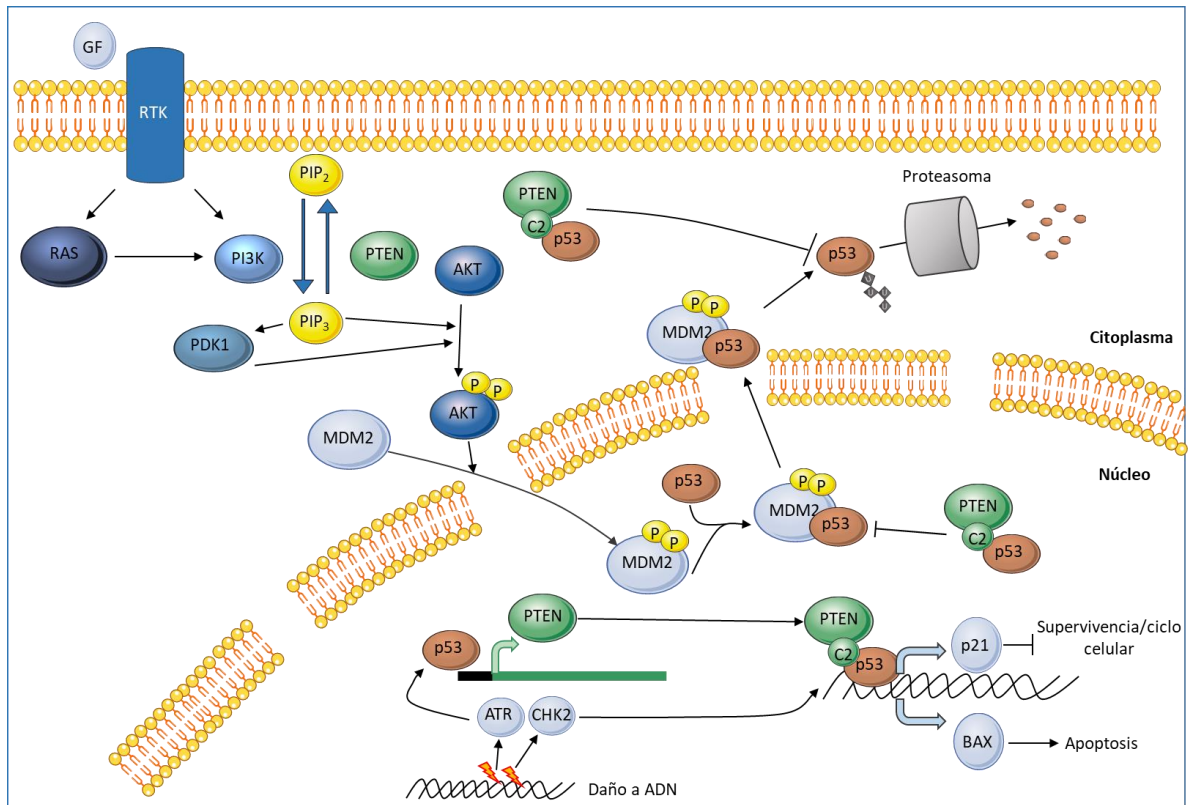


Figura 10: Esquema de la señalización de p53 y su interacción funcional con PTEN. PTEN y p53 interactúan en tres niveles. Primero, la fosfatasa PTEN inhibe la activación de MDM2 manteniendo inactiva a AKT. AKT, cuando se activa a través de la vía de la PI3K, puede fosforilar la MDM2 citoplásmica, lo que provoca su importación nuclear. El MDM2 nuclear ubiquitina a p53 y lo destina a la degradación proteasomal en el citoplasma. En segundo lugar, el daño en el ADN provoca un fuerte aumento de la proteína p53 que, a su vez, puede potenciar la transcripción de PTEN al unirse al promotor de *PTEN*, lo que da lugar a un bucle de retroalimentación positiva que protege a p53 de la degradación. Por último, PTEN se une a p53 dando lugar a un aumento de la vida media de p53. Esta interacción también estimula la transcripción mediada por p53. El PTEN citoplásmico también puede antagonizar la degradación de p53 por los proteasomas citoplásmicos. Modificado de *Trotman and Pandolfi, 2003*.

Tras su mutación, la proteína no funcional se acumula en el interior de la célula y actúa como dominante negativa de la p53 nativa (modelo de haploinsuficiencia en supresores tumorales) (*Bansal et al., 2009*). Se ha estudiado el papel de p53 en el cáncer y la hiperplasia endometrial, mostrando que la mutación del gen p53 es dos veces más frecuentes en los tumores sin hiperplasia (no relacionados con el estrógeno) que en aquellos con hiperplasia (relacionados con el estrógeno) (*Kaku et al., 1999; Koul et al., 2002*). Esto tiene sentido, puesto que una de las alteraciones más frecuentes en el carcinoma seroso son mutaciones en p53, presentes en cerca del 90% de los casos (*H Tashiro et al., 1997*). En otros estudios se vio que mutaciones en p53 también estaban presentes en el 17% de los casos de CEE, pero este porcentaje representaba en su mayoría un subconjunto de adenocarcinomas endometriales agresivos (de Grado III) (*D'Andrilli et al., 2012; Lax et al., 2000*). Las alteraciones de p53 desempeñan un papel relativamente menor en el carcinoma endometrial de células claras en comparación con el tipo seroso (*Lax et al., 1998*).

OTRAS ALTERACIONES GENÓMICAS EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Como se describe anteriormente, los cánceres de endometrio presentan un mecanismo de tumorigénesis y progresión diferente según los tipos histopatológicos y clínicos. En la tabla 6 se recogen la frecuencia de las distintas mutaciones en los tipos histológicos de cánceres endometriales endometrioides, serosos y carcinosarcomas.

Uno de los eventos génicos relevantes en estos tipos de tumores es la inestabilidad de microsatélites. Los microsatélites son unas secuencias repetitivas que constituyen y mantienen la estructura cromosómica, esto es así porque del ADN no codificante que constituye el 95% del total del ADN, los microsatélites conforman la mitad de sus secuencias. Están implicados en la evolución de los genes y genomas (*Ellegren, 2000*). Estas secuencias cortas al ser muy repetitivas son muy susceptibles a padecer errores en el momento de la replicación del ADN, en los casos donde se da un acumulo de estas mutaciones, si además la célula presenta fallos en el sistema de reparación del DNA en proteínas como MSL1, MSH2, PMS2 y MSH6, tendrá lugar lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (IMS). Entorno al 20-30% de los CE de tipo I presentan dicha inestabilidad (*Risinger et al., 1993*) siendo una de las principales causas causa la inactivación epigenética debida a la hipermetilación del promotor de *MLH1* (*Caduff et al., 1996; Esteller et al., 1998*) y *MSH2* (*Chang et al., 2016*). También se ha reportado que la MSI es más frecuente en el cáncer endometrial endometriode que en el no endometriode (*Catasus et al., 1998*).

Por otra parte, Mig-6, codificada por el gen supresor *MIG-6* (*Mitogen-inducible gene 6*), también conocido como inhibidor de la retroalimentación del receptor ERBB 1 (*ERBB receptor feedback inhibitor 1*, *ERRFI1*), importante para la regulación hormonal durante la implantación del cigoto en el útero (*Jeong et al., 2009; Tae Hoon Kim et al., 2010a*), promueve la apoptosis celular mediante la bajada de expresión (*downregulación*) de inhibidores de apoptosis inducidos por estrógenos y la inhibición de la fosforilación de ERK (T. H. Kim et al., 2014) y AKT (*Yoo et al., 2018*), que corresponden respectivamente a la vía MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y PI3K/AKT, ambas vías implicadas en proliferación y diferenciación celular. Las mutaciones en este gen actúan de forma sinérgica con las deficiencias en PTEN en la progresión de CE (T. H. Kim et al., 2014, 2010).

Otra proteína cuya alteración está asociada a un pronóstico desfavorable en el cáncer de endometrio, es la p16 (*Protein atlas*). Esta es codificada por un gen supresor, el gen *CDKN2A*. A esta proteína se le unen las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (*Cyclin-Dependent Kinases*, *CDK4* y *CDK6*), por lo que actúa impidiendo que estas CDKs promuevan la progresión del ciclo celular. Por ello la inactivación de esta proteína tiene como resultado el crecimiento descontrolado de las células (*Bansal et al., 2009; Engelsen et al., 2009*).

| Gen | Carcinoma endometriode | Carcinoma seroso | Carcinosarcoma |
|----------------|------------------------|------------------|----------------|
| <i>PTEN</i> | 82% | 10% | 19% |
| <i>PIK3CA</i> | 54% | 37% | 35% |
| <i>PIK3R1</i> | 36% | 11% | 11% |
| <i>CTNNB1</i> | 34% | 1% | 2% |
| <i>ARID1A</i> | 54% | 8% | 12% |
| <i>KRAS</i> | 24% | 3% | 12% |
| <i>CTCF</i> | 31% | 2% | 7% |
| <i>TP53</i> | 21% | 88% | 91% |
| <i>FBXW7</i> | 17% | 24% | 39% |
| <i>PPP2R1A</i> | 11% | 38% | 28% |
| <i>CHD4</i> | 9% | 18% | 17% |
| <i>CCNE1</i> | 16% | 26% | 41% |
| <i>MYC</i> | 14% | 24% | 21% |
| <i>MECOM</i> | 18% | 33% | 18% |
| <i>PIK3CA</i> | 10% | 22% | 11% |
| <i>ERBB2</i> | 8% | 19% | 9% |

Tabla 6. Comparación de la frecuencia de mutación entre los distintos tipos de cáncer endometrial según el TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*) Modificado de (Leskela et al., 2019).

El gen *ARID1A*, otro supresor tumoral, codifica para una proteína con actividad helicasa y ATPasa (*AT-Rich Interacting Domain-containing protein 1A*, *ARID1A*). Esta forma parte de un complejo proteico, SNF/SWI, de remodelación de la cromatina. La modulación de la cromatina es necesaria para que puedan transcribirse genes que en ciertas condiciones se encuentran reprimidos por la estructura de ésta. La pérdida de actividad de la *ARID1A* activa la supervivencia celular a través de la vía PI3K/AKT, en este sentido, en el CE la pérdida de la función supresora se ha relacionado también con IMS por medio de silenciamiento epigenéticos de genes del *MMR* (Bosse et al., 2013). Este gen suele aparecer mutado en estadios tempranos del CE, en la progresión de neoplasia intraepitelial endometrial a carcinoma endometriode. Así, se encuentra mutado en un 87% de los CEE de bajo grado, en el 60% en los CEE de alto grado y en el 5-11% de los adenocarcinomas de tipo seroso (Takeda et al., 2016). Y además, recientemente se ha visto que juega un papel importante en la tumorigénesis endometrial (Megino-Luque et al., 2022).

En relación a los oncogenes, el que más destaca en CE es *K-RAS* (*Kirsten RAt Sarcoma viral oncogen*). Este oncogén codifica para una proteína inicial de la vía MAPK, la proteína KRAS. Las mutaciones en *KRAS* conllevan a una proliferación incontrolada y una desdiferenciación celular debida a la hiperactivación de la vía. La mutación de *KRAS* se ha encontrado en el 10-30% de los casos de CE (Engelsen et al., 2009), especialmente en el CEE (Caduff et al., 1995; T Enomoto et al., 1990). Su

presencia en el 16% de los casos de hiperplasia endometrial señala que las mutaciones en este gen son unos eventos que se correlacionan con los primeros procesos de la progresión tumoral del CE (*Di Cristofano and Ellenson, 2007*). En contraste con los carcinomas endometrioides, las mutaciones de K-ras son extremadamente raras entre los carcinomas serosos y de células claras (*Esteller et al., 1997; Semczuk et al., 1998*).

HER2/neu, o *erbB2*, es un oncogén que codifica para el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2*). Este receptor es una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa implicada en la señalización celular, en procesos como el crecimiento celular, supervivencia, adhesión, migración y diferenciación. La sobreexpresión de *HER2/neu* se ha descrito en aproximadamente el 10%-20% de los carcinomas endometrioides de grado 2 y 3 (*Duggan et al., 1994; Ioffe et al., 1998; Williams et al., 1999*) y entre el 9% y el 30% de los carcinomas serosos (*Slomovitz et al., 2004*) y un 3-20% en los carcinosarcomas endometriales (*Livasy et al., 2006; Sawada et al., 2003*).

Otra proteína altamente alterada en el CE es *PI3KCA* (*phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic subunit Alpha*), que como su nombre indica pertenece a la vía PI3K/AKT y está relacionada con la supervivencia celular y el aumento de la proliferación. La frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA* en el cáncer de endometrio es del 28% (*Yuan and Cantley, 2008*).

En relación con la vía PI3K/AKT, otro de los genes implicados en esta vía que se encuentra altamente mutado en EC es el gen que codifica para la subunidad alfa de la PP2A (*Protein phosphatase 2A*), el *PPP2R1A*. Este gen está mutado en un 10-13% de los EC, siendo los carcinomas endometriales serosos los que presentan una mayor tasa, un 31%. Así, las alteraciones en este gen representan el segundo mayor porcentaje de mutación más elevado, tras *p53*, en los carcinomas serosos de alto grado (*McConechy et al., 2011; Nagendra et al., 2012*).

También son frecuentes las alteraciones en genes codificantes para moléculas de adhesión, como es el caso del gen *CDH1*, que codifica para la E-Cadherina, o del gen *CTNNB1*, codificante para la proteína β -catenina, un componente de la familia de las E-cadherinas, esenciales para el correcto mantenimiento de la arquitectura tisular y en la transcripción de genes. La β -catenina a través de la activación de la cascada de señalización de la vía Wnt. Las alteraciones en genes que codifican para proteínas relevantes en el mantenimiento de la estructura tisular y diferenciación celular están relacionadas con una disminución de la adhesión intracelular, y se considera un paso previo a la migración celular. Una mutación de β -catenina genera proteínas mutantes que son resistentes a la degradación, lo que da lugar a la acumulación citoplasmática y nuclear de β -catenina y a la actividad constitutiva de los genes diana. Varios estudios han analizado los cánceres de endometrio, mostrando que la acumulación nuclear de β -catenina es significativamente más común en las

lesiones endometrioides (31% a 47%) en comparación con las histologías no endometrioides (0% a 3%) (Moreno-Bueno et al., 2002). Asimismo, se ha visto que esta acumulación es mayor en hiperplasias endometriales que en los carcinomas, lo que sugiere que las mutaciones relacionadas con *CTNNB1* están relacionadas con eventos tempranos en la carcinogénesis tumoral (H Nei et al., 1999).

Otro gen con ganancia de función que se encuentra alterado en CE es *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*), las mutaciones en este receptor hacen que este se hiperactive, lo que conduce a la proliferación celular. Existen mutaciones en el *FGFR2* en el 10-16% de las muestras de tumores uterinos primarios (Byron et al., 2008). En los cánceres endometrioides primarios, las mutaciones en *FGFR2* y *KRAS* son mutuamente excluyentes. Por el contrario, se observaron mutaciones de *FGFR2* junto con mutaciones de pérdida de función de *PTEN* (Gatius et al., 2011).

El supresor tumoral *FBXW7* (*F-box and WD repeat domain-containing 7*) forma parte de un complejo de ubiquitina ligasa SCF (*proteín complex of SKP1, Cullin 1, F-box*) que controla la degradación de numerosos sustratos, muchos de ellos oncoproteínas, que, si no se regulan adecuadamente, pueden contribuir al inicio o la progresión de la tumorigénesis (Z. Wang et al., 2014; Yeh et al., 2018). *FBXW7* presenta tres isoformas, la α (nuclear), la β , y la γ (citoplasmáticas y nucleolares). Este gen se ha visto mutado en el 17-30% de los CE serosos (Getz et al., 2013; Le Gallo et al., 2012), en el 7-25% de CE de células claras (Le Gallo et al., 2017; Stelloo et al., 2015) y 3-18% de CE endometrioides de grado 3 (Getz et al., 2013; Lehrer and Rheinstein, 2021a; Stelloo et al., 2015; Urick et al., 2021). A pesar de la alta tasa de mutabilidad en CE, hasta la fecha poco se sabía de las consecuencias moleculares de las mutaciones de *FBXW7* en estos tumores. No ha sido hasta estos últimos años donde han aparecido estudios que lo relacionan con la inhibición de la fosforilación de mTOR a través de la regulación de la vía NOTCH (Liu et al., 2020) y con la alteración de los niveles proteicos de L1CAM (*L1 Cell Adhesion Molecule*) y TGM2 (*Transglutaminase 2*) (Lehrer and Rheinstein, 2021a).

Por otro lado, los receptores de estrógenos y de progesterona, receptores nucleares expresados en el endometrio sano, tienen la capacidad de unirse a zonas específicas del ADN actuando como factores de transcripción. Existen dos isoformas de cada uno de los receptores, y la pérdida del balance entre ellos es crucial durante la tumorigénesis endometrial (R L Arnett-Mansfield et al., 2001). La falta de expresión de receptores hormonales está relacionada con una mayor agresividad y un mal pronóstico.

Por último, las mutaciones somáticas inactivantes en el dominio exonucleasa de la ADN polimerasa ϵ (*POLymerase Epsilon, POLE*) se han identificado en el 7-12% de los CE (Rayner et al., 2016). Los tumores que presentan dicha mutación, como ha explicado anteriormente en la clasificación

molecular del CE, muestran una mejor supervivencia y prognosis independientemente del tipo, grado y estadio en el que se encuentre el tumor (*Imboden et al., 2019*).

Como se ha descrito con anterioridad, gran parte de las hiperplasias y de CE de tipo I están relacionados con estados de alta exposición a estrógenos. No obstante, en la progresión del CE, las mutaciones en *PTEN* y *K-RAS* parecen ocurrir al principio del proceso de carcinogénesis. Posteriormente, se produce la inactivación de *E-cadherina*. En momentos más tardíos del desarrollo, en el CE endometriode de alto grado y de mal pronóstico, aparecen mutaciones en *TP53* y *HER2/neu*, típicas de carcinomas endometrioides de tipo II, que también podrían ser mutaciones *de novo*, sin formar parte de la progresión, en carcinomas de tipo I mal diferenciados. Tanto las mutaciones en *p16* y en *HER2/neu*, como la inactivación de *E-cadherina* parecen afectar a la progresión del carcinoma no endometriode (*Banno et al., 2014; Liu, 2007*). Tanto el carcinoma endometriode de alto grado como el no endometriode pueden progresar mediante transición epitelio-mesénquima hasta alcanzar la composición histológica del carcinosarcoma (*Mirantes et al., 2013b*) (Figura 11).

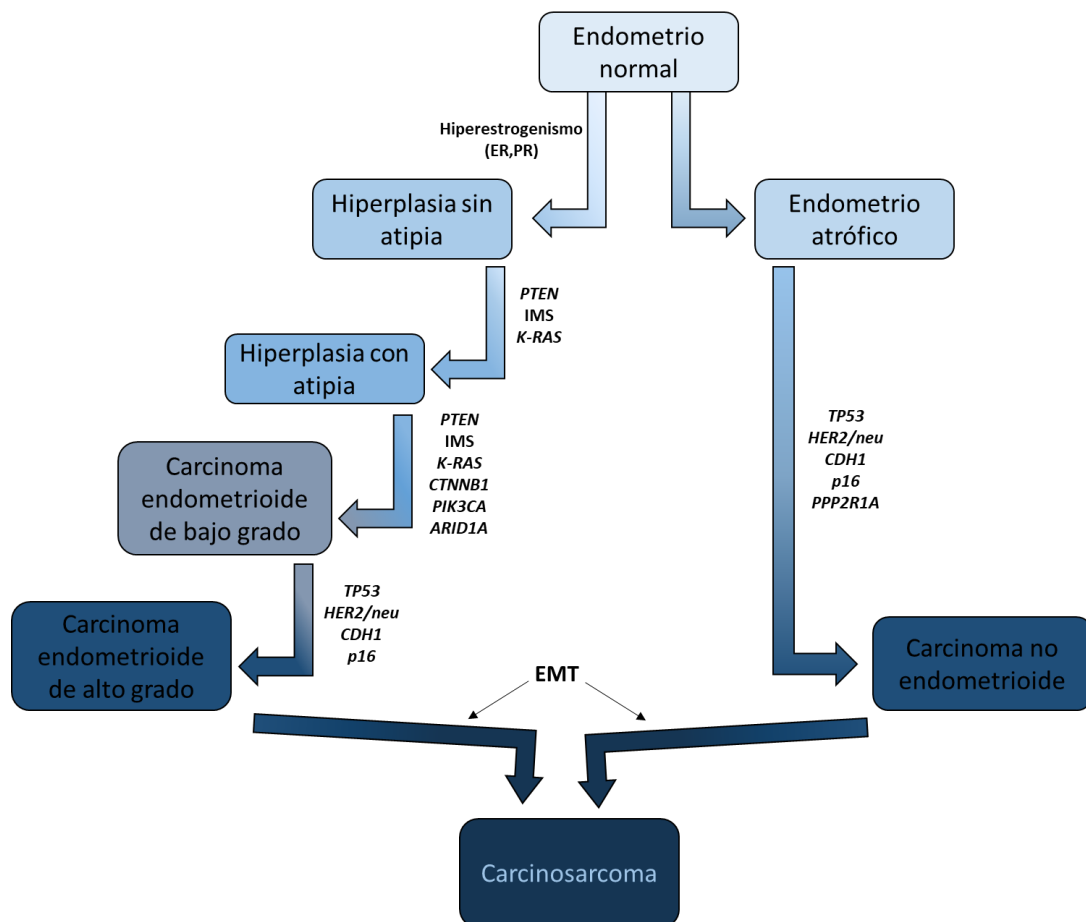


Figura 11: Modelo de progresión del cáncer de endometrio de tipo endometriode y no endometriode, representando algunas de las modificaciones génicas que se dan en cada caso. Modificado de *Banno et al., 2014; Leskela et al., 2019*.

OTROS TIPOS DE CÁNCER EN EL ÚTERO: SARCOMAS UTERINOS

A diferencia de los adenocarcinomas, que surgen de las células epiteliales, los sarcomas uterinos son un tipo de cáncer que se origina de tejidos como los músculos lisos, la grasa, los huesos y el tejido fibroso (tendones y ligamentos) que rodean a los órganos. El sarcoma uterino representa el 1% de las lesiones del tracto genital femenino y entorno al 3-7% de los cánceres en el útero (*Major et al., 1993*).

Desde el punto de vista histológico, los sarcomas uterinos se clasificaron primero en carcinosarcomas, que representan el 40% de los casos, leiomiomas (40%), sarcomas del estroma endometrial (10% a 15%) y sarcomas indiferenciados (5% a 10%). Recientemente, el carcinosarcoma también conocidos como tumores müllerianos mixtos malignos ha sido reclasificado como una forma desdiferenciada o metaplásica de carcinoma endometrial (colocándolo en el subgrupo de adenocarcinomas mixtos). A pesar de ello, y probablemente porque se comporta de forma más agresiva que el carcinoma endometrial ordinario, el carcinosarcoma sigue incluyéndose en la mayoría de los estudios retrospectivos sobre sarcomas uterinos (*WHO, 2020*).

LEIOMIOSARCOMAS UTERINOS (FIGURA 12A).

Tras excluir el carcinosarcoma, el leiomioma se ha convertido en el subtipo más común de sarcoma uterino, que se origina en la pared muscular del útero, el miometrio. Sin embargo, sólo representa el 1-2% de las neoplasias uterinas. Muestran una atipia nuclear de moderada a grave y contienen una alta tasa mitótica. La incidencia del leiomioma es de 0,3-0,4/100.000 mujeres al año (*Harlow et al., 1986*). Aproximadamente 1 de cada 800 tumores de músculo liso del útero es un leiomioma (*Harlow et al., 1986*). La mayoría de los leiomiomas se producen en mujeres mayores de 40 años que suelen presentar una hemorragia vaginal anormal (56%), una masa pélvica palpable (54%) y dolor pélvico (22%). La mayoría de los leiomiomas uterinos son tumores de alto grado, muy agresivos, con un mal pronóstico y una alta recurrencia (*Abeler et al., 2009*).

Los leiomiomas bien diferenciados están formados por células musculares lisas alargadas con núcleos regulares. En el otro extremo del espectro, un leiomioma poco diferenciado muestra células redondeadas y pleomórficas que prácticamente no se parecen a las células musculares lisas normales.

Son frecuentes las zonas de necrosis y las hemorragias, que se llegan a observar macroscópicamente. Con frecuencia, los leiomiomas han invadido el tejido miometrial

adyacente en el momento del diagnóstico, incluso hasta el punto de atravesar la superficie serosa del útero y afectar a otros órganos pélvicos. La invasión vascular se encuentra en el 10-20% de los casos (*WHO, 2020*).

TUMORES DE MÚSCULO LISO DE POTENCIAL MALIGNO INCIERTO (STUMP)

Los tumores de músculo liso uterino que muestran algunas características histológicas preocupantes (es decir, necrosis, atipia nuclear o mitosis), pero que no cumplen todos los criterios diagnósticos del leiomioma, entran en la categoría de STUMP. El diagnóstico de STUMP, sin embargo, debe utilizarse con mucha moderación y debe hacerse todo lo posible para clasificar un tumor de músculo liso en una categoría específica (*WHO, 2020*). La mayoría de los tumores clasificados como STUMP se han asociado a un pronóstico favorable y, en estos casos, sólo se recomienda el seguimiento de los pacientes. De hecho, en un estudio reciente de 41 casos de STUMP, la tasa de recurrencia fue del 7% (*Guntupalli et al., 2009*).

SARCOMAS DEL ESTROMA ENDOMETRIAL

Los tumores del estroma endometrial son los segundos tumores mesenquimales más frecuentes del útero, aunque representan menos del 10% de todos los tumores de este tipo. Se llama así a las neoplasias compuestas típicamente por células que se asemejan a las células del estroma endometrial de un endometrio proliferativo. La actual Organización Mundial de la Salud reconoce 4 categorías de tumor del estroma endometrial que son: nódulos estromales endometriales, sarcomas del estroma endometrial de bajo grado (*WHO, 2020*), sarcomas del estroma endometrial de alto grado y sarcomas uterino indiferenciado (*Conklin and Longacre, 2014*).

- Nódulos estromales endometriales: Estos tumores se presentan a cualquier edad durante la etapa reproductiva o posterior. La principal característica distintiva de los nódulos estromales endometriales es su margen expansivo, no infiltrante y liso que contrasta con el margen irregular infiltrante de los sarcomas estromales. Los nódulos estromales endometriales tienen un pronóstico excelente y las pacientes se curan mediante histerectomía (*Moore and McCluggage, 2020; TAVASSOLI and NORRIS, 1981*)
- Sarcomas del estroma endometrial de alto y bajo grado (Figura 12B): Los sarcomas del estroma endometrial representan menos del 0,5% de todos los tumores uterinos malignos y el 10-15% de las neoplasias uterinas con componente mesenquimal. Se producen en mujeres de entre 40 y 55 años de edad. Se han notificado algunos casos en pacientes con poliquistosis ovárica, tras el uso de estrógenos o la terapia con tamoxifeno (*Thiel and Halmen, 2018*). En los de bajo grado, las metástasis en los ganglios linfáticos se producen hasta el 30% de los pacientes. Puede dar metástasis pulmonares (9-43% de los tumores recurrentes e incluso el 10% de los tumores en estadio I). La supervivencia a los 5 años es del 67-100% con una supervivencia media de 11 años (*Riopel et al., 2005*). Los sarcomas de

alto grado presentan una progresión rápida con recurrencias frecuentes generalmente pélvicas antes de los 2 años del diagnóstico inicial. La mayor parte de las pacientes con metástasis o recidiva pélvica, tiene metástasis abdominales o pulmonares.

- Sarcoma endometrial indiferenciado (Figura 12C): son sarcomas de alto grado histológico, con invasión del miometrio, atipia celular, pleomorfismo nuclear, una tasa mitótica muy elevada, necrosis celular y no presentan una diferenciación de musculo liso ni de estroma endometrial. En cambio, puede haber diferenciación rabdomiosarcomatosa y osteosarcomatosa (Evans, 1982). Es un tumor agresivo que suele presentarse en mujeres posmenopáusicas. La presentación clínica más común es una masa pélvica y una hemorragia vaginal anormal. En un 60% de las pacientes existe una diseminación extrauterina del tumor a la parte superior del abdomen, a los ganglios linfáticos pélvicos a lugares distantes, como los pulmones (Conklin and Longacre, 2014).

Otras neoplasias raras de sarcoma mesenquimatoso uterino son los adenosarcomas y los rabdomiosarcomas.

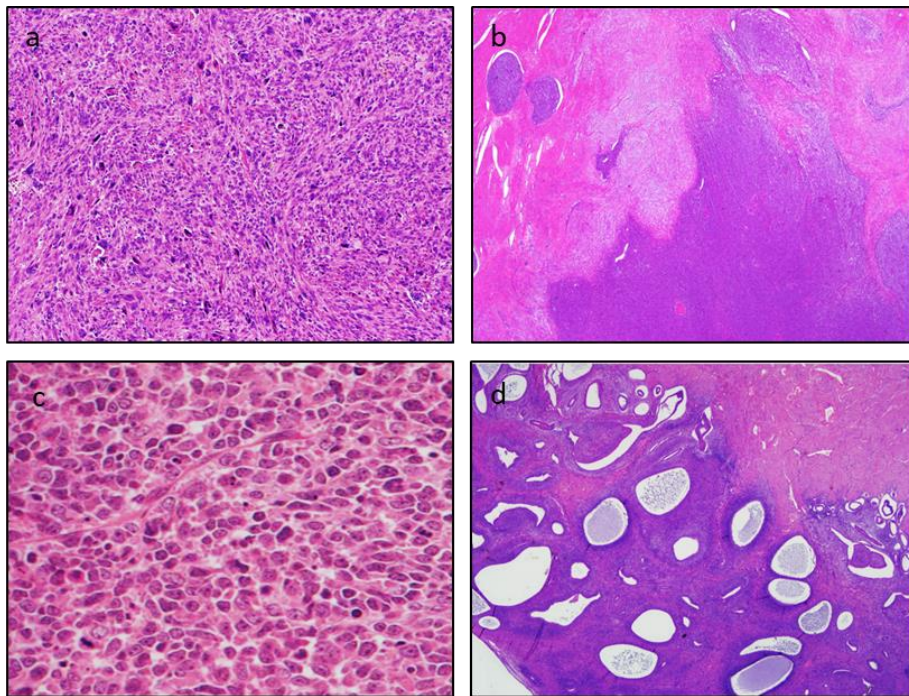


Figura 12: Fotomicrografías de sarcomas uterinos. (A) Leiomiosarcoma uterino. (B) Sarcoma estromal endometrial. (C) Sarcoma endometrial indiferenciado. (D) Adenosarcoma uterino. Modificados de (Cotzia et al., 2019; D'Angelo and Prat, 2010).

La inmunohistoquímica puede ayudar significativamente en la distinción de los tumores (Tabla 7). Un panel inmunohistoquímico inicial común es el de CD10, desmina, receptor de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP). Aunque el CD10 se expresa de manera uniforme en el estroma endometrial, es importante tener en cuenta que no es específico y se identifica en una variedad de tumores, incluidas las neoplasias de músculo liso (*McCluggage et al., 2001*). Por lo tanto, la interpretación de estas inmunotinciones debe centrarse en el grado relativo de positividad de cada una de ellas, más que simplemente en el hecho de que cada una sea positiva o negativa. También es importante tener en cuenta el grado de diferenciación del tumor al interpretar los resultados inmunohistoquímicos. Por ejemplo, la expresión de RE y RP se mantiene típicamente en un patrón nuclear difuso y fuerte en los sarcomas del estroma endometrial de bajo grado y en los nódulos estromales endometriales, pero es típicamente ausente o sólo focal y débil en los sarcomas uterinos indiferenciados (*Devaney and Tavassoli, 1991; Franquemont et al., 1991; Oliva et al., 2002*).

En los casos difíciles con resultados inmunohistoquímicos coincidentes, es una buena práctica emplear un panel más amplio, que incluya h-caldesmon, actina de músculo liso, calretinina entre otros (*Franquemont et al., 1991; Nucci et al., 2001*).

| | LG-ESS | HG-ESS | UES | LMS | Carcinosarcoma |
|----------------------|--------|--------|-------------|----------|----------------|
| CD10 | ++ | +/- | Heterogéneo | +/- | - |
| Desmina | +/- | +/- | - | ++ | - |
| h-caldesmon | +/- | +/- | - | ++ | - |
| Ciclina D1 | - | ++ | +/- | Rara vez | - |
| ER | ++ | +/- | Heterogéneo | +/- | - |
| PR | ++ | +/- | Heterogéneo | +/- | - |
| Citoqueratina | - | - | - | - | Rara vez |

Tabla 7: Inmunohistoquímica de sarcomas uterinos para la diagnosis diferencial. Adaptada de *Conklin and Longacre, 2014*. LG-ESS: del inglés *Low-Grade Endometrial Stromal Sarcoma*; HG-ESS: del inglés *High-Grade Endometrial Stromal Sarcoma*; UES: del inglés *Undifferentiated endometrial Sarcoma*; LMS: *Leiomyosarcoma*.

MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA TUMORIGÉNESIS ENDOMETRIAL

Durante las últimas décadas, con el propósito de recrear los factores estructurales y moleculares característicos de la enfermedad, así como para descubrir y validar nuevos fármacos, se han empleado muchos esfuerzos para establecer y desarrollar de modelos *in vivo* e *in vitro* para el estudio preclínico del carcinoma de endometrio. Estos modelos han ido mejorando y cambiando con el paso de los años y la aplicación de uno u otro modelo varía según el objetivo de la investigación. Estos modelos van desde cultivos de líneas celulares hasta modelos humanizados de ratón, a los que se inoculan células derivadas del tumor del paciente (Figura 13).

LÍNEAS CELULARES Y XENÓGRAFOS DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES

El uso de cultivos *in vitro* e *in vivo* de líneas celulares tumorales inmortalizadas ha tenido a lo largo de la historia un papel destacado en el desarrollo y validación de fármacos contra el cáncer endometrial (Bergadà et al., 2013; Hasegawa et al., 2013; Llobet et al., 2010; Sharma et al., 2010; Yoshioka et al., 2013). A pesar de esto, a día de hoy, debido a los procesos de inmortalización y al crecimiento continuo a los que se ven sometidas las células, hacen que la relevancia clínica de estos modelos celulares sea baja. En cambio, el hecho de usar este tipo de modelo permite que se trabaje en condiciones estandarizadas, haciendo de él un modelo útil para descubrimiento de mecanismos moleculares y vías biológicas relacionadas con los fenotipos tumorales. No obstante, cabe señalar que en los estudios *in vitro* las células carecen de cualquier tipo de interacción con el microambiente, y que se encuentran en condiciones de crecimiento (niveles de oxígeno, nutrientes, ...) diferentes a las que se encontraban estas células en los tumores primarios dentro del paciente (Sharma et al., 2010)

, de ahí la mayor relevancia clínica de los xenógrafos derivados de las líneas. Han sido muchas las líneas celulares que se han generado durante los últimos años para el estudio del carcinoma endometrial, algunas de ellas derivadas de tumores de tipo I, como por ejemplo AN3CA, HEC1A, HEC1B, Ishikawa, MFE-280 o RL-95-2, y otras procedentes de tumores de tipo II, como es el caso de las líneas ARK1, ARK2 y SPEC2. Cada una de ellas presentando diferentes alteraciones en *PTEN*, *PI3KCA*, *KRAS*, *TP53*, inestabilidad de microsatélites, ... (Y. Wang et al., 2010; Weigelt et al., 2013). Desde hace unos años, los datos de expresión, análisis de número de copias de los cromosomas, secuencias mutadas, entre otros datos, de 28 de estas líneas de CE se encuentran recogidas en la CCLE (del inglés, *Cancer Cell Line Encyclopedia*) recogidos por el Instituto Broad del MIT y Harvard (CCLE).

MODELOS TRIDIMENSIONALES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL

En los últimos años, se ha visto que muchos de los resultados de los estudios realizados *in vitro* con líneas tumorales discrepaban con los efectos observados a posteriori a nivel clínico. Por este motivo, en la última década se han dedicado importantes esfuerzos a desarrollar nuevos modelos *ex vivo* e *in vivo* que imiten mejor la fisiología de los tumores originales. Los modelos preclínicos 3D relevantes para el cáncer de endometrio incluyen esferoides celulares, organoides derivados de pacientes, sistemas microfluídicos, xenógrafos derivados de pacientes y explantes derivados de pacientes.

MODELOS ESFEROIDES, ORGANOIDES, EXPLANTES Y *ORGANS-ON-A-CHIP*

Así, en varios estudios se vio que, con ciertas modificaciones de las condiciones de cultivo, las líneas celulares de endometrio (*Chitcholtan et al., 2013*), así como las células de endometrios sanos y tumorales de humano (*Boretto et al., 2017; Turco et al., 2017*) y de ratón (*Eritja et al., 2010*), se podían cultivar *in vitro* con una estructura tridimensional (3D) asemejándose así los cultivos más a la arquitectura de los tejidos sanos y tumorales. Por un lado, vio que los esferoides de líneas celulares de cáncer de endometrio mostraban diferentes comportamientos que las mismas creciendo en monocapa (2D), variando su tasa de proliferación, fenotipos metabólicos alterados, cambios en la expresión de genes, cambios en la señalización intracelular debida a la polaridad adquirida (basal-apical), así como comportamientos diferentes al tratamiento con quimioterapéuticos, entre otras cosas, y que estos comportamiento se asemejaban más a lo que ocurría a niveles clínicos. Además, estos modelos permiten el estudio de invasión al tener estos modelos matriz extracelular (*Buck et al., 2021; Chitcholtan et al., 2013*). Por otro lado, los cultivos de organoides en 3D derivados de muestras de tumores endometriales, llamados también *PDOs* (*Patient-Derived Organoids*) o *CTOS* (*cancer tissue-originated spheroids*) conservan muchas de las características moleculares y funcionales del tumor primario, como por ejemplo la heterogeneidad tumoral (*Yoshida et al., 2018*). Estos cultivos pueden congelarse y descongelarse, lo que permite generar bancos de células específicos para cada paciente (*Boretto et al., 2017; Turco et al., 2017*). Asimismo, estos organoides se pueden inocular en ratones. Estos modelos *in vitro* e *in vivo* de organoides se comportan de manera muy similar al tumor primario del que originan, por ello se han usado para validar la sensibilidad de los tumores a nuevos fármacos, y para el descubrimiento de mecanismos moleculares y vías biológicas relacionadas con los fenotipos tumorales (*Boretto et al., 2019; Nuria Eritja et al., 2017; Girda et al., 2017; Kiyohara et al., 2016*). No obstante, hay que tener en cuenta que estos los modelos de esferoides y organoides no logran mimetizar las interacciones tumor-estroma que influyen en el desarrollo tumoral y en la sensibilidad y la resistencia a fármacos (*Mcmillin et al., 2013*). Este modelo de organoides *in vitro* e *in vivo* se ha utilizado para el estudio y caracterización del CE (*Alzamil et al., 2021; Boretto et al., 2019; Maru et*

al., 2021, 2019; Pauli et al., 2017). En los últimos años para solventar el problema de las interacciones tumor-estroma, se está implementando el uso de co-cultivos de células estromales junto con los organoides epiteliales (Al-Juboori et al., 2019).

En cuanto a los explantes derivados de pacientes (del inglés *Patient-Derived Explant*, PDE), históricamente se han usado para evaluar la fisiología normal del endometrio, carcinogénesis, efecto de fármacos, entre otras cosas (Fasciani et al., 2003; Marbaix et al., 1995; Pitt et al., 2001; Sharma et al., 2003; Vassilev et al., 2005). Los explantes tumorales *ex vivo* se consiguen a través de una biopsia tumoral del tejido fresco, y colocándola en condiciones de cultivo definidas, para así de una manera rápida poder predecir cómo responderá el paciente a un cierto agente terapéutico (Jung et al., 2013; Karekla et al., 2017; Majumder et al., 2015). Este modelo conserva la estructura integra del tejido (estroma, linfocitos infiltrantes, ...) (Nakasone et al., 2012). En endometrio estos explantes tumorales están ligados a una pequeña viabilidad, por ello son pocos los artículos donde se desarrollan estos cultivos tumorales *ex vivo*. En ellos se ha podido estudiar la respuesta a fármacos, y así evaluar los mecanismos de acción de estos fármacos en el tejido tumoral (Dolcet et al., 2006; Sales et al., 2010, 2007).

Por otro lado, los llamados modelos de órganos-en-chip (del inglés, *organs-on-a-chip*, OOC) son sistemas de microfluídicos en los que se las células o tejidos se colocan en unas cámaras biomiméticas donde circula el medio, con el fin de reproducir la fisiología y el funcionamiento de los tejidos dentro de un órgano o la interrelación entre diferentes órganos (Bhatia and Ingber, 2014). Esta técnica aún no se ha desarrollado para el estudio de carcinoma endometrial, aun así, presenta un gran potencial traslacional para la prueba de medicamentos, pudiéndose estudiar con ellos el crecimiento, la latencia, la invasión y la respuesta a la terapia del tumor, como ya se ha visto en otros tipos de tumores (Dadgar et al., 2020; Hassell et al., 2017; Sung et al., 2011). La aplicación de este modelo *ex vivo* para el estudio de los diferentes escenarios del CE tendrá lugar en el transcurso de los próximos años, puesto que en estos últimos 5 años se ha puesto punto un nuevo sistema microfluídico, conocido como EVATAR, que mimetiza el tracto reproductivo femenino (Xiao et al., 2017).

Por ultimo decir que los modelos tridimensionales que preservan el microambiente tumoral y las interacciones tumorales-estromales son cada vez más importantes para la investigación traslacional con la llegada de la inmunoterapia y las terapias dirigidas. Por ejemplo, los estudios con PDE son muy valiosos para estudios relacionados con inmunoterapia, debido a su capacidad de preservar las células inmunitarias nativas de la paciente en su arquitectura tridimensional original.

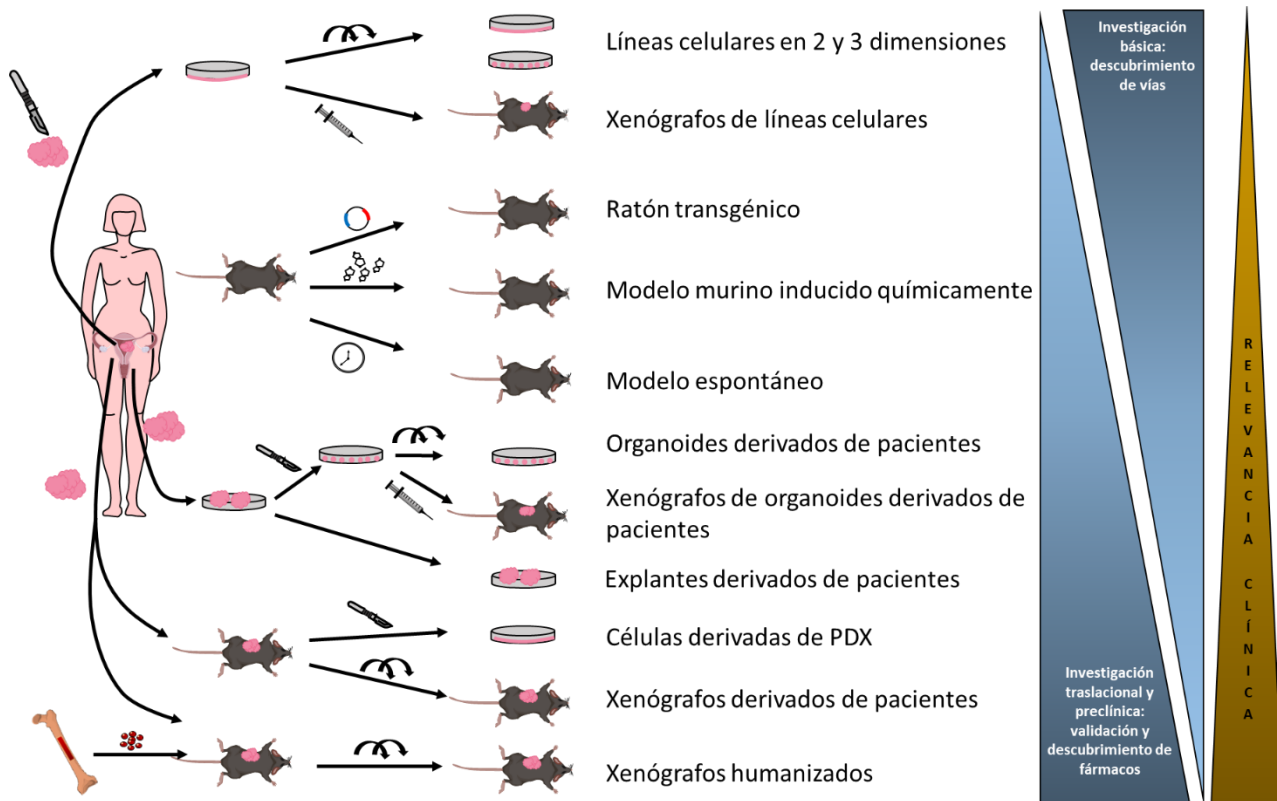


Figura 13. Representación gráfica de los diferentes modelos preclínicos disponibles para la investigación del cáncer de endometrio hasta la fecha. Las líneas celulares y los xenógrafos derivados de ellas son modelos para la investigación básica del CE, pero carecen de relevancia clínica. Los modelos *in vivo*, como los transgénicos, los inducidos químicamente y los espontáneos, son clínicamente más significativos, pero carecen de propiedades derivadas de la paciente. En cambio, los modelos derivados de pacientes (organoides, xenógrafos y ratones humanizados) tienen la mayor relevancia clínica y son útiles para el descubrimiento y la validación traslacional y preclínica de fármacos, aunque es menos probable que se utilicen para la investigación fundamental (básica). Modificado de *Nyen et al., 2018*.

MODELOS *IN VIVO* DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO

El desarrollo de modelos animales como los de ratón y rata, ha sido crucial para la investigación básica y traslacional en el cáncer, para estudiar los mecanismos moleculares que rigen y fomentan los procesos tumorales, así como para identificar nuevas y mejores estrategias terapéuticas y de diagnóstico. El hecho de que hayan sido una de las herramientas fundamentales para el estudio del cáncer es, en esencia, porque su obtención y utilización es relativamente sencilla, y además permiten el ensayo de fármacos a escala poblacional. Aún con todo y ello, en relación al uso de estos modelos, cuando se trata de comparar la biología de los tumores murinos y humanos, hay que considerar que existen disparidad entre ellos. Un primer lugar puede ser la diferencia de la vida media entre ambas especies, siendo la de los seres humanos entre 30 y 50 veces más que los ratones y las ratas. Además de la desigualdad en el tamaño, ya que los roedores son aproximadamente 3500 veces más pequeños y que, por tanto, los humanos sufren muchas más divisiones celulares. Todo esto, implica que los tumores podrían desarrollarse y evolucionar de forma diferente. Así, por ejemplo, se ha demostrado que las células murinas precisan tan solo de

dos alteraciones genéticas para ser potencialmente tumorígenas, mientras que las células humanas requieren de más cambios para poderse transformar (*Hahn et al., 1999*). Sorprendentemente, es equiparable entre roedores y humanos la probabilidad de llegar a desarrollar cáncer, en ambos casos, el 30% de los individuos desarrollan cáncer al final de su vida en ratones y a los 70-80 años en humanos (*Rangarajan and Weinberg, 2003*). Con todo ello, en varias revisiones (*Anisimov et al., 2005; Ma et al., 2015; Rangarajan and Weinberg, 2003*), se recogen los puntos flacos y deficiencias que existen al usar los modelos murinos, por ejemplo a nivel de mecanismos antitumorígenicos, las células de los ratones presentan un potencial replicativo ilimitado (expresión constitutiva de la telomerasa) y tienen autosuficiencia en la señal de crecimiento, lo que implica que su comportamiento en la carcinogénesis y en respuestas a fármacos antineoplásicos pueda ser diferente a lo que ocurre en humanos (*Anisimov et al., 2005; Rangarajan and Weinberg, 2003*).

MODELOS ESPONTÁNEOS DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO EN ROEDORES

Es sabido, que los roedores, al igual que los humanos, desarrollan cáncer de manera espontánea a lo largo de su vida. Pero no fue hasta principios de los años 80, donde en un estudio realizado con ratas de la cepa Han:Wistar, se vio que algunos de estos tumores aparecían en el endometrio, y además con una alta incidencia del 39% (*Deerberg et al., 1981; Vollmer, 2003*). Años más tarde, fueron descubriéndose y describiéndose otros modelos espontáneos de CE en otras cepas de rata. Así, se vio que en las ratas Donryu tenían una incidencia de 35,1% de CE (*Nagaoka et al., 1990; Tanoguchi et al., 1999*). Este modelo se ha usado tradicionalmente para el estudio del desarrollo del carcinoma de endometrio en relación a cambios hormonales (*Takehashi et al., 2012; Kojima et al., 1994; Nagaoka et al., 1994; Yoshida et al., 2009, 2002*), cambios de dieta (*Nagaoka et al., 1995*) y efectos reproductivos (*Nagaoka et al., 2000*). Asimismo, también se encuentran en la literatura estudios de adenocarcinomas uterinos espontáneos en otros modelos de rata en las cepas DA/Han, BDII/Han y Fischer 344 (F344). En el caso de las primeras, éstas exhiben una alta tasa metastásica (20% a los 19 meses), y el CE es la causa de muerte en el 60% de los individuos a los 24-27 meses (*Vollmer, 2003*). Este modelo, a pesar de su alta incidencia tumoral espontánea, apenas se ha usado para el estudio experimental de CE, solo como modelo hospedador de xenógrafos de líneas celulares (*Diel et al., 2001; Horn et al., 1993; Zierau et al., 2004*). En el caso de las ratas BDII/Han, el tumor endometrial que se desarrolla de forma esporádica se asemeja molecularmente al CE de tipo I (*Samuelson et al., 2009*), en este modelo hasta el 90% de las ratas mueren por CE (*Kaspereit-Rittinghausen et al., 1987; Vollmer, 2003*). Este modelo, sí que ha sido utilizado en una gran cantidad de estudios de CE (*Adamovic et al., 2008; Karlsson and Klinga-Levan, 2008; Nordlander et al., 2008; Roshani et al., 2005; Samuelson et al., 2008b, 2008a*). Por último, las ratas F344, que presentan una menor incidencia de CE, se han usado para el estudio de receptores hormonales en el CE (*Willson et al., 2015*).

Los modelos espontáneos de rata con CE a pesar de recapitular algunas de las características moleculares y genómicas observadas en los tumores humanos, no son una herramienta frecuentemente usada ni para el estudio molecular del CE ni para la validación de fármacos en el ámbito preclínico. Esto es porque los modelos espontáneos presentan ciertos inconvenientes, como la difícil predicción del momento de desarrollo del tumor, ya que no es posible saber si las lesiones se desarrollarán y cuándo, y puede pasar un largo periodo de tiempo antes de que empiecen a crecer.

En cuanto a modelos espontáneos de CE en ratón, el uso de ellos no aparece reflejado en la literatura, todo lo contrario que ocurre en los modelos transgénicos de CE, donde prima el uso de ratones al de ratas.

MODELOS DE CARCINOMA ENDOMETRIAL INDUCIDOS QUÍMICAMENTE EN ROEDORES

A pesar de existir modelos espontáneos de CE, este tipo de tumores también se pueden inducir de manera química, resolviendo así el problema de la predicción del desarrollo tumoral en los modelos espontáneos. Para la generación de estos modelos tumorales, de manera tradicional, se han usado *in vivo*, en combinación con estrógenos (Niwa et al., 1993, 1991; Takahashi et al., 2004), dos compuestos químicos alquilantes, la *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) (Niwa et al., 2000; Onogi et al., 2006) y la *N*-ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) (Takahashi et al., 2004; Yoshida et al., 2004), que generan modificadores en ADN, ARN y proteínas ocasionando efectos mutagénicos y oncogénicos (Osterman-Golkar, 1974).

Los modelos animales de CE inducidos químicamente se han utilizado como modelos translacionales para investigar los efectos de los agentes quimiopreventivos. Niwa et al., 2000 los utilizaron para estudiar el efecto del danazol en la carcinogénesis endometrial, mientras que otros investigaron el efecto del tamoxifeno (Takahashi et al., 2002) y del indol-3-carbinole dietético (Yoshida et al., 2004) en el crecimiento del adenocarcinoma endometrial. Sin embargo, un inconveniente importante es que la exposición a los compuestos químicos podría tener efectos perjudiciales en el metabolismo de tejidos y órganos específicos. Esto limita mucho su uso, ya que implica que el metabolismo de un nuevo fármaco podría verse alterado de alguna manera en los animales que fueron expuestos a los compuestos químicos [71].

Por otro lado, se ha descrito que la exposición a estrógeno durante el estado neonatal de ratones de la cepa CD-1 aumenta la incidencia de la tumorigénesis en varios órganos, incluido el útero, durante su desarrollo adulto (Liehr, 2001; Newbold et al., 2001, 1997, 1990; Newbold and Liehr, 2000; Yoshida et al., 2000). Esto, junto con el hecho de que en humanos una exposición prolongada de estrógeno sea un factor de riesgo del CE, hace hipotetizar que la exposición a estrógeno sea un carcinógeno (Liehr, 2000).

MODELOS MURINO TRANSGÉNICOS DE CÁNCER ENDOMETRIAL.

Aunque las terapias moleculares dirigidas (inhibidores de mTOR (Aghajanian et al., 2018; Oza et al., 2011; Slomovitz et al., 2010) e inhibidores de ERBB2/HER2 (Fader et al., 2018; Fleming et al., 2010; Leslie et al., 2012)), junto con los agentes antiangiogénicos (Aghajanian et al., 2011; Lorusso et al., 2019) y la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control (“*checkpoint*”) (Le et al., 2017, 2015; Ott et al., 2017; Taylor et al., 2020), son eficaces en un subconjunto de pacientes con enfermedad avanzada o recurrente (Lee, 2021), las opciones de tratamiento para el CE siguen siendo limitadas, lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas. Los modelos de cáncer que imitan con precisión las propiedades biológicas de los tumores humanos son esenciales para el descubrimiento eficiente de fármacos y el esclarecimiento de los mecanismos de carcinogénesis. Con este fin, a lo largo de los años se han establecido varios modelos murinos *in vivo* para el CE utilizando ratones modificados genéticamente (RMGs o GEM del inglés, *genetically engineered mouse*). En términos generales, los modelos de RMGs incluyen ratones que sobreexpresan un transgen, modelos *knock-in* (KI) para mutaciones puntuales y *knock-out* (KO) completos y condicionales empleando el sistema *Cre/locus of X (cross)-over in P1 (Cre/loxP)* (Carver and Pandolfi, 2006). Por ejemplo, en estudios preclínicos recientes en los que se utilizaron ratones transgénicos con CE se probó el olaparib (inhibidor de PARP) (Janzen et al., 2013), el dienogest (progestágeno de cuarta generación) (Saito et al., 2016) y el palbociclib (inhibidor de CDK4/6) (Dosil et al., 2017). Estos modelos también se han utilizado para evaluar el efecto de la dieta en la tumorigénesis de los CE, demostrando que la elevación de los ácidos grasos ω -3-poliinsaturados atenúa el desarrollo de los CE inducido por la deficiencia de PTEN (Pan et al., 2015).

Modelos murinos con modificaciones genéticas sistémicas

A finales de los 90, tres grupos independientes desarrollaron ratones *knock-out* de *Pten*, que permitieron demostrar su función como gen supresor tumoral (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998). En los tres modelos, la mutación en homocigosis que da lugar a la pérdida bialélica de *Pten* provoca letalidad embrionaria. Así, los ratones *Pten*^{-/-} no son viables y, dependiendo del modelo, mueren entre E6.5 y E9.5, a causa de defectos durante el desarrollo embrionario y malformaciones en el tubo neural (Di Cristofano et al., 1998; Freeman et al., 2006; Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998). A pesar de este inconveniente, el estudio de los ratones heterocigotos (*Pten*^{+/-}) en estas tres publicaciones resultó de gran utilidad y permitió concluir que la pérdida de expresión de un único alelo de *Pten* es suficiente para inducir el desarrollo de diferentes tipos de lesiones precancerígenas o neoplasias malignas en diversos órganos, incluyendo el endometrio, tiroides, mama, entre otros (Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000). Todos los modelos de ratones heterocigotos en el locus de *Pten* acababan generando hiperplasias con varios grados de atipias, en las que el 22% de los ratones progresaban

hasta CE al cabo de un año. A pesar de todo, existe disparidad entre el fenotipo tumoral de los tres modelos, ya que no generan las mismas lesiones, ni con la misma frecuencia, ni en el mismo espacio temporal (*Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000; Suzuki et al., 1998*) (Tabla 8). Por una parte, las diferencias fenotípicas pueden corresponderse a las distintas estrategias acometidas para generar los diversos modelos. De esta manera, todos ellos coinciden en la supresión del exón 5 del gen *Pten*, el exón codificante para el dominio fosfatasa de la proteína, pero cada uno de estos ratones presenta una escisión diferente entre los exones 3-6. En segundo lugar, y más importante, se ha demostrado que las variaciones en el espectro tumoral, en las frecuencias descritas y en el momento de aparición de las diferentes alteraciones histológicas dependen especialmente del fondo genético en el que se establece la colonia (*Freeman et al., 2006*).

En consonancia con la elevada frecuencia de MSI en el CE (*Black et al., 2006; Bonneville et al., 2017*), la pérdida concurrente de *Mlh1* en los ratones *Pten*^{+/-} acelera la tumorigénesis endometrial, lo que pone de manifiesto el papel clave que desempeña la maquinaria de reparación del ADN en el desarrollo del CE (*Wang et al., 2002*). En otro estudio, para recapitular la situación en mujeres de mediana edad con estrógenos, se implantaron gránulos de 17β-estradiol en ratones *Pten*^{+/-} sometidos a ooforectomía. Como se predijo, este tratamiento dio lugar a un aumento de la incidencia de cáncer, lo que subraya los efectos pro-tumorigénicos del estrógeno. Por el contrario, los ratones *Pten*^{+/-}; *ERα*^{-/-} mostraron paradójicamente una mayor incidencia de carcinoma *in situ* e invasivo que los ratones *Pten*^{+/-}, lo que sugiere que la pérdida del *ERα* (*Estrogen Receptor α*) podría promover el desarrollo del CE (*Joshi et al., 2012*) (Tabla 9). Asimismo, en cuanto a *Pten* existen varios modelos de ratones *knock-in* que presentan mutaciones puntuales a lo largo del gen, éstas principalmente comportan una sustitución aminoacídica en los dominios funcionales de PTEN, por lo que alteran las funciones catalíticas de la proteína, estos modelos sistémicos *KI* de *Pten* se han usado para otros modelos tumorales, pero ninguno de ellos para CE (*Papa et al., 2014; H. Wang et al., 2010*). En el caso de los genes distintos de *Pten*, hay poca información sobre los RMGs sistémicos con el desarrollo del CE. Por lo tanto, se desconoce en gran medida si una determinada combinación de alteraciones genéticas sistémicas podría conducir al desarrollo de tumores en el útero.

Modelos murinos con modificaciones genéticas específicas de útero

La utilización de la tecnología de recombinación *Cre/LoxP*, que permite el control espacial y temporal de la expresión génica (H. Kim et al., 2018; Kühn and Torres, 2002), ha identificado el papel de numerosos genes en el desarrollo del sistema reproductor femenino y en procesos, como la regulación hormonal, la ovulación y la decidualización endometrial, entre otros que son necesarios para el establecimiento y el mantenimiento del embarazo en los mamíferos (Chemerinski et al., 2022; Chen et al., 2009; Mehta et al., 2016; Ni and Li, 2017; Petit et al., 2007). De la misma manera, esta tecnología se ha utilizado también para el estudio de la carcinogénesis y otras enfermedades en gran variedad de tejidos (Deng, 2014), y en lo que concierne a esta tesis también en el útero. Para ello, a lo largo de los años, se han generado varios modelos transgénicos de ratón que presentan actividad Cre recombinasa en el útero resumidos en la Tabla 8. Cada una de ellas presenta ciertas variaciones en los lugares donde se da la expresión del *Cre*. Así, para generar modelos *knock-out* condicionales que desarrollen CE, estos ratones *Cre* se han combinado con otros RMGs que presenten alteraciones (secuencias en los genes de interés flanqueadas por secuencias *loxP*, es decir, regiones del ADN *floxeadas*) en genes importantes para el desarrollo y progresión del CE, como por ejemplo, el gen *Pten* en el modelo condicional *Pten^{floxed/floxed}* (*Pten^{ff}* o *Pten^{ff}*), donde se encuentran flanqueados por secuencias *loxP* el exón 5 de los dos alelos de *Pten* (Lesche et al., 2002). Todos estos modelos se explican con mayor profundidad en los siguientes apartados, no obstante, en la tabla 9 se presenta un resumen de todos RMGs para el CE existentes en la literatura hasta la fecha de hoy. Con todo, el uso de estos modelos también presenta ciertos inconvenientes. En primer lugar, suele requerir mucho tiempo y trabajo, especialmente cuando se requieren alelos condicionales para múltiples genes. En segundo lugar, la mayoría de las líneas transgénicas *Cre* actuales proporcionan una especificidad tisular limitada cuando se generan modelos de CE mediante el entrecruzamiento de RMGs con alelos floxeados condicionales. Para desarrollar una línea transgénica *Cre* idónea, que solo sale en las células epiteliales del endometrio, es necesario identificar los genes que se transcriben específicamente en estas células endometriales. A pesar de los intensos esfuerzos realizados, la investigación en este campo no ha logrado hasta ahora encontrar estos ratones tan buscados.

| | Especificidad celular en el útero | | Otros AGF | | Otros órganos no genitales afectados | | | Referencia |
|--|--------------------------------------|----------------|-----------|------|--|--|--|-----------------------------|
| | Epitelio | Mesénquima | Ovarios | TF | | | | |
| <i>Pgr-Cre</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | glándula pituitaria y glándula mamaria | | | (Soyal et al., 2005) |
| <i>Sprr2f-Cre</i> | ✓ | | ✓ | ✓ | riñón, cerebelo | | | (Contreras et al., 2010) |
| <i>BAC-Sprr2f-Cre</i> | ✓ | | | | | | | (Cuevas et al., 2019) |
| <i>Ltf-iCre</i> | ✓ | | | ✓ | glándula neutrófilos mamaria, | | | (Daikoku et al., 2014) |
| <i>Ksp1.3-Cre</i> | ✓ | | | ✓ | riñón | | | (Shao et al., 2002) |
| <i>Pax8-rtTA; TetO-Cre^a</i> | ✓ | | | ✓ | riñón y hepatocitos | | | (Perets et al., 2013) |
| <i>CAG-Cre:ER^{Tb}</i> | ✓ | | N.E. | N.E. | pulmón, colon, riñón, tiroides e hígado | | | (Hayashi and McMahon, 2002) |
| <i>Amhr2-Cre</i> | | ✓ | ✓ | ✓ | | | | (Jamin et al., 2002) |
| <i>Adenovirus-Cre</i> | ✓ | ✓ ^c | | | | | | (Beauparlant et al., 2004) |
| <i>Wnt7a-Cre</i> | ✓ | | N.E. | N.E. | N.E. | | | (Huang et al., 2012) |

Tabla 8: Modelos de ratones transgénicos Cre usados para la mimetización del cáncer en el útero. AGF, Aparato genital femenino; TF, Trompas de Falopio; N.E., no examinado. ^a Bebiendo agua con doxiciclina, ^b Inyección intraperitoneal de Tamoxifeno, ^c Baja penetrancia. Modificado de (Maru and Hippo, 2021).

- **Ratón *Pgr-Cre*:**

El receptor de progesterona (*Pgr*) se expresa tanto en el útero y como el resto del aparato genital femenino. A pesar de su reducida especificidad tisular (Tabla 8), para estudiar el carcinoma endometrial, los ratones transgénicos *Pgr-Cre* que expresan la recombinasa bajo el control del promotor del gen *Pgr* (Soyal et al., 2005) han sido los más utilizados en la generación de RMGs. Además, la expresión de la *Pgr* se observa en todos los tipos principales de células del útero, incluidos el epitelio, el miometrio y el estroma, los genes floxeados se eliminan tanto en los componentes epiteliales como en los no epiteliales del útero en los ratones *Pgr-Cre*. Por tanto, las alteraciones genéticas en estos modelos no mimetizan lo ocurrido en los casos esporádicos de carcinoma endometrial en humanos donde, exclusivamente, las células epiteliales endometriales

sufren mutaciones. Haciendo uso de este modelo se han generado diversos modelos animales (Tabla 9). Así, los ratones *Pgr-Cre; Pten^{ff}*, donde se produce una ablación bialélica de *Pten*, desarrollan de manera habitual adenocarcinoma endometrial de tipo I e invasivo a los 3 meses de edad (*Daikoku et al., 2008*), lo que recapitula la importancia de la inactivación de *Pten* en la tumorigénesis en el tracto genital femenino. Por el contrario, a pesar de lo esperado, la delección condicional de *Trp53* (*p53*) endometrial (*Pgr-Cre; Trp53^{ff}*) no presentaba ningún fenotipo tumoral en el endometrio (*Daikoku et al., 2008*). En cambio, cuando esta ablación se combinaba con la delección de *Pten* (*Pgr-Cre; Pten^{ff}; Trp53^{ff}*) los ratones pasan a tener una menor esperanza de vida que los *knock-out* de solo *Pten* y un fenotipo algo más agresivo (*Daikoku et al., 2008*). Por otro lado, cuando este ratón se cruzó con un RMG que presentaba la mutación *Kras^{G12D}*, se contempló que esta alteración aceleraba el desarrollo del CE dependiente de la inactivación de *Pten*, subrayando el papel oncogénico de la *Kras* mutante en el endometrio (*Tae Hoon Kim et al., 2010b*). Posteriormente, debida a la importancia de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF β) en la patogénesis de los cánceres humanos, que juega un papeles multifacéticos, ya sea pro o antitumoral, dependiendo del órgano y del contexto genético (*Gordon and Blobel, 2008*), y en consonancia con la noción de la implicación de esta vía en tracto reproductivo femenino (*Nuria Eritja et al., 2017; Monsivais et al., 2017; Peng et al., 2015; Rodriguez et al., 2016*), se estudió mediante la *Pgr-Cre* el efecto de la pérdida condicional del gen *ALK5* (*Activin-like kinase 5*), también conocido como TGF β receptor 1 (*TGFBR1*); por un lado junto con la ablación de *Pten* (*Tgfbr1^{ff}; Pten^{ff}*), que desarrollaron CE metastásicos (*Y. Gao et al., 2017*). En otro trabajo independiente, posteriormente se demostró que no era necesaria la delección dual condicional, ya que incluso los ratones *Pgr-Cre; Tgfbr1^{ff}* desarrollaron CE con metástasis pulmonares (*Monsivais et al., 2019*). Además, ese mismo año en el mismo laboratorio, se vio que los ratones *Pgr-Cre; Smad2^{ff}; Smad3^{ff}* también desarrollan hiperplasia endometrial, que finalmente progresa a carcinoma endometriode con una letalidad completa a los 8 meses de edad (*Kriseman et al., 2019*). En base a estos resultados, es probable que la inactivación de la vía de señalización del TGF β desempeñe un papel pro-tumorígeno, al menos en la patogénesis de los CE de tipo I. También se han establecido algunos RMGs que recapitulan los CE de tipo II. La mutación de *Trp53* y la inactivación de *CDH1* son comunes en los CE de tipo II (*Samarnthai et al., 2010*). En consonancia con este hallazgo, los ratones *Pgr-Cre; Cdh1^{ff}; Trp53^{ff}* desarrollan CE de tipo II típicos a los 6 meses de edad, con características histológicas que incluyen el crecimiento papilar y la atipia nuclear severa (*Reardon et al., 2012; Stodden et al., 2015*). Además, en este modelo, la metástasis a órganos cercanos y distantes dentro de la cavidad peritoneal era evidente a los 12 meses de edad. Curiosamente, estos tumores se caracterizan por microambientes altamente inflamatorios con un prominente reclutamiento de células inmunes. Por otra parte, *DICER1* es un gen supresor tumoral

en el CE (M. H. Bailey et al., 2018), los ratones *Pgr-Cre; Dicer1^{ff}; Pten^{ff}* desarrollan un carcinoma de endometrio hormona independiente, poco diferenciado y que presenta marcadores de carcinoma de células claras, como la napsina A y el factor nuclear de hepatocitos 1 β (HNF1 β) (Wang et al., 2020).

- **Ratón *Sprr2f-Cre***

Sprr2f (Small Proline Rich Protein 2F) se expresa exclusivamente en el útero, particularmente en las células epiteliales del endometrio (Contreras et al., 2010) (Tabla 8). Esto, por lo tanto, hace del promotor de este gen un candidato idóneo para generar ratones transgénicos *Cre* para el desarrollo y estudio de CE. Con este fin, se generaron ratones transgénicos *Sprr2f-Cre* fusionando un fragmento de promotor *Sprr2f* de 5,8 kb con la recombinasa. A pesar de la expresión específica de *Sprr2f* al útero, la actividad de *Cre* en este ratón se observó no sólo en el endometrio, sino también en el riñón y el cerebelo (Contreras et al., 2010), como se demostró en este mismo trabajo al cruzar el modelo condicional con los ratones *KI* reportero ROSA26 (R26R) (Soriano, 1999). Esta expresión ectópica en los ratones *Sprr2f-Cre* se atribuyó a que el modelo presentaba una región corta del promotor y por ello carecía de las secuencias reguladoras necesarias para la represión de éste en tejidos no endometriales. Además, la recombinación génica en los epitelios uterinos adultos presentaba un patrón de mosaico. No obstante, los ratones *Sprr2f-Cre; Lkb1^{ff}* desarrollan CE invasivos que morían entorno a los 7 meses de edad (Contreras et al., 2010). La supresión simultánea del ligando de quimiocina 2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2, Ccl2), también conocido como quimioatrayente de monocitos 1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) atenúa significativamente la progresión tumoral impulsada por la pérdida de *Lkb1*, revelando la implicación de la inflamación en el desarrollo de CE (Peña et al., 2015). El desarrollo de CE de tipo II se ha asociado a la disfunción telomérica (Akbay et al., 2008). En relación a ello, la delección concurrente de *Trp53* y *Pot1a* (Protection of telomeres 1A), que forma parte de un complejo proteico que estabiliza los telómeros, en ratones *Sprr2f-Cre; Pot1a^{ff}; Trp53^{ff}* conduce al desarrollo de CE de tipo II a los 9 meses de edad (Akbay et al., 2013). Estos resultados remarcan la importancia de la estabilidad telomérica y mutaciones en *p53* en CE de tipo II.

- **Ratón BAC-*Sprr2f-Cre***

Para tratar de solucionar la regulación transcripcional no específica del endometrio del RMG *Sprr2f-Cre*, se introdujo una secuencia artificial del cromosoma bacteriano (BAC) del clon RP23-3914 antes de la secuencia promotora más corta utilizada en los ratones *Sprr2f-Cre*. El genoma de este clon bacteriano alberga un fragmento genómico de 189 kb compuesto por una secuencia en tándem de un clúster de genes próximos al gen *Sprr2* en el cromosoma 3, se postuló que era lo suficientemente largo como para recapitular con precisión todos los elementos reguladores transcripcionales endógenos del promotor. De hecho, los ratones transgénicos BAC-*Sprr2f-Cre* permitieron la recombinación de genes de forma altamente específica para el epitelio endometrial (Tabla 8). Así, con estos ratones condicionales se probó de generar un modelo de ablación del gen *FBXW7*, ya que en el carcinoma endometrial la incidencia de mutaciones en este gen es la más alta en comparación al resto de cánceres humanos, seguido del cáncer de colon (*Yeh et al., 2018*). Los ratones BAC-*Sprr2f-Cre; Pten^{fl/fl}; FBXW7^{fl/fl}* desarrollaron un carcinoma endometrioide, que finalmente progresó a CSE a las 40-67 semanas. Mediante un análisis genómico se observó que espontáneamente un gran número de tumores adquirieron la mutación *Trp53*, en línea con el papel crítico de la pérdida de p53 en el desarrollo del CS (*Cuevas et al., 2019*). Así, este RMG representa un modelo único que exhibe una transición de CE de tipo I a tipo II. Por otro lado, *Pole* codifica para una ADN polimerasa epsilon, mutada en el 7-12% de los CE, esencial para la replicación fiel del ADN, es por eso que las mutaciones en este gen, y más en concreto la mutación P286R, impulsan un fenotipo ultramutante (*Getz et al., 2013; Rayner et al., 2016*). En este contexto, los ratones BAC-*Sprr2f-Cre; Pole^{LSL-P286R/+}* desarrollaron CE con un 100% de penetrancia. Además, estos tumores presentaron unos patrones mutacionales similares a las de los CE humanos, aunque no presentaban variación en el número de copias génicas. Estos resultados son coherentes con los de los CE ultramutados de tipo POLE. Por otro lado, al generar un modelo con la mutación en *Pole* y con el gen *Msh2* floxeado (BAC-*Sprr2f-Cre; Pole^{LSL-P286R/+}; Msh2^{fl/fl}*), se consigue una mayor progresión tumoral (*Li et al., 2020*).

| Líneas transgénicas Cre | Genes diana | Penetrancia | Latencia (sem.) | Tipo de CE | Tipo histológico principal | Referencia |
|---|---|------------------------------|-----------------|------------|---|--|
| Sistémico | <i>Pten</i> ^{+/-} | 100% | 18-39 | - | HCA | (Podsypanina et al., 1999) |
| | <i>Pten</i> ^{+/-} | 21% | 30-66 | I | AC (pobremente diferenciado) | (Stambolic et al., 2000) |
| | <i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>Mlh1</i> ^{-/-} | 40% | 14-18 | I | AC (bien diferenciado) | (Wang et al., 2002) |
| | <i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>ER</i> ^{-/-} | 25% | 32 | I | AC | (Joshi et al., 2012) |
| | <i>Pten</i> ^{ff/ff} | 100% | 12 | I | AC (invasión miometrio) | (Daikoku et al., 2008) |
| | <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 0% | - | - | endometrio normal | |
| | <i>Pten</i> ^{ff/ff} ; <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 100% | 12 | I | AC (invasión miometrio) | |
| Pgr-Cre | <i>Pten</i> ^{ff/+} ; <i>Kras</i> ^{LSL-G12D/+} | 100% | 4 | I | AC (CEE) | (Tae Hoon Kim et al., 2010b) |
| | <i>Pten</i> ^{ff/ff} ; <i>Tgfbr1</i> ^{ff/ff} | 100% | 16 | I | AC (invasivo) | (Y. Gao et al., 2017) |
| | <i>Tgfbr1</i> ^{ff/ff} | N.D. | N.D. | I | AC (invasivo) | (Monsivais et al., 2019) |
| | <i>Smad2</i> ^{ff/ff} ; <i>Smad3</i> ^{ff/ff} | 100% | 34 | I | AC (CEE) | (Kriseman et al., 2019) |
| | <i>Cdh1</i> ^{ff/ff} ; <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 47% | 48 | II | AC | (Reardon et al., 2012; Stodden et al., 2015) |
| | <i>Pten</i> ^{ff/ff} ; <i>Dicer1</i> ^{ff/ff} | 100% | 12 | II | AC (pobremente diferenciado) | (Wang et al., 2020) |
| | Sprr2f-Cre | <i>Lkb1</i> ^{ff/ff} | 100% | 30 | I | AC |
| <i>Lkb1</i> ^{ff/ff} ; <i>Ccl2</i> ^{-/-} | | 100% | 43-58 | I | AC | (Peña et al., 2015) |
| <i>Trp53</i> ^{ff/ff} ; <i>Pot1a</i> ^{ff/ff} | | 100% | 60 | II | AC | (Akabay et al., 2013) |
| <i>Pten</i> ^{ff/ff} ; <i>Dicer1</i> ^{ff/ff} | | 100% | 12 | II | AC (pobremente diferenciado) | (Wang et al., 2020) |
| BAC-Sprr2f-Cre | <i>Pten</i> ^{ff/ff} ; <i>Fbxw7</i> ^{ff/ff} | 100% | 40-67 | II | CS | (Cuevas et al., 2019) |
| | <i>Pole</i> ^{LSL-P286R/+} ; <i>Msh2</i> ^{ff/ff} | 100% | 45 | I | AC (CEE) | (Li et al., 2020) |
| Ltf-iCre | <i>Pten</i> ^{ff/ff} | 100% | 12 | I | HCA | (Liang et al., 2018) |
| | <i>R26-PiK3ca</i> ^{H1047R} ; <i>Arid1a</i> ^{ff/+} | 100% | 20 | I | AC invasivo (de moderado a pobremente diferenciado) | (Wilson et al., 2019) |
| | <i>R26-PiK3ca</i> ^{H1047R} ; <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 100% | 11-14 | I | AC <i>in situ</i> (NIE) | (Reske et al., 2021) |
| | <i>Arid1a</i> ^{ff/ff} ; <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 100% | 14 | - | AC invasivo (metastásico) | (Reske et al., 2021) |
| Ksp1.3-Cre | <i>Trp53</i> ^{ff/ff} | 84% | 65-79 | II | AC (SC, CCC), CS, Car. Indif. | (Wild et al., 2012) |

Tabla 9: Modelos de ratones transgénicos utilizados hasta la fecha para el estudio del cáncer endometrial.

| Líneas transgénicas Cre | Genes diana | Penetrancia | Latencia (sem.) | Tipo de CE | Tipo histológico principal | Referencia |
|-------------------------------|---|-------------|-----------------|------------|---|-------------------------------|
| Pax8-rtTA;TetO-Cre | <i>Pten^{ff}; Arid1a^{ff}</i> | 100% | 6-12 | I | AC (CEE) | (Suryo Rahmanto et al., 2020) |
| | <i>Trp53^{ff}; Rb1^{ff}</i> | 81% | 57 | II | AC (SC) | (D. J. Fu et al., 2020) |
| CAG-Cre:ER^T | <i>Pten^{ff}</i> | 100% | 6-8 | I | AC <i>in situ</i> (NIE) | (Mirantes et al., 2013a) |
| | <i>Pten^{ff}; CycD1^{-/-}</i> | 100% | 9-12 | I | HCA, AC <i>in situ</i> (NIE) | (Dosil et al., 2017) |
| Amhr2-Cre | <i>Pten^{ff}; Kras^{LSL-G12V/+}</i> | 90% | 22-56 | - | Tumor estromal (leiomioma y leiomiosarcoma) | (Kun et al., 2020) |
| | <i>Pten^{ff}</i> | 41% | 16-32 | I | AC | (Joshi and Ellenson, 2011) |
| Adenovirus-Cre | <i>Pten^{ff}</i> | 88% | 2 | I | HCA, AC (CEE) | (Joshi and Ellenson, 2011) |
| | <i>Pten^{ff}; Lkb1^{ff}</i> | 100% | 8-28 | I | AC (CEE) | (Cheng et al., 2014) |
| | <i>Pten^{ff}; Kras^{LSL-G12D/+}</i> | 50% | 14 | I | AC (CEE) | (Tirodkar et al., 2014) |
| Wnt7a-Cre | <i>Mig-6^{ff}</i> | 100% | 20 | I | HCA, AC (CEE) | (Kim et al., 2017, 2013) |

Tabla 9 (continuación): Modelos de ratones transgénicos utilizados hasta la fecha para el estudio del cáncer endometrial. HCA, hiperplasia compleja con atipia; AC, adenocarcinoma; NIE, neoplasia intraepitelial endometrial; CCC, carcinoma de célula clara; CS, carcinosarcoma; CEE, carcinoma endometriode endometrial; SC, carcinoma seroso; Car. Indif., carcinoma indiferenciado; N.D., no disponible; sem., semanas. Modificado de Maru and Hippo, 2021.

- **Ratón *Ltf-iCre***

La lactoferrina o lactotransferrina (*Ltf*), una glicoproteína que se une al hierro, se expresa en gran medida en el epitelio uterino de los ratones adultos en respuesta a la exposición a los estrógenos (McMaster et al., 1992; Teng et al., 2002). Por ello, en el intento de generar un modelo de ratón *Cre* para la delección de genes específicamente en el endometrio, se generó un ratón transgénico con una *Cre* recombinasa mejorada (improved *Cre*, *iCre*) bajo el promotor de la *Ltf* (*Ltf-iCre*). Mediante el cruce con ratones reporteros de *LacZ*, se demostró que la expresión de *iCre* dirigida por *Ltf* mostraba una robusta actividad de *Cre* en los epitelios luminal y glandular uterinos a partir de la pubertad de las ratonas. Sin embargo, se observó una expresión ectópica en las glándulas mamarias y en los neutrófilos (Daikoku et al., 2014). *iCre* es un gen *Cre* alterado que mediante la modificación de su secuencia de codones (pero no la secuencia aminoacídica), se redujo el alto contenido de islas *CpG* de la secuencia codificadora, reduciendo así las posibilidades de silenciamiento epigenético en los mamíferos (Shimshek et al., 2002). Mientras que los ratones *Pgr-Cre*; *Pten^{ff}* desarrollan CE con alta penetración (Daikoku et al., 2008), los ratones *Ltf-iCre*; *Pten^{ff}*

desarrollan hiperplasia compleja atípica en el endometrio, pero raramente carcinoma (Liang et al., 2018). Estos resultados sugieren que la inactivación de *Pten* en el estroma uterino puede promover la transformación de las células epiteliales *Knock-out* de *Pten*, aunque no sean por si mismas tumorigénicas. Teniendo en cuenta que la inactivación de *Pten* en el estroma uterino se observa en la enfermedad de Cowden (Pilarski et al., 2013; Wirtzfeld et al., 2001), pero no es común en los casos esporádicos de CE humano, estos resultados sugieren que los ratones *Pgr-Cre; Pten^{ff}* y *Ltf-iCre; Pten^{ff}* pueden imitar los casos hereditarios y esporádicos de CE, respectivamente. Este mismo grupo probó de delecionar *PTEN* con la recombinasa bajo el promotor del gen *Wnt7a* (modelo explicado más adelante). Estos ratones *Wnt7a-Cre; Pten^{ff}* morían a los 10 días de edad. Por otro lado, otro grupo, sabiendo que las mutaciones en *ARID1A* suelen coincidir con mutaciones en genes implicados en la vía PI3K en los CE (Liang et al., 2012), generaron un modelo de RMG *Pgr-Cre; R26-Pik3ca^{H1047R}; Arid1a^{fl/+}* los cuales desarrollaron CE invasivo (Wilson et al., 2019), lo que sugiere que *ARID1A* es un supresor tumoral haploinsuficiente en el desarrollo de CE. Este mismo grupo, en otro estudio se demostró que la pérdida de expresión de *Trp53* junto con la mutación oncogénica de *Pik3ca* (*Pgr-Cre; R26-Pik3ca^{H1047R}; Trp53^{ff}*) en el epitelio endometrial daba lugar a características de hiperplasia endometrial, adenocarcinoma y carcinoma intraepitelial (Reske et al., 2021). En este mismo estudio, se quiso analizar la relación funcional entre las mutaciones de *Trp53* y *Arid1a* en el endometrio, a pesar de que, aun siendo ambas dos mutaciones muy comunes en CE, las alteraciones en estos dos genes son mutuamente excluyentes (Allo et al., 2014; Bosse et al., 2013; Guan et al., 2011). A pesar de ello, este ratón *Pgr-Cre; Arid1a^{ff}; Trp53^{ff}* desarrollo un carcinoma endometrial muy invasivo y metastásico (Reske et al., 2021).

- **Ratón *Ksp1.3-Cre***

Ksp-1.3 (también conocido como *Cdh16*) se expresa exclusivamente en el riñón adulto y en el tracto genitourinario en desarrollo de los ratones (Thomson et al., 1998, 1995). Es por esto que la actividad recombinasa del RMG que expresa la *Cre* bajo la regulación del promotor de este gen (*Ksp1.3-Cre*) muestra un patrón de mosaico en las células epiteliales del lumen y las glándulas del endometrio (Frew et al., 2008; Shao et al., 2002). En este contexto, los ratones *Ksp1.3-Cre; Trp53^{ff}* desarrollan CE de tipo II, entre los que se diferencian carcinomas serosos, carcinomas de células claras y carcinosarcomas, en el 84% de los casos a las 58-68 semanas de edad (Wild et al., 2012).

- **Ratón *Pax8-rtTA; TetO-Cre***

Pax8 es un factor de transcripción esencial para la regeneración del epitelio del útero y del FT, pero no del ovario (Mittag et al., 2007). El ratón *Pax8-rtTA; TetO-Cre* contiene un transactivador reverso regulado por tetraciclina (rtTA) bajo el control del promotor murino *Pax8*, además, expresan la recombinasa *Cre* de forma dependiente de la tetraciclina (*TetO-Cre*), permitiendo así la inducción de la actividad recombinasa en las células que expresan *Pax8* al administrar doxiciclina. Utilizando

este modelo de ratón, se investigaron los efectos de varias combinaciones de alelos condicionales de *Brca1/2*, *Trp53* y *Pten*. Mientras que estos ratones desarrollaron predominantemente un carcinoma seroso de alto grado a partir de células epiteliales secretoras de las trompas de Falopio, también se indujeron varios grados de lesiones endometriales en menor medida, asemejándose a la hiperplasia endometrial, la displasia y el carcinoma en humanos (Perets et al., 2013). Dado que las mutaciones en *ARID1A* y *PTEN* suelen coincidir en el carcinoma endometriode uterino, se generaron ratones *Pax8-rtTA; TetO-Cre; Pten^{fl/fl}; Arid1a^{fl/fl}*. Seis semanas después de la administración de doxiciclina, estos ratones desarrollaron tumores uterinos macroscópicos acompañados de diseminación local y peritoneal. Curiosamente, los tumores inducidos presentaban características histológicas de carcinoma endometriode y mostraban perfiles de expresión génica similares a los del carcinoma endometriode humano. La pérdida de cualquiera de los dos genes por sí sola no indujo ningún tumor macroscópico (Suryo Rahmanto et al., 2020), lo que puede ser indicativo de la cooperación entre las pérdidas de *ARID1A* y *PTEN* en el desarrollo de la progresión tumoral del CE. Por otro lado, se observó el desarrollo de CE con características histológicas de carcinoma seroso en el 81% de los ratones *Pax8-rtTA; TetO-Cre; Trp53^{fl/fl}; Rb1^{fl/fl}* (D. J. Fu et al., 2020). Este modelo de RMG, junto con el modelo CAG-Cre:ER^T y el de la inyección de adenovirus-*Cre* (ambos explicados más adelante) son, hasta el momento, los únicos modelos para el que permiten la inducción temporal y espacial de la delección genética.

- **Ratón CAG-Cre:ER^T**

La Cre inducible por tamoxifeno es una proteína de fusión entre la recombinasa Cre y una forma mutada del dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (*estrogen receptor*, ER). Esta mutación evita la unión de la proteína de fusión al ligando natural del ER, es decir, los estrógenos internos del ratón en condiciones fisiológicas normales, pero si permite la unión del tamoxifeno. En ausencia de este agente inductor, la Cre:ER^T es secretada al citosol por la Hsp90, de manera que se evita la recombinación nuclear. Por el contrario, la unión al tamoxifeno causa la disrupción de la interacción con Hsp90, permitiendo así la translocación de la Cre:ER^T al núcleo e inicie así la recombinación (Feil et al., 1996; Metzger et al., 1995). Por otro lado, el promotor CAG es una construcción híbrida del elemento potenciador del citomegalovirus (C) fusionado con el promotor del gen de la β -actina (A) de pollo y el aceptor de empalme del gen de la β -globina (G) de conejo. Por lo tanto, se supone que funciona como un promotor que impulsa altos niveles de transcripción en la mayoría de las células y tejidos. En este contexto, en el ratón transgénico CAG-Cre:ER^T (Hayashi and McMahon, 2002) (Figura 14), la inyección intraperitoneal (i.p.) de tamoxifeno conduce a la recombinación del gen principalmente en las células epiteliales de todo el cuerpo de una manera dependiente de la dosis.

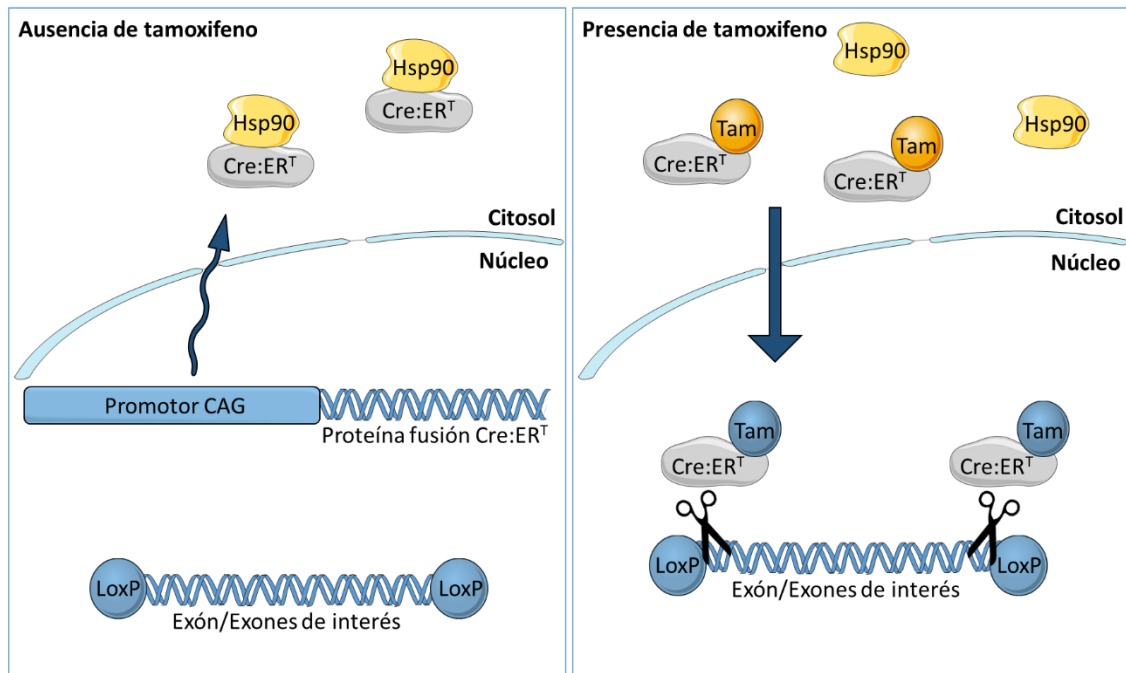


Figura 14: Esquema del funcionamiento del sistema *Cre-loxP* inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor CAG. La recombinasa CAG-Cre:ER^T se mantiene en el citosol hasta la estimulación con tamoxifeno (Tam). En este momento, la proteína puede translocarse al núcleo donde promueve la recombinación específica gracias al reconocimiento de secuencias *loxP* que flanquean la secuencia del gen de interés. Modificado de *McLellan et al., 2017*.

Tras la inyección i.p. de tamoxifeno, los ratones CAG-Cre:ER^{T+/-}; *Pten*^{fl/fl}, estos desarrollaron hiperplasia endometrial y adenocarcinoma *in situ*, mientras que también se observó hiperplasia tiroidea ectópica (*Mirantes et al., 2013a*) (Figura 15).

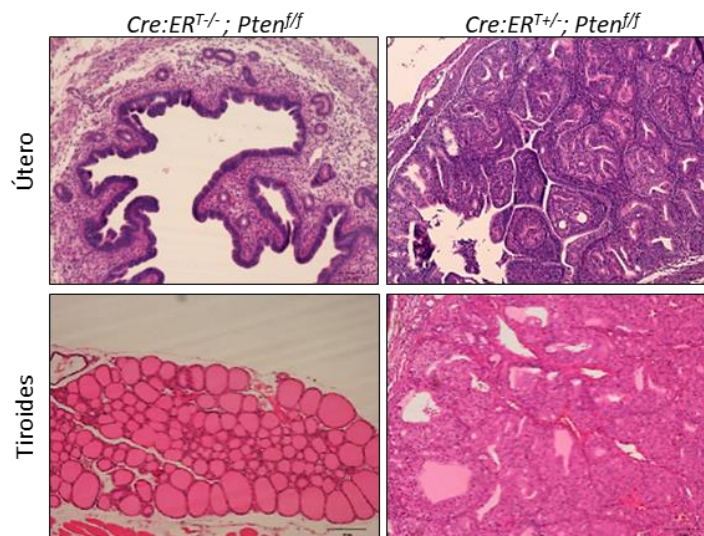


Figura 15: Los ratones CAG-Cre:ER^T; *Pten*^{fl/fl} desarrollan neoplasias intraepiteliales endometriales e hiperplásias de tiroides a las 6-8 semanas después de la administración de tamoxifeno. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina al endometrio (panel superior) y a la tiroides (panel inferior) de los ratones CAG-Cre:ER^{T-/-}; *Pten*^{fl/fl} y CAG-Cre:ER^{T+/-}; *Pten*^{fl/fl} tratados con tamoxifeno. Modificado de (*Dosil et al., 2017*).

No obstante, la inyección de tamoxifeno no solo inducía la recombinación en el endometrio y tiroides de los animales *CAG-Cre:ER^{T+/+}; Pten^{ff}*, sino que también se observa ablación génica en riñón, hígado, pulmón y colon (Figura 16). En cualquier caso, la pérdida de *Pten* en estos órganos no condujo al desarrollo de neoplasias ni alteraciones histológicas en los mismos. Estos resultados subrayan la mayor susceptibilidad del endometrio a la tumorigénesis dependiente de la pérdida de *Pten* en comparación con cualquier otro órgano. Curiosamente, la ausencia de *CycD1* condujo a una reducción de la incidencia y progresión de las lesiones endometriales. La mayoría de los cambios histológicos encontrados en el endometrio de los ratones *CAG-Cre:ER^T; Pten^{ff}; CycD1^{-/-}* se clasificaron como hiperplasias, y sólo el 17% de los ratones progresaron a neoplasia intraepitelial endometrial (NIE, *endometrial intraepithelial neoplasia, EIN*), mientras que la incidencia de NIE en los controles con *CycD1* no mutada fue de casi el 53% (Dosil et al., 2017).

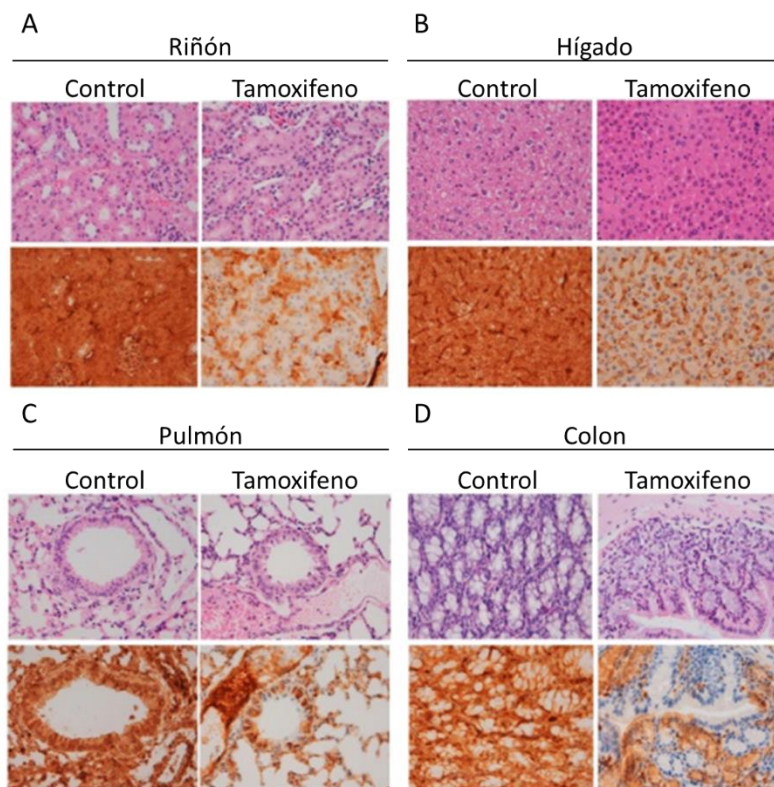


Figura 16: La pérdida de expresión de *Pten* no da lugar a alteraciones histológicas en otros tejidos epiteliales. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina y de inmunohistoquímica de PTEN al riñón (A), hígado (B), pulmón (C), y colon (D) de ratones *CAG-Cre:ER^{T+/+}; Pten^{ff}* tratados o no con tamoxifeno. Modificado de (Mirantes et al., 2013a).

- **Ratón *Amhr2-Cre***

Amhr2 (*anti-Müllerian hormone receptor type II*) se expresa en las células mesénquimales del conducto mülleriano y en el epitelio mesonéfrico adyacente (Arango et al., 2008). Los ratones *Amhr2-Cre* sufren recombinación génica en el útero, selectivamente en las células del estroma

uterino y en el miometrio, pero no en el epitelio (Daikoku et al., 2013; Jamin et al., 2002). Así, al usar este modelo de recombinación para delectar *Pten* (*Amhr2-Cre; Pten^{ff}*) los animales no desarrollaron carcinoma endometrial, en cambio, inducen sorprendentemente una diferenciación de un gran número de células del miometrio en adipocitos (Daikoku et al., 2011). Por otro lado, los ratones *Amhr2-Cre; Pten^{ff}; Kras^{LSL-G12V/+}* desarrollan tumores del estroma uterino, como por ejemplo leiomioma y el leiomiocarcinoma, pero no tumores epiteliales (Kun et al., 2020). Estos resultados apuntan a que los ratones *Amhr2-Cre* no son adecuados para el estudio de la tumorigénesis del epitelio uterino.

- **Ratón con inyección intrauterina de Adenovirus-Cre**

La inyección local de adenovirus que codifica para la *Cre* (*Adeno-Cre*) se ha adoptado como un enfoque alternativo para efectuar la inducción temporal y espacial de la delectación genética en el endometrio de ratones adultos (Beauparlant et al., 2004). En dos estudios diferentes, se vio que los ratones *Adeno-Cre; Pten^{ff}*, presentaron un fenotipo de carcinoma endometrial después de ser inoculados de manera intrauterina (i.u.) con el adenovirus, eso sí, con una penetrancia reducida en ambos casos (Joshi and Ellenson, 2011; Saito et al., 2011). Tras la inyección de *Adeno-Cre*, los ratones *Pten^{ff}; Kras^{LSL-G12D/+}* y los ratones *Pten^{ff}; Lkb1^{ff}* desarrollaron CE con una penetrancia del 50% (Tirodkar et al., 2014) y del 100% (Cheng et al., 2014), respectivamente. Aunque se ambas modificaciones genéticas activan la vía PI3K, estos resultados sugieren que la inactivación de *Lkb1* coopera más profundamente que la activación de *Kras*. Utilizando el modelo reportero de recombinación R26R, se comprobó que la recombinación génica por inyección i.u. de *Adeno-Cre* no es totalmente específica del epitelio, ya que también salta, aunque en un grado mucho más reducido, en el tejido mesenquimal, además la actividad *Cre* genera un patrón mosaico en las células epiteliales diana (Joshi and Ellenson, 2011).

- **Ratón *Wnt7a-Cre***

Wnt7a, un gen que codifica para efector de la vía Wnt/ β -catenin, cuya expresión se da de manera habitual en las células epiteliales del conducto de Müller así como en las células del epitelio luminal del endometrio, pero no en el epitelio glandular (Gatcliffe et al., 2008; Merritt et al., 2009; Miller and Sassoon, 1998). De esta forma, cruzando el ratón reportero R26R con un RMG que presentaba el promotor de este gen regulando la transcripción de la *Cre* (*Wnt7a-Cre; R26R*), se detectó actividad recombinante tanto en epitelio luminal del endometrial como en glandular. No obstante, no se observó tinción con β -galactosidasa ni en el estroma uterino ni en el miometrio (Huang et al., 2012). La expresión del marcaje reportero de la *Cre* en el epitelio glandular es entendible gracias a la idea de que éste deriva del luminal (Gray et al., 2001). Así, este modelo recombinante, se cruzó con un modelo condicional para la ablación del gen *Mig-6* (Jin et al., 2007). Este ratón *Wnt7a-Cre;*

Mig-6^{ff} desarrollo hiperplasias endometriales y adenocarcinoma endometrial estrógeno dependiente (Kim et al., 2017, 2013), lo que muestra la importante función de Mig-6 como supresor tumoral dependiente de estrógeno, esto en cierta manera explica el porqué de la incidencia del carcinoma de endometrio es mayor en las mujeres peri y postmenopáusicas (Saito et al., 2011). Este modelo de ratón *Wnt7a-Cre* se ha usado también, al cruzarlo con un ratón *Knock-out* para el gen de receptor de estrógeno α (*Wnt7a-Cre; Era^{ff}*), para el estudio del papel del estrógeno en la proliferación y las respuestas biológicas del epitelio endometrial (Winuthayanon et al., 2010).

XENÓGRAFOS DERIVADOS DE PACIENTES Y RATONES HUMANIZADOS

Aunque los modelos derivados de líneas celulares y los RMGs han propiciado importantes avances en la biología del cáncer y siguen siendo cruciales para la investigación oncológica (Shoemaker, 2006), a menudo, como se ha comentado anteriormente, no recapitulan aspectos clave de las neoplasias humanas y, por tanto, no predicen adecuadamente los efectos de los fármacos en la clínica. De hecho, la elevada tasa de fracaso de los compuestos preclínicos en los ensayos clínicos demuestra claramente las limitaciones de los modelos preclínicos existentes (Li et al., 2008; Shoemaker, 2006). Por lo tanto, apremia la necesidad de desarrollar modelos de ratones más realistas y clínicamente relevantes que representen de forma fiable el tumor del paciente según su perfil genético y molecular, su histopatología, el curso de la enfermedad y el perfil de progresión metastásica, y la respuesta a la terapia (Landgraf et al., 2018; Tentler et al., 2012). En este contexto, los modelos de xenógrafos derivados de pacientes (*patient-derived xenograft*, PDX) han surgido como una excelente alternativa para superar estas deficiencias (Cook et al., 2012; Tentler et al., 2012). Los PDX se establecen implantando un trozo de tumor recién aislado de un paciente directamente en ratones inmunodeprimidos (Kim et al., 2009). Las cepas de ratón más utilizadas son SCID (*Severe Combined Immune Deficient*), NOD/SCID (*Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immune Deficient*), NSG (*NOD/SCID/interleukin-2 receptor common γ -chain (IL2-R γ)-deficient*) y ratones atímicos *nude* (Morton and Houghton, 2007). Los trozos de tumor pueden implantarse de forma heterotópica u ortotópica (Kim et al., 2009). La tasa de éxito del injerto varía en función del tipo de tumor, la cepa de ratón utilizada y el método de implantación específico, dependiendo principalmente de las características del tumor (estadio, grado y agresividad). Múltiples estudios han demostrado que los modelos PDX mantienen la heterogeneidad histológica, molecular y funcional original presente en los tumores de los pacientes sobre diferentes tipos de cáncer (Bruna et al., 2016; Byrne et al., 2017; Hidalgo et al., 2014). Tras el injerto y durante el crecimiento exponencial, el tumor se recoge y se prepara para el trasplante en uno o varios animales para desarrollar una cohorte de ratones de PDX que podría utilizarse para la caracterización molecular, biobanco o como modelos preclínicos. Las expansiones en serie pueden tener lugar durante varios pasajes manteniendo la fidelidad genética del tumor (Scott et al., 2014; Tentler et al., 2012). Esto,

los convierte en un modelo excelente para la investigación traslacional del cáncer es que los PDX pueden capturar la complejidad del tumor humano original (con alta estabilidad molecular e histológica), pueden predecir la respuesta clínica en los pacientes (*Byrne et al., 2017; Hidalgo et al., 2014; Siolas and Hannon, 2013; Tentler et al., 2012*) y, por lo tanto, pueden utilizarse como modelos preclínicos para la validación de nuevos fármacos y terapias dirigidas (medicina personalizada) (*Bruna et al., 2016; Gao et al., 2015*). El uso de cultivos celulares a corto plazo derivados de PDX (*PDX-derived short-term cell cultures, PDC*) son útiles y constituyen un mejor modelo clínico en comparación con las líneas celulares convencionales (*Bruna et al., 2016*). En cuanto al uso de estos modelos para el estudio del CE, no fue hasta 2012 donde se describió por primera vez el uso de PDX ortotópicos usando tumores endometriales (*Cabrera et al., 2012*). Desde entonces, han sido varios los estudios donde se han establecido distintas estrategias para la implementación de xenógrafos derivados de pacientes con CE (*Depreeuw et al., 2015; Haldorsen et al., 2015; Unno et al., 2014*), las cuales han sido usadas para testar nuevas terapias en pacientes con tumores uterinos (*Depreeuw et al., 2015; Núria Eritja et al., 2017; Groeneweg et al., 2014b, 2014a; Winder et al., 2017; Y. Yu et al., 2017*). En los últimos años, muchos esfuerzos se han dirigido al desarrollo de ratones humanizados, en los que se restablece (parcialmente) un sistema inmunitario humano, con el fin de investigar la interacción del tumor con el microambiente y el papel del sistema inmunitario en el crecimiento del tumor y la respuesta al tratamiento (*Morton et al., 2016; Shultz et al., 2012*). Aunque estos sistemas humanizados aún no están disponibles para el CE, podrían ser interesantes para próximos tratamientos para el CE avanzado y recurrente mediante la utilización de inhibidores inmunitarios (*Arora et al., 2018*).

PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR (CPPs)

La membrana celular protege las células vivas del ambiente extracelular y controla la entrada de moléculas en las células (*El-Andaloussi et al., 2005*). El interior hidrófobo de la bicapa lipídica permite la difusión pasiva sólo a moléculas que encajan en un rango de tamaño particular, carga y polaridad tales como iones, azúcares no cargados y aminoácidos (aa).

Las moléculas más grandes tales como las proteínas sólo pueden atravesar la membrana a través de un proceso llamado endocitosis que implica el uso de receptores específicos de la superficie celular (*El-Andaloussi et al., 2005*). La naturaleza impenetrable de la membrana celular limita el valor de muchas moléculas bioactivas, tales como fármacos, anticuerpos, péptidos y ácidos nucleicos dirigidos contra moléculas intracelulares.

Estos compuestos fuertemente polares, hidrófilos y poco solubles requieren ayudantes de transporte. Los compuestos hidrófilos tales como las proteínas y los ácidos nucleicos pueden internalizarse ya sea, a través de poros activados eléctricamente en la membrana (electroporación), o rodeados por partículas lipídicas o partículas virales, o bien formando conjugados, proteínas de fusión o complejos no covalentes con péptidos de penetración celular.

En las últimas tres décadas se han descubierto muchas secuencias peptídicas cortas que han sido descubiertas como capaces de traspasar la membrana celular de una manera independiente del receptor (*Bechara and Sagan, 2013*). Estos péptidos de 5 a 30 aminoácidos denominan comúnmente péptidos de penetración celular (del inglés *cell-penetrating peptides*, CPP), dominios de transducción de proteínas (del inglés *peptide transduction domains*, PTDs), secuencias de translocación de membrana (del inglés *membrane translocation sequence*, MTSS) o péptidos troyanos (Tabla 10) (*Zorko and Langel, 2005*). Estos péptidos, son capaces de atravesar la membrana celular conjugados a moléculas con carga e introducirlos en los distintos compartimentos intracelulares de las células, sin causar un daño significativo a la membrana plasmática (*Sawant and Torchilin, 2010*). Pueden ser utilizados para mediar la internalización de una amplia variedad de cargas conjugadas covalentemente y no covalentemente tales como biomoléculas poliméricas (ácidos nucleicos como ADN (*Karro et al., 2015*), ARN (*Ramakrishna et al., 2014*), oligonucleótidos (*Astriab-Fisher et al., 2002; Crombez et al., 2009; Zatsepin et al., 2005*) o plásmidos (*Segovia et al., 2014*)), liposomas (*Liu et al., 2015*), fármacos (*Jiang, 2021; Patel et al., 2007*) o nanopartículas (*Li et al., 2014; Longoria-García et al., 2022*), e incluso proteínas completas en células vivas (*Ramakrishna et al., 2014; Wadia and Dowdy, 2005*). La incorporación celular de los CPP puede producirse a través de mecanismos dependientes o independientes de la energía (*Zorko and Langel, 2005*). Debido a su baja citotoxicidad e inmunogenicidad, los CPP se han aplicado en ensayos *in vitro* (*Jo et al., 2014*) e *in vivo* (*Khafagy et al., 2009*) con buenos resultados.

Las características anteriores hacen de los CPP un método no viral atractivo para suministrar moléculas biológicamente activas a las células.

| Péptido de penetración celular | Secuencia de aminoácidos | Origen | Ref. |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| Derivados de proteínas | | | |
| TAT | GRKKRRQRRRPPQ | HIV-1 Tat | (Vivès et al., 1997) |
| penetratin | RQIKIWFQNRRMKWKK | Drosophila antennapedia | (Derossi et al., 1994) |
| pVEC | LLIILRRRIRKQAHASK | VE-cadherina | (Elmqvist and Langel, 2003) |
| VP22 | NAKTRRHERRRKLAIER | Virus del herpes simple | (Elliott and O'Hare, 1997) |
| Xentry | LCLRPGV | Proteína X de hepatitis B | (Montrose et al., 2014, 2013) |
| Quiméricos | | | |
| MGP | GALFLGFLGAAGSTMGA | HIV gp41 y NLS del antígeno T de SV40 | (Morris et al., 1997) |
| Transportan | GWTLNSAGYLLGKINLKAL AALAKKIL | Galanina y mastoparan | (Langel, 2021; Pooga et al., 1998) |
| YTA2 | YTAIAWVKAFIRKLRK | Substrato MMP | (Lindgren et al., 2006) |
| YTA4 | IAWVKAFIRKLRKGPLG | Substrato MMP | (Lindgren et al., 2006) |
| Sintéticos | | | |
| Poliarginina | R(n) | Basado en Tatp | (Futaki et al., 2001; Schmidt et al., 2010) |
| MAP | KLALKLALKALKAAALKLA | Modelo de péptido anfipático | (Oehlke et al., 1998) |

Tabla 10. Ejemplos de algunos de los péptidos de penetración celular encontrados en la literatura

Debido a que en la mayoría de los casos estos péptidos tienen una baja citotoxicidad y también son capaces de transportar fármacos no permeables en células vivas (es decir, células cancerosas, células nerviosas y tejido inflamado), es por esto que dichos péptidos son candidatos extremadamente atractivos y de interés presente y futuro en sectores tales como el farmacéutico (Duan et al., 2017; T. K. Fu et al., 2020; Gayraud et al., 2021; Jiang, 2021; Longoria-García et al., 2022; Zhang et al., 2016), investigación (Chung et al., 2012; Guo et al., 2021; Kiisholts et al., 2021; Poppleton et al., 2004; Zhou et al., 2021), diagnóstico y terapia génica (M. Gao et al., 2017; Habault and Poyet, 2019; Peng et al., 2017), entre otros (solo están citados algunos de los cientos de artículos que se publican cada año). En la actualidad, en cuanto a su uso como método de administración de medicamentos, se han obtenido resultados prometedores principalmente para su aplicación tópica, mientras que se dispone de poca información sobre los efectos de la administración intravenosa. Sin embargo, las predicciones no son favorables debido a la falta de selectividad de la acción de los péptidos, que puede conducir a la penetración de los componentes a través de la membrana celular del tejido no deseado (Skotland et al., 2015).

Junto con la electroporación, la magnetofección, la lipofección o la aplicación de nanopartículas y vectores virales, los CPP han asumido un papel cada vez más importante en el transporte de compuestos muy diferentes en células vivas. En los últimos años, su aplicación se ha centrado principalmente en la dirección de aplicaciones terapéuticas. Además de la internalización y el transporte de carga en las células vivas, los CPP también pueden transportar compuestos a través de la piel (Skotland et al., 2015), la barrera hematoencefálica (Stalmans et al., 2015) (Stalmans et al., 2015) y a través de la conjuntiva de los ojos (C. Liu et al., 2014). Los CPP marcados pueden detectar tejidos enfermos incluyendo tumores y sus metástasis (Regberg et al., 2012; Savariar et al., 2013). Además, pueden transportar fármacos a los tejidos enfermos. Los péptidos de diseño pueden llevar los fármacos selectivamente al tejido u órgano diana. Hoy en día hay numerosos péptidos específicos, conjugados y proteínas de fusión en ensayos clínicos. Ya existen aproximadamente 6000 publicaciones, que incluyen más de 800 revisiones. Dado que el primer CPP fue descubierto hace poco más de 30 años, es de esperar que se amplíen aún más las investigaciones que implican su uso en la investigación preclínica y en la terapia clínica.

CLASIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES DE CÉLULAS

El péptido Tat o TAT (Tatp o TATp) obtenido del VIH fue el primer CPP que se descubrió (Frankel and Pabo, 1988). La proteína TAT tiene una longitud de 86-101 aminoácidos y es esencial para la replicación viral (Johri et al., 2011). Frankel and Pabo, 1988 revelaron que la proteína Tat purificada es absorbida por células en cultivo y es capaz de transactivar el promotor de HIV. El cribado de la secuencia de aminoácidos de la proteína TAT reveló que una secuencia de sólo los nueve

aminoácidos que abarcan las posiciones 48 a 60 es suficiente para la permeabilidad celular (*Vivès et al., 1997*).

A su vez, la proteína Antennapedia (Antp) procedente de *Drosophila* es una homeoproteína, esta actúa sobre todo como factor de transcripción de genes reguladores que codifican para proteínas nucleares (*Gehring et al., 1994*). Se realizaron estudios con un péptido de 60aa correspondiente al homeodominio de antennapedia en los cuales se reveló que el péptido era capaz de penetrar células (*Joliot et al., 1991*). Se seleccionó el homeodominio de 60 aa. para determinar la secuencia responsable de la permeabilidad celular. Los resultados mostraron que un péptido de 16aa de largo que abarca los residuos 43-58, que corresponde a la tercera hélice del homeodominio, fue suficiente para translocar la membrana celular (*Derossi et al., 1994*). Este péptido penetrante de células se denomina a menudo penetratina.

Desde el descubrimiento del Tatp y la penetratina, más de un centenar de CPP han sido descubiertos o creados (*Lindgren and Langel, 2011; Rádis-Baptista, 2021*). Difieren en tamaño y secuencia primaria, pero a menudo muestran similitudes en la identidad de secuencia, composición o estructura. Uno de los mayores grupos de CPP es rico en los residuos básicos de arginina y lisina (*Sawant and Torchilin, 2010*). Esta diversidad en la estructura de los péptidos y sus secuencias dicta el mecanismo de captación y la eficiencia de la captación (*Milletti, 2012*). Varios CPP que se han desarrollado no se derivan de una proteína madre natural. El sistema de clasificación más ampliamente reconocido para los CPP se basa en este concepto, el de secuencia de origen (*Lindgren and Langel, 2011*). Este, clasifica CPPs en tres subgrupos, los derivados de proteínas naturales, los péptidos quiméricos y péptidos de diseño o sintéticos. Los CPP quiméricos contienen una combinación de secuencias que se derivan en parte de proteínas naturales, mientras que los CPP sintéticos tienen una secuencia novedosa especialmente diseñada para un suministro intracelular eficiente (*Lindgren and Langel, 2011*).

El sistema de clasificación basado en el origen no tiene en cuenta las características específicas de los CPP, por lo que se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación basado en las propiedades físico-químicas de los CPP. Los tres tipos de clasificación físico-química se basan en si los péptidos son catiónicos, anfipáticos o hidrófobos (*Milletti, 2012*). La mayoría (~ 44%) de los CPP descubiertos hasta la fecha pertenecen a la categoría anfipática, mientras que sólo el 15% de los CPP son hidrofóbicos (*Milletti, 2012*). Entre los péptidos catiónicos se incluyen a los CPPs Tat y penetratin, que tienen una carga neta positiva. La poliarginina, que se ideó a partir de la secuencia de Tat, es un polímero de residuos de arginina cargados positivamente. Al menos ocho residuos de arginina son necesarios para la captación celular eficiente (*Milletti, 2012*).

MECANISMO DE ENTRADA A LAS CÉLULAS DE LOS CPP

A pesar de los numerosos años de investigación, los mecanismos detallados de la internalización de los CPP aún no se han dilucidado por completo (*Milletti, 2012*). Según diversos modelos mecanísticos, parece que son varios los factores que influyen en la captación: i) el tipo de célula, ii) la masa y la estructura de la carga, iii) el método de unión, iv) la concentración de CPP y v) el tiempo y la temperatura de incubación. La diversidad de la estructura de las proteínas que penetran en la célula también da lugar a diferencias en la forma en que se toma la CPP y en su eficacia (*Guo et al., 2016*). La mayoría de los CPP son capaces de entrar en las células usando más de un camino, dependiendo de las condiciones de cultivo (*Madani et al., 2011*). Los tres pasos fundamentales para que los CPP atraviesen las células son la unión a los componentes de la membrana plasmática, entrada activa o pasiva a través de la membrana y la posterior liberación en el citoplasma o núcleo de la célula (*Ma et al., 2011*).

Hasta ahora se creía que eran dos las vías principales utilizadas por los CPP para entrar en la célula, la penetración directa y la endocitosis (Figura 17). Actualmente, la mayoría de investigadores piensan que la endocitosis es el mecanismo común usado para la entrada de CPPs conjugados a una carga, pero la entrada a través de la penetración directa se ha observado para los péptidos no conjugados tales como Tatp y penetratina (*Berlose et al., 1996; Ter-Avetisyan et al., 2009*). Con todo ello, existen varios grupos de investigadores que defienden que algunos péptidos de penetración celular entran por vía directa (*Madani et al., 2011; Trabulo et al., 2010*). La controversia en cuanto al mecanismo de penetración que hace que estos péptidos puedan traspasar con ellos diversas cargas esta hoy en día todavía presente.

La endocitosis puede producirse según dos mecanismos. El primer mecanismo es el dependiente de la clatrina, que implica el recubrimiento de las moléculas transportadas por la clatrina polimerizada. El segundo mecanismo, conocido como mecanismo independiente de la clatrina, no requiere la presencia de clatrina y procede a través de la macropinocitosis o a través de las caveolinas (*Mäger et al., 2012*).

La translocación directa, como método de transporte independiente de la energía, es el tercero de los modelos propuestos. Su validez fue confirmada en condiciones que impedían la endocitosis, por ejemplo, utilizando inhibidores de la endocitosis (*Dutta and Donaldson, 2012*) y baja temperatura (*Tomoda et al., 1989*). A pesar de estos factores, se ha observado una internalización efectiva de la CPP (*Bode et al., 2012*). El proceso comienza con la interacción de los residuos de aminoácidos cargados positivamente de la proteína penetrante desplegada con los fosfolípidos de la membrana, lo que interfiere con las interacciones estándar entre los componentes de la membrana celular y

permite la penetración de la célula. A continuación, la proteína se pliega de nuevo por la acción de las chaperonas (Cleal et al., 2013). También se han propuesto otros tres mecanismos alternativos de translocación directa a través de la bicapa lipídica: i) micelas invertidas (Derossi et al., 1998, 1996), ii) modelo de alfombra/debilidad de la membrana (Matsuzaki et al., 1999) y iii) formación de poros (Deshayes et al., 2004).

Hasta ahora, no se ha determinado cuál de estos modelos representa los verdaderos procesos de captación de CPP. También es probable que las condiciones del entorno celular afecten a la forma en que las CPP internalizan la célula. Es posible que se produzcan varios modos de internalización al mismo tiempo (Guo et al., 2016).

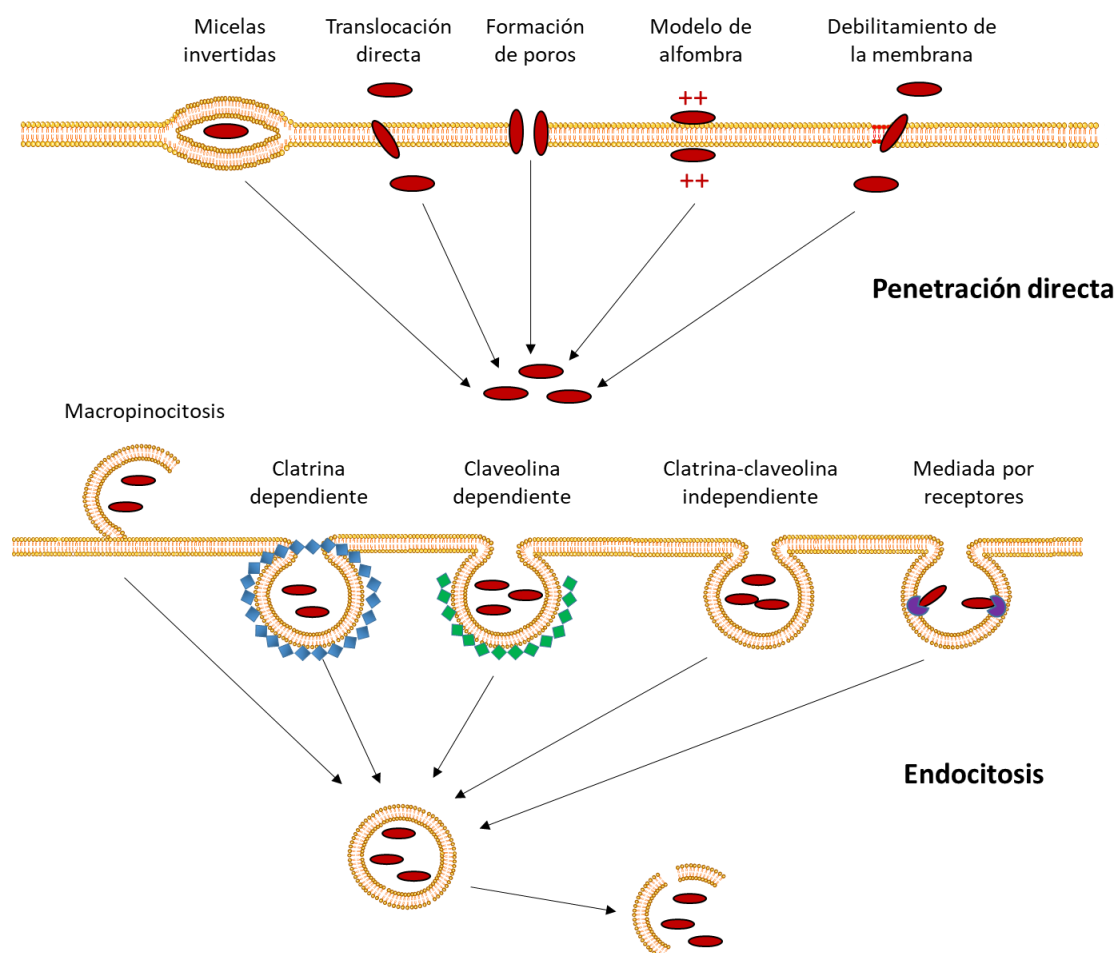


Figura 17: Resumen esquemático de los principales mecanismos de translocación en la membrana e internalización celular de los CPP. Se distinguen dos mecanismos principales aceptados de captación celular de péptidos: la translocación directa (vía no endocítica) y la internalización basada en la endocitosis. En cada caso, un péptido determinado puede utilizar distintas vías de entrada en la célula, como una micela invertida, translocación directa, formación de poros, tipo alfombra y adelgazamiento de la membrana (vía no endocítica, panel superior); macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina y caveolina, endocitosis independiente de clatrina y caveolina y endocitosis mediada por receptor (por ejemplo, el receptor syndecan-4) (vía basada en la endocitosis, panel inferior). CPP (elipses rojas), clatrina (cuadrados azules), claveolinas (cuadrados verdes), receptores (símbolo de color morado). Modificado de *Gagat et al., 2017*.

APLICACIONES DE LOS CPP

Los CPP se utilizan ampliamente en los estudios sobre métodos de transporte de partículas terapéuticas a través de la membrana celular. Como ya se ha comentado anteriormente, numerosos estudios han confirmado su potencial *in vitro* e *in vivo* (Regberg et al., 2013; Skotland et al., 2015). Tras numerosos estudios preclínicos realizados con éxito, algunas CPP, entre ellas la TAT y sus conjugados, han entrado en ensayos clínicos de fase I, fase II o incluso fase III. Los datos obtenidos en estos estudios demostraron que el uso de los CPPs para la terapia clínica es posible, ya que son bien tolerados y se dirigen a objetivos intracelulares. Hasta ahora, se han utilizado péptidos penetrantes en ensayos clínicos, incluidos los relativos al tratamiento oncológico (Vale et al., 2020), y de otras enfermedades como por ejemplo patologías cardiovasculares (NCT00451256), el dolor (NCT00451256 ; NCT01015235 ; NCT01135108 ; NCT02235272), la pérdida de audición (NCT00802425) e incluso las arrugas faciales (NCT00802425).

CPP EN EDICIÓN GENÓMICA

Además de la regulación positiva o negativa de los productos génicos mediante el transporte de ácidos nucleicos (Bivalkar-Mehla et al., 2017; Crombez et al., 2009; Crowet et al., 2013; Davidson et al., 2004; Kadkhodayan et al., 2017; Kato et al., 2016; Moschos et al., 2007; Muratovska and Eccles, 2004; Nakase et al., 2013; Rudolph et al., 2003; Wierzbicki et al., 2014), los CPPs pueden utilizarse para la edición del genoma. La recombinasa Cre, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN) y las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR)/Cas9 son actualmente las herramientas más extendidas para la ingeniería del genoma. Los CPP pueden utilizarse para introducir todas ellas en las células (Rádis-Baptista et al., 2017).

Como se ha explicado en el apartado de modelos animales, el sistema Cre/locus de X(cross)-over en P1 (*loxP*) es una herramienta prometedora para editar secuencias específicas de ADN. Esta herramienta es atractiva, ya que la inserción de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor inducible puede permitir la excreción en un sitio específico de un gen concreto. Sin embargo, el problema de este método es la selección de un sistema de entrega de Cre/LoxP apropiado (Nagy, 2000). El primer intento exitoso de introducir la recombinasa Cre en la célula utilizando péptidos penetrantes fue realizado en 2001 por Jo et al (Jo et al., 2001). En este estudio utilizaron y probaron 4 proteínas de fusión recombinantes purificadas que llevaban la secuencia de translocación de membrana (*membrane translocation sequence*, MTS) de 12 aminoácidos del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi unida a la proteína Cre enzimáticamente activa directamente en células madre embrionarias murinas NIH3T3 y S4R con un único gen receptor de sulfonilurea flanqueado por secuencias *loxP*. De las cuatro proteínas recombinantes investigadas glutatión-S-transferasa (GST)-Cre-MTS, GST-símbolo de localización nuclear (NLS)-Cre-MTS, proteína de unión a maltosa-NLS-

Cre-MTS e His6-NLS-Cre-MTS), el mejor resultado se obtuvo utilizando His6-NLS-Cre-MTS. La recombinación se indujo en el 82% de las células. En el mismo estudio, se probó la actividad *in vivo* de His6-NLS-Cre-MTS en ratones ROSA26R, que como se ha explicado en apartados anteriores, es un modelo que presenta el gen reportero de β -galactosidasa mediante recombinación mediada por Cre. Se demostró que la recombinación inducida por His6-NLS-Cre-MTS se produjo en el ~50% de los esplenocitos cultivados en ausencia de lipopolisacárido. Además, en ratones inyectados con His6-NLS-Cre-MTS una vez al día durante tres días, se observó la recombinación mediada por Cre no presentaba ningún efecto secundario en todos los tejidos examinados, incluyendo el cerebro, el corazón, el riñón, el pulmón, el bazo y el hígado (Jo *et al.*, 2001). En otro estudio, también se utilizaron células T reporteras para determinar el mecanismo de internalización de TAT-Cre (Sgolastra *et al.*, 2018). A pesar de la fuerte unión de la TAT a la superficie celular, que indica un mecanismo de penetración directa, se reveló que la proteína entra en la célula a través de múltiples mecanismos. Wadia *et al.*, 2004 sugirieron que la entrada celular mediada por la CPP de la TAT se produce por la interacción con las balsas lipídicas de una manera independiente del receptor y la subsiguiente internalización rápida por macropinocitosis, seguida de una caída del pH y la desintegración de la bicapa lipídica del macropinosoma, lo que resulta en la liberación de la carga de la TAT en el citosol. Además, Hashimoto *et al.*, 2008 informaron de que la recombinación de dianas genómicas mediada por Cre tiene lugar principalmente durante la fase S del ciclo celular. Esto se debe probablemente a la relajación de la estructura de la cromatina durante la fase S, que mejora la adhesión de Cre a la molécula de ADN y aumenta la reacción de recombinación Cre/LoxP. Xu *et al.*, 2008 han confirmado la seguridad de la recombinasa Cre en combinación con TAT, ya que no se produjeron cambios significativos en la proliferación celular ni en el cariotipo de los fibroblastos de cabra transgénicos tras la incubación con TAT-Cre. Además, la TAT-Cre no alteró la competencia de desarrollo de los embriones reconstruidos por transferencia nuclear a partir de células transducidas con TAT-Cre. Además, obtuvieron dos cabras transgénicas vivas sin anomalías evidentes en el desarrollo o el comportamiento durante al menos 3 meses después del nacimiento.

Los conjugados CPP y Cre se han aplicado con éxito en numerosas líneas celulares, como HeLa, Rp250 y HEK-283 (De Coupade *et al.*, 2005), y también en cultivos organotípicos derivados de ratones adultos y embriones portadores de un gen reportero flanqueado por secuencias *loxP* (Gitton *et al.*, 2009). También existen estudios *in vivo* que demuestran su utilidad. Sonsteng *et al.*, 2014 demostraron que la Cre fusionada con la TAT entra en los hepatocitos de los ratones tras la inyección en la vena de la cola. Para ello, se utilizaron dos tipos de ratones. El primero fue ROSA^{mT/mG}, cuyas células presentan fluorescencia roja en la membrana en ausencia de Cre o una fuerte expresión de EGFP en la membrana en presencia de Cre. La segunda fue ROSA^{nT-nG}, que

difiere de ROSA^{MT-mG} en la localización nuclear de la EGFP en ausencia o presencia de Cre, respectivamente. Demostraron que, tras la administración de TAT-Cre, se convertían entre el 5 y el 20% de los hepatocitos, lo que proporcionaba una conversión más eficaz de los hepatocitos centrolobulares que en los ratones inoculados hidrodinámicamente con el plásmido *pMC1-Cre*. La recombinación sólo se produjo en los hepatocitos, y no se observó en las células endoteliales ni en células que no fueran hepatocitos en el hígado ni en ningún otro órgano. Sin embargo, en los animales inoculados con TAT-Cre se identificaron células que mostraban fluorescencia verde cerca del punto de inyección en la cola (Sonsteng *et al.*, 2014). Además, esto solo son algunos de los ejemplos en los que a lo largo de los años la TAT-Cre se ha usado en investigación, porque entre otras cosas también se ha utilizado para la delección específica en el trofoblasto de la placenta (Ozguldez *et al.*, 2020), generación de modelos de cerdo transgénico (Kang *et al.*, 2018), entre otras muchas cosas.

Aunque en las nucleasas dirigidas al sitio, como las ZFN, la entrega de los componentes en las células no es un problema significativo, ya que se ha demostrado que las ZFN purificadas tienen la capacidad de ser internalizadas por las células de forma independiente (Gaj *et al.*, 2012); sin embargo, el uso de CPP mejora la eficiencia de captación (Chen *et al.*, 2013). Hasta ahora, los conjugados CPP-ZFN se han aplicado en enfoques para tratar el cáncer de mama (Puria *et al.*, 2012) y la malaria (Nain *et al.*, 2010), o generación de plantas transgénicas (Bilichak *et al.*, 2020).

La introducción de TALEN en las células es algo más difícil debido a razones como su peso molecular. Las TALEN no contienen el dominio Cys2-His2 de dedos de zinc, que permite la penetración directa de las ZFN en la membrana celular (J. Liu *et al.*, 2014). Para este propósito, las CPP ya han sido adaptadas con resultados satisfactorios en estudios *in vitro* y son una alternativa prometedora a los métodos actuales para la entrega de TALENs en células de mamíferos.

Por último, en cuanto al sistema CRISPR, la entrega eficiente de los dos tipos de componentes necesarios para la edición de genes puede ser utilizando sistemas virales lentivirales y adeno-asociados, que tienen el potencial de integración aleatoria de la secuencia del vector en el genoma del huésped, dando lugar a cambios no deseados (Park *et al.*, 2016; Suresh *et al.*, 2017). Por este motivo, se ha desarrollado un enfoque sin virus ni plásmidos. La Cas9 y el *sgRNA* se han administrado por separado la proteína Cas9 conjugada con un CPP y un complejo CPP-*sgRNA*. Este enfoque condujo a un menor grado de mutaciones *off-target* y de respuestas inmunes en el huésped, y también indujo una menor citotoxicidad (Suresh *et al.*, 2017). Para este objetivo, se empleó un plásmido que codifica para la proteína Cas9 mutada que presenta una cisteína en posición N-terminal que le permite unirse a 4-maleimidobutiril-4G9R4L (m9R) a través de un enlace tioéter, mientras que el complejo poliarginina-*sgRNA* (*sgRNA*-R9) se formó mediante la incubación

de los componentes a temperatura ambiente durante 30min (*Ramakrishna et al., 2014*). Además, la introducción del *sgRNA* como un complejo con CPP puede permitir potencialmente la introducción simultánea de varios ARN guías y, por tanto, la edición múltiple del genoma. También se han implementado el uso de los CPP para introducir plásmidos codificantes de los dos componentes CRISPR (*Falato et al., 2022*).

EL SISTEMA CRISPR/CAS9 COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER

LA INGENIERÍA GENÉTICA APLICADA A LA MODELIZACIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

El avance en relación al estudio de la biología molecular se está dando cada vez más rápido y, concretamente, se ha ido profundizando en los campos de la genómica y la genética. En este contexto, en los setenta, con la aparición de la tecnología del ADN recombinante se inició una nueva era en la biología (*Jackson et al., 1972*), ya que fue entonces cuando nació la ingeniería genética como tal, y, con ella, se impulsó el desarrollo de la biotecnología moderna. Desde entonces, los científicos se han visto capacitados para manipular el material genético pudiendo así, realizar el estudio tanto a nivel de estructura, organización y función, como de regulación, expresión y evolución de los genes. Es así como a día de hoy, somos capaces de realizar mutaciones en los genes de una forma dirigida y obtener el cambio deseado en una determinada secuencia, que implique, a su vez, el cambio fenotípico específico requerido por el investigador.

Una vez conocido el mundo de la ingeniería genética, entendiendo ésta como la aplicación de las tecnologías del DNA recombinante a problemas biológicos, médicos o agrícolas específicos, aparecen nuevas herramientas y técnicas significativamente más eficaces y económicas, cuya finalidad es poder manipular el material genético de cualquier célula. Estas técnicas de edición genómica se basan, en su mayoría, en enzimas nucleasas programables como meganucleasas (*Stoddard, 2011*), nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), nucleasas efectoras tipo activación de la transcripción (TALENs) (*Scharenberg et al., 2013; Urnov et al., 2010*) y en las agrupaciones de repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) asociadas a la nucleasa Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) (CRISPR/Cas9) (*Hsu et al., 2014*).

CRISPR/CAS9, EL ORIGEN

Fue en el año 1987 cuando por primera vez se describió sin saber para que servían, la existencia de un grupo de secuencias repetidas de 29 nucleótidos, separadas por 32 nucleótidos, dentro de un fragmento de DNA que codifica para el gen *iap* procedente de una cepa del microorganismo *Escherichia coli* (*Ishino et al., 1987*). Más tarde, otros grupos de investigación también confirmaron

la presencia de estas repeticiones en diversos microorganismos, como en otras cepas de *E. coli*, en *Shigella dysenteriae* y *Salmonella* entérica (Nakata et al., 1989), en diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, en las arqueas *Haloferax volcanii* y *Haloferax mediterranei* y en las mitocondrias (Mojica et al., 2000, 1993).

Gracias al desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación, a finales de los años 90, se fue descubriendo la presencia generalizada de dichas secuencias, ya denominadas con el nombre de secuencias interespaciadas repetidas en tándem o LTRR (*long tandemly repeated repetitive*) tanto en bacterias como arqueas (Mojica et al., 2000). Además de esto, en 2002, se acuñó el término “secuencia líder” para designar la secuencia conservada parcialmente localizada en el extremo 5’ de las repeticiones cortas interespaciadas (Jansen et al., 2002) (Figura 18).

En ese mismo año, tras un consenso entre diversos grupos, se decidió nombrar con el acrónimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) a estas secuencias repetidas interespaciadas.

A pesar de dicho progreso, todavía no se conocía nada ni de su función ni de la totalidad de sus componentes. También en el año 2002, se demostró que del locus de CRISPR se transcribían en la misma dirección múltiples RNAs, por lo que se concluyó que se transcribía todo el locus en forma de RNA precursor, el cual fue denominado pre-crRNA y, a continuación, este pre-crRNA se fragmentaba en trozos más pequeños de RNA actualmente conocidos como crRNA (Tang et al., 2002). De manera simultánea, se identificaron cuatro genes *Cas* (CRISPR-associated) localizados en regiones contiguas al locus de CRISPR. Por este motivo, se propuso que su funcionalidad debía ir ligada a la de CRISPR (Jansen et al., 2002) (Figura 18). Además, en este mismo estudio, se sugirieron las funciones probables de algunas proteínas *Cas* teniendo en cuenta ciertas homologías con helicasas y exonucleasas.

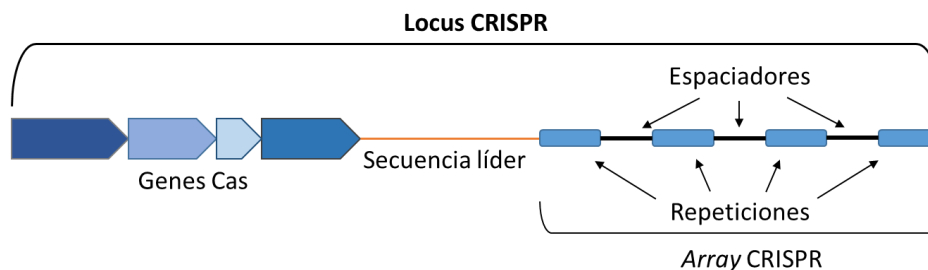


Figura 18. Representación esquemática del locus CRISPR. Compuesto por los genes *Cas*, la secuencia líder y el array CRISPR. Modificado de *Marraffini and Sontheimer, 2010*.

En 2005, se descubrió, mediante el uso de la bioinformática, que las secuencias espaciadoras eran homólogas a secuencias pertenecientes a ADN vírico, de cromosomas y de plásmidos que no eran

transmisibles (*Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005*). Estas observaciones permitieron hipotetizar que CRISPR actuaba como un sistema de defensa adaptativo, propio de microorganismos, contra elementos de DNA invasor (*Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005*) y que, su mecanismo de actuación era similar al del RNA de interferencia existente en eucariotas (*Mojica et al., 2005*).

Poco a poco, tras estos estudios, se fueron describiendo los mecanismos que sigue este sistema adaptativo de defensa, proporcionando así cada vez, mayor conocimiento del tema. Como por ejemplo la manifestación de la intervención de los crRNAs codificados en los espaciadores de CRISPR sobre dianas de DNA (*Brouns et al., 2008; Marraffini and Sontheimer, 2008*), el procesamiento de este crRNA en algunos de los tipos de sistemas CRISPR (*Deltcheva et al., 2011; Hale et al., 2009*), el corte del DNA diana por parte de la proteína Cas9 guiada por los crRNAs y la importancia que adquiere la presencia de PAMs en estos casos (*Garneau et al., 2010*) o la necesidad de que los crRNAs se encuentren unidos a tracrRNAs formando estructuras de RNA dúplex para que se asocien con la Cas9 y ésta lleven a cabo su función (*Deltcheva et al., 2011*).

En resumen, la maquinaria de acción de CRISPR/Cas como sistema de defensa basado en RNA se puede simplificar en tres etapas: adquisición, expresión e interferencia. En el proceso de adquisición o “inmunización”, se considera el material genético externo como agente invasivo, y se determina en su secuencia un fragmento concreto, el protoespaciador (futura secuencia espaciadora), se corta y se incorpora en el locus CRISPR en el extremo 5' tras la secuencia líder y una de las repeticiones. Cerca del protoespaciador, se encuentra la secuencia PAM (motivo adyacente al protoespaciador), una secuencia conservada cuya función es la de facilitar el reconocimiento futuro del protospaciador por el sistema de defensa. Posteriormente, los espaciadores se expresan en forma de un transcrito de RNA primario denominado precrRNA portador de todos los espaciadores del locus que, posteriormente, es cortado por endonucleasas en fragmentos más pequeños (crRNA) formados por la secuencia de un espaciador y una repetición. Más tarde, en la interferencia, cuando el organismo sufre de nuevo un ataque del agente invasivo, este crRNA acompañado de proteínas Cas entre otras, se une por complementariedad de bases a la secuencia previamente adquirida señalizando a las nucleasas que deben cortar el elemento genético externo. Todos estos sucesos, permiten al microorganismo identificar como diana de corte, a elementos extraños portadores de material genético y así, neutralizarlos (*Bhaya et al., 2011*) (Figura 19).

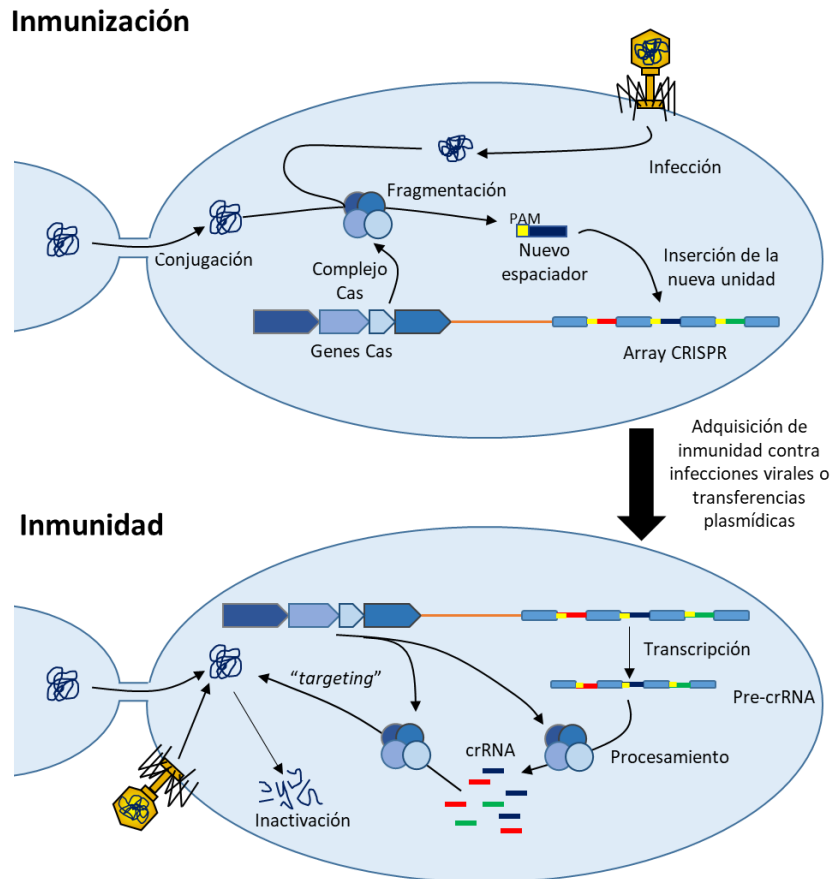


Figura 19. Representación general del mecanismo de acción de CRISPR/Cas9 en la inmunización e inmunidad de procarionotes. En el proceso de inmunización (panel superior), tras la inserción de ADN exógeno (vírico o plásmido), el complejo Cas reconoce el ADN foráneo e integra una nueva unidad espaciadora al array CRISPR. En el proceso de inmunidad (panel inferior) el array CRISPR se transcribe en un *pre-crRNA* que es procesado dando lugar a los crRNAs, estos serán usados como guía por las Cas para interferir con el ADN invasor. Modificado de (Horvath and Barrangou, 2010).

Es a partir del año 2011 cuando se empieza a explorar la posible aplicación en ingeniería genómica del sistema CRISPR-Cas. Para entonces, ya se conocían los componentes fundamentales del sistema CRISPR, que son la Cas9, el crRNA y el tracrRNA y se pensaba en la manera de reconvertirlo en un sistema nucleasa que pudiera editar genomas guiado por un RNA guía. Mediante la caracterización bioquímica de Cas9, se constató que la enzima purificada podía ser guiada por un crRNA para generar un corte en su correspondiente DNA diana y no sólo esto, sino que fusionando las dos estructuras de RNA del sistema (el tracrRNA y el crRNA) en una construcción denominada como sgRNA (single guide RNA) el corte del DNA diana in vitro se veía facilitado (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012) (Figura 20). Finalmente, diferentes grupos consiguieron, en el año 2013, editar el genoma de células de mamífero mediante la generación de mecanismos de reparación denominados de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación directa por homología (HDR) a través de la expresión heteróloga de Cas9 y sgRNA que dirigen a la proteína hacia su diana de corte (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013) (Figura 21).

A partir de ese año y hasta la actualidad, se han ido estudiando y analizando de manera más profunda cada uno de los componentes de la herramienta (Jinek et al., 2014; Nishimasu et al., 2014) alcanzando así una técnica cada vez más precisa de edición del genoma celular a través del sistema CRISPR/Cas9. La herramienta ha sido utilizada para alterar, de varias maneras, los genomas de una multitud de especies como lo son cultivos de células humanas (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013), bacterias (Jiang et al., 2013), nematodos (Friedland et al., 2013), gusanos de seda (Ma et al., 2014), ascidias (Sasaki et al., 2014), pez cebra (Hwang et al., 2013), anfibios (Nakayama et al., 2013), roedores (Wang et al., 2013) y plantas (Xie and Yang, 2013) entre otras. En cuanto al número de publicaciones en revistas científicas relacionadas con el empleo de CRISPR, este se multiplica exponencialmente año a año e incluso mes a mes, siendo a mes de mayo de 2022 más de 3120 los trabajos publicados en los que aparecen en el buscador de artículos científicos PubMed durante este mismo año, llegando casi a igualar en número a los artículos publicados en total en el año 2017.

COMPONENTES Y ACTUACIÓN DE CRISPR/CAS9

El sistema CRISPR/Cas9, es un mecanismo de defensa frente a ataque víricos presente en procariotas. Se basa en la producción de cortes en el genoma vírico, este sistema hoy en día está siendo adaptado para su utilización como herramienta genética. Para que este mecanismo de defensa y ahora también nuevo sistema de edición genómica lleve a cabo los cortes en el ADN, se requieren únicamente dos componentes: la proteína Cas9 y el ARN guía (ARNg).

La enzima Cas9 se caracteriza por tener una arquitectura bilobular en la que uno de los lóbulos se encarga del reconocimiento (lóbulo REC) de la diana y el otro posee la actividad nucleasa (lóbulo NUC) (Nishimasu et al., 2014). Este último dominio se compone de dos subdominios nucleasa RuvC y HNH, y de un subdominio, o dominio PI, de reconocimiento de la secuencia PAM (*protospacer adjacent motif*) (Hsu et al., 2014; Ran et al., 2013b). Existen varias versiones modificadas de la Cas9. Por ejemplo, la Cas9n o Cas9 *nickasa*, en la que en uno de sus dominios nucleasa esta desactivado, y solo produce el corte en una de las cadenas de ADN diana (Ran et al., 2013b, 2013a).

La otra mitad del sistema CRISPR-Cas9 consiste en un componente de ARN dúplex, formado por el *ARNcr* (*crRNA*, *CRISPR RNA*) y la molécula de *ARNcr trans-activador* (*tracrRNA*, *trans-activating crRNA*), denominado de forma general al conjunto como ARN guía. El *crRNA* complementa por apareamiento de bases con la secuencia diana en el ADN o protoespaciador a lo largo de 20 nucleótidos (Figura 20). Es preciso aclarar que en este apareamiento de bases no tiene por qué darse la complementariedad perfecta. En el extremo 3' de estos 20 nucleótidos se encuentra el *tracrRNA* formando una estructura muy característica con varias horquillas. Se sabe que la molécula de *tracrRNA* es requerida para la unión del RNA guía con la Cas9 y la buena orientación de éste para

con la interacción correcta entre el *crRNA* y su diana haciéndose indispensable su presencia para el funcionamiento de la herramienta de edición genómica (Jinek *et al.*, 2012) (Figura 20).

El *crRNA:tracrRNA*, puede construirse en forma de dúplex de igual manera en la que podemos encontrarlo en su estado natural o bien puede fusionarse creando una quimera en forma de una sola cadena con un lazo de unión entre sus dos elementos constituyentes cambiando su denominación por la de *sgRNA* (*single guide RNA*). Este *sgRNA* sigue teniendo las características clave del RNA guía, la secuencia de 20 nucleótidos en su extremo 5' que hibrida con el protoespaciador presente en el ADN y la estructura bicatenaria en su región 3' que facilita la unión entre el *sgRNA* y la Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014; Jinek *et al.*, 2012) (Figura 20). Además de esto, el *sgRNA* ha conseguido demostrar una eficiencia incluso superior comparado con el *crRNA:tracrRNA* (Ran *et al.*, 2013b).

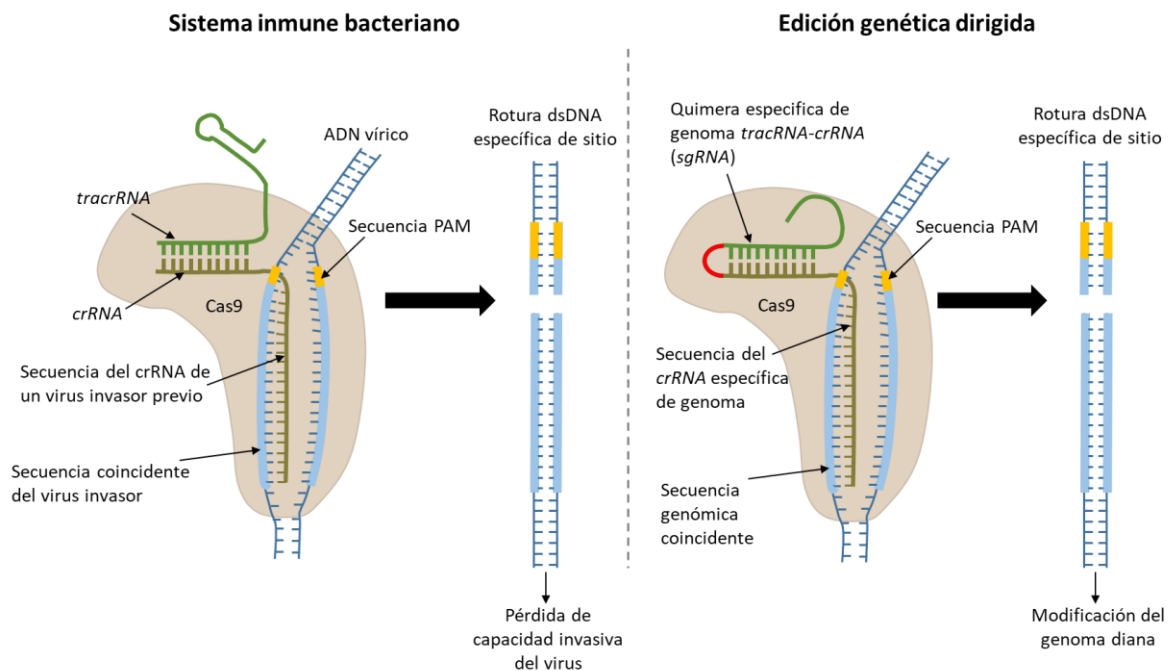


Figura 20. Representación esquemática del sistema inmune procarionta y la edición genética dirigida mediante el sistema CRISPR/Cas9. A la izquierda el RNA guía de estructura dúplex formado por el *crRNA* y el *tracrRNA*. A la derecha, el *sgRNA* constituido solamente por un RNA resultante de la fusión mediante un lazo de unión entre el *crRNA* y el *tracrRNA*. Se puede ver como en ambos casos se genera una rotura de la doble cadena del ADN (*double-strand DNA*, dsDNA). PAM (*Protospacer Adjacent Motif*).

Aunque la secuencia PAM no sea un componente como tal del sistema CRISPR/Cas, es inviable usar esta herramienta sin conocer su participación en la misma. La secuencia PAM, cuyo acrónimo deriva de los términos en inglés *Protospacer Adjacent Motif*, se compone de una serie de tres nucleótidos localizados en la región 3' de la hebra de ADN diana que no se une al *sgRNA* a pocos nucleótidos de la secuencia diana (Figura 20). La presencia de esta secuencia, implica la identificación de la diana por parte de Cas9, pues la endonucleasa asociada al *sgRNA* reconoce por su dominio PI, a la secuencia PAM produciéndose la unión ADN-Cas9, posteriormente se separan las dos hebras y la

herramienta se desplaza “up-stream” de la hebra en busca de su diana (Q. Zhang et al., 2021). La secuencia nucleotídica de PAM, puede variar dependiendo del microorganismo del que proceda la Cas9 utilizada, pero suele ser 5'-NGG que corresponde a la proteína Cas9 más utilizada, la SpCas9 (*S. pyogenes Cas9*).

CRISPR/CAS9 COMO HERRAMIENTA DE MODIFICACIÓN GÉNICA

Una vez se tiene una noción básica del funcionamiento natural del sistema CRISPR/Cas se puede llevar el uso de este sistema como herramienta de modificación genética.

En primer lugar, se ha de saber que la proteína Cas9 es la encargada de realizar el corte en las hebras del ADN bicatenario (dsDNA) en la región diana. Una vez producido este corte, la maquinaria celular de reparación del daño en el ADN se pone en marcha. Dicho mecanismo de reparación, está presente de forma natural en la gran mayoría de tipos celulares y organismos (*Sander and Joung, 2014*), y puede seguir dos vías de reparación, la de unión de extremos no homólogos (*Non-homologous DNA end joining*, NHEJ) o la vía de reparación directa por homología (*Homology directed repair*, HDR), según se encuentre o no un molde. El tipo de alteración genómica, por tanto, será diferente según si se da una u otra vía y esto dependerá del cambio que el investigador quiera fomentar. Mediante la vía de unión de extremos no homólogos, los dos fragmentos bicatenarios de ADN generados son religados, produciéndose por ello modificaciones en forma de inserciones o deleciones (InDel) que, si se producen en el exón diana, pueden acabar generando un *knock-out* por cambios en la pauta de lectura o por la aparición de codones de parada prematuros (Ran et al., 2013b) (Figura 21).

Por otro lado, si se introduce un molde de reparación de forma exógena, se activa la maquinaria de reparación de daño vía HDR. Esta vía, implica la recombinación entre el ADN diana que ha sufrido el corte y el molde de reparación, que puede ser o un constructo de ADN bicatenario (*double-strand DNA*, dsDNA) o un oligonucleótido de ADN monocatenario (*single-strand DNA*, ssDNA), en ambos casos la secuencia de inserción ha de estar flanqueada con secuencias de homología con el ADN diana (Ran et al., 2013b). Normalmente, se utilizan fragmentos de homología ssDNA para generar una corrección génica, en cambio los dsDNA se usan más frecuentemente para la generación de un *knock-in*. Este mecanismo es capaz de producir cualquier tipo de mutación deseada mediante el replazo de la secuencia diana por el molde de reparación sintetizado por el investigador con las alteraciones oportunas (*Cong and Zhang, 2015*). (Figura 21).

Además, existen las *nickasas* Cas9 (nCas9) que cortan sólo una hebra de ADN genómico, éstas ofrecen una mayor especificidad en la reparación del genoma mediada por la HDR y pueden disminuir potencialmente la frecuencia de mutaciones no deseadas (*off-targets*) (Ran et al., 2013b), una de las características críticas de cualquier sistema de edición genética que use nucleasas y por

tanto también en el CRISPR (Frock et al., 2015; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). Aunque con el transcurso de los años este problema se está solucionando al utilizar variantes de Cas9 más precisas (Kleinstiver et al., 2016; Schmid-Burgk et al., 2020; Slaymaker et al., 2016; Vakulskas et al., 2018) y/o *sgRNAs* modificados (Kocak et al., 2019; Yin et al., 2018). De igual manera, existen herramientas para conocer posibles off-targets de los *sgRNAs* utilizados (Doench et al., 2016; Lessard et al., 2017).

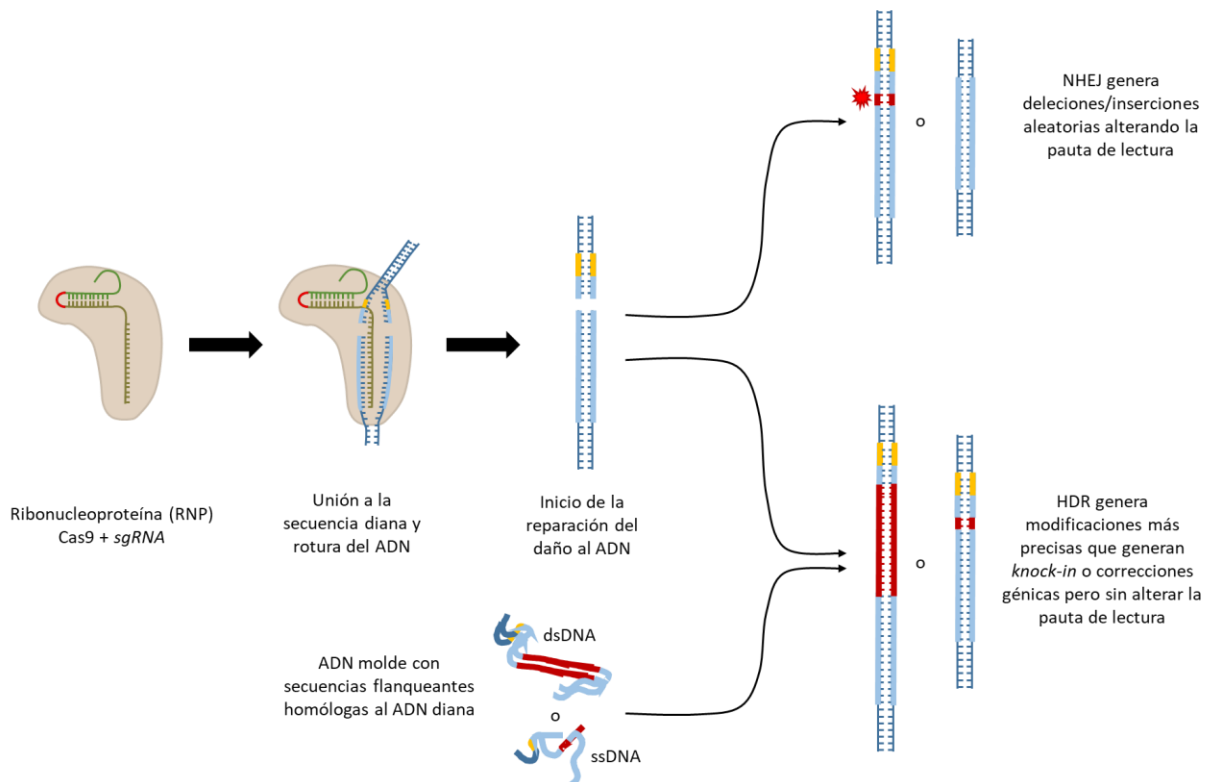


Figura 21. Mecanismos de reparación del daño al ADN al usar el sistema CRISPR/Cas. El *sgRNA* dirige a la Cas9 a la diana correspondiente para iniciar la edición genómica. En las células eucariotas, hay dos vías principales de reparación de daño de DNA: *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) and *Homology Directed Repair* (HDR). EL NHEJ, elimina bases, produciendo habitualmente cambios en la pauta de lectura y por tanto la inactivación del gen. El HDR, puede es utilizado para hacer cambios específicos de la región diana, si a la vez que se introduce los componentes del sistema CRISPR/Cas9 se proporciona también un molde de reparación específico que se inserte en la zona dañada.

Hasta la fecha, la edición del genoma basada en CRISPR/Cas se ha aplicado para realizar cribados de todo el genoma con el fin de investigar las funciones biológicas básicas e identificar posibles dianas farmacológicas en enfermedades complejas (Shalem et al., 2015). Además, múltiples estrategias terapéuticas basadas en CRISPR/Cas han demostrado su viabilidad para el tratamiento de enfermedades hereditarias (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Nelson et al., 2019), trastornos sanguíneos (Y. Wu et al., 2019), inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Pavel-Dinu et al., 2019)), infecciones virales (por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)) (de Buhr and Lebbink, 2018), enfermedades inflamatorias (enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias intestinales) (Ewart et al., 2019), y

cánceres (Yin *et al.*, 2019), y para la ingeniería celular (por ejemplo, generando células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) (Gao *et al.*, 2019)).

Aparte de la edición de genes, se ha visto que se puede utilizar la capacidad de la ribonucleoproteína (RNP, Cas9+sgRNA) a unirse a regiones específicas para otras funciones distintas a la de cortar el ADN. Para alcanzar estas nuevas funciones del sistema CRISPR/Cas9 se han generado nuevas versiones rediseñadas de las endonucleasas (Adli, 2018). En primer lugar, se mutaron los dominios catalíticos (HNH y RuvC) para crear Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9, *dead Cas9*) (Qi *et al.*, 2013) o parcialmente inactivas (nCas9) (Shen *et al.*, 2014; Trevino and Zhang, 2014). Al fusionar nCas9 con una deaminasa, se crearon los editores monobásicos para catalizar transiciones de bases de ácidos nucleicos, que son capaces de corregir mutaciones puntuales sin inducir la rotura del DNA bicatenario (Gaudelli *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2014). Al fusionar dCas9 con activadores o represores de la transcripción, se consiguió desarrollaron la activación CRISPR (CRISPRa) y la interferencia CRISPR (CRISPRi), respectivamente, que permiten la regulación de genes a nivel transcripcional (Qi *et al.*, 2013). Del mismo modo, se puede combinar con modificadores epigenéticos (por ejemplo, metiltransferasas de ADN, desmetilasas o desacetilasas de histonas) (Kearns *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2017; Morita *et al.*, 2016), dímeros de proteínas (por ejemplo, ABI1 y PYL1 de la vía del ácido abscísico) (Liang *et al.*, 2011) para modular el epigenoma y la estructura de la cromatina. Además, dCas9 puede fusionarse con una proteína verde fluorescente (GFP) o una proteína roja fluorescente (RFP) para marcar así ciertas regiones del ADN (Qin *et al.*, 2017; X. Wu *et al.*, 2019). Por otro lado, existe un tipo de nucleasa cas, la Cas13, que es capaz de unirse a RNA (Abudayyeh *et al.*, 2017) (Figura 22).

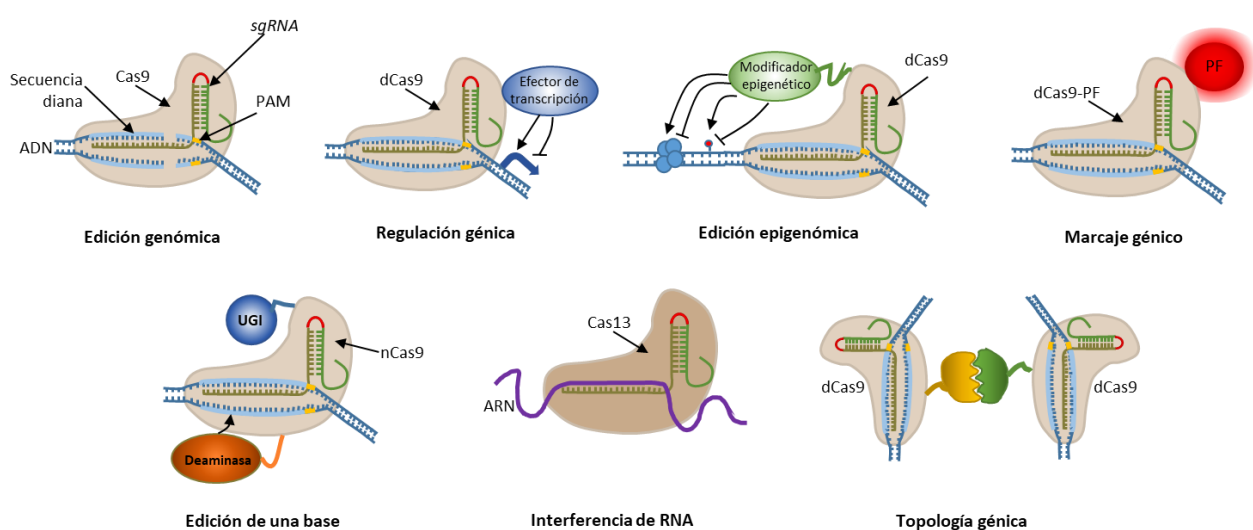


Figura 22. Tecnologías basadas en el sistema CRISPR/Cas. La Cas9 original induce edición génica guiada por el gDNA. dCas9 (*dead Cas9*) puede ser modificada por ingeniería genética con efectores transcripcionales, modificadores epigenéticos, proteínas fluorescentes (PF), inhibidores de la enzima uracil ADN glicosilasa (UGI) y proteínas díméricas para la regulación génica, edición epigenética, marcaje génico, edición de bases nucleotídicas y topología génica. La Cas13 tiene la capacidad de unirse a RNA. Modificado de Adli, 2018.

Existen varios formatos en los que el sgRNA y la proteína Cas pueden introducirse en la célula para lograr la edición genética. Éstos se han resumido en la figura 23. La entrega de la endonucleasa es problemática, debido al alto peso molecular de la proteína (158,9 kDa para SpCas9) y a la longitud del gen (alrededor de 4 kb). El gen puede entregarse en forma de plásmido de expresión o mediante vectores virales que deben ser importados al núcleo para su transcripción. Además, puede entregarse como ARN mensajero (ARNm) que se traduce directamente en el citosol. Por otro lado, el *sgRNA* puede entregarse como oligonucleótidos sintéticos o expresarse mediante plásmidos o vectores virales. La ribonucleoproteína (combinación de la proteína Cas y el *sgRNA*) puede entregarse como un solo plásmido, vector(es) viral(es), o como complejos RNP preformados que sólo necesitan localizarse en el núcleo (Figura 23). El molde de HDR para una reparación específica tras el corte de ADN, como se ha comentado con anterioridad, puede entregarse o bien como ADN de una sola hebra (adecuado para pequeñas correcciones mutacionales) o como fragmentos o plásmidos de ADN de gran tamaño (adecuados para la introducción de secuencias grandes o genes completos) (Figura 23).

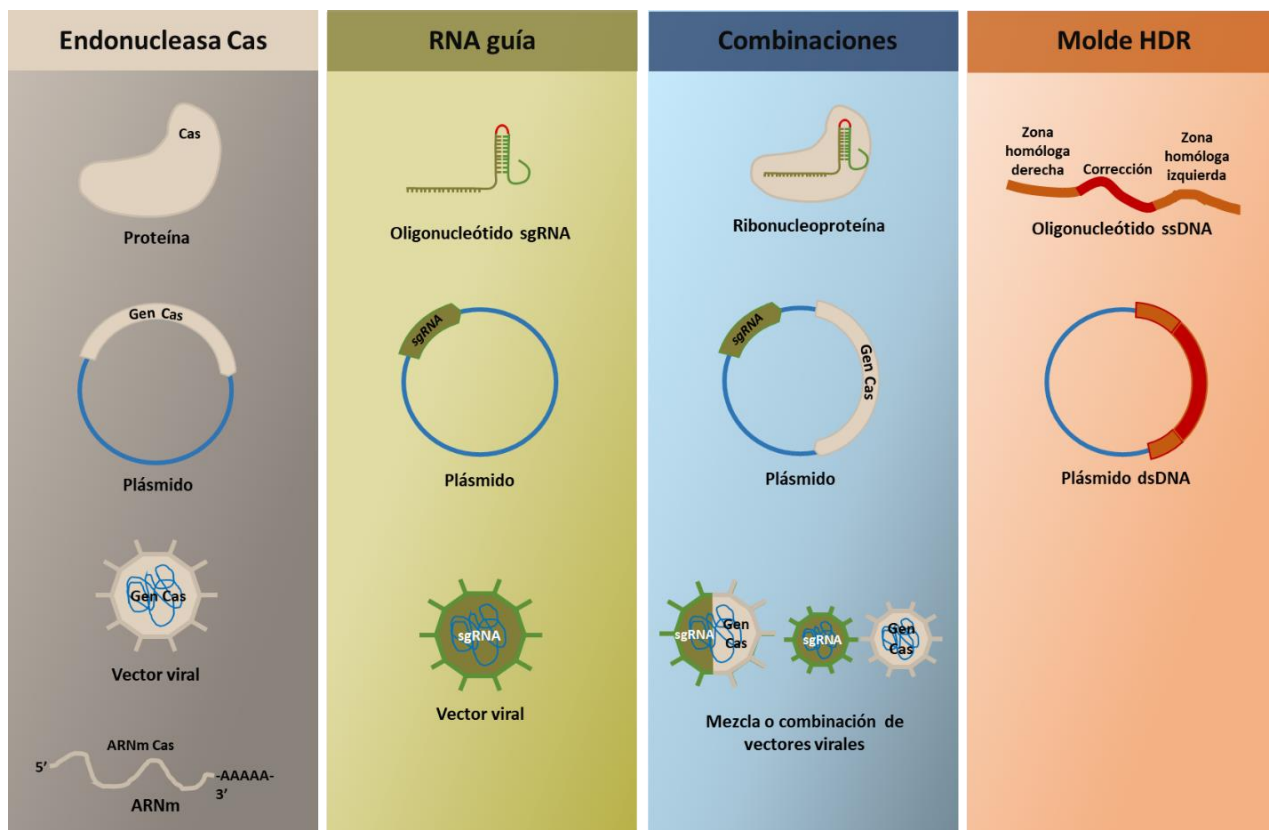


Figura 23. Esquema representativo de los distintos formatos de entrega de la Cas9, *sgRNA* y el molde de ADN para la recombinación homóloga (HDR) usados para lograr la edición genética. Modificado de *Wilbie et al., 2019*.

Aunque los sistemas CRISPR/Cas son muy prometedores en investigación, los métodos de entrega (*delivery*) que son eficientes y seguros para entregar los distintos componentes en las células diana siguen siendo limitados para el tratamiento de enfermedades (*Wilbie et al., 2019*). Son varias las revisiones que han cubierto las distintas estrategias de entrega *in vivo* del CRISPR/Cas tanto para generar modelos de enfermedades para posteriores estudios de estas, como para usar el sistema como terapia contra ciertas patologías (*Ain et al., 2015; Eoh and Gu, 2019; Givens et al., 2018; LaFontaine et al., 2015; L. Li et al., 2018; Lino et al., 2018; Mout et al., 2017a; Piotrowski-Daspit et al., 2018; Wan et al., 2019; H. X. Wang et al., 2017; L. Wang et al., 2019; Xu et al., 2021; Yin et al., 2017*). Así, la mayoría de las estrategias que se han utilizado para la administración de los componentes del CRISPR *in vivo* se basan en métodos físicos o en vectores virales (*Chakraborty et al., 2014; Ding et al., 2014; Long et al., 2014; Wu et al., 2015; Ye et al., 2014*). Varios métodos físicos, como la electroporación, la inyección hidrodinámica y la microinyección, se han aplicado con éxito para la entrega de CRISPR/Cas9; sin embargo, debido a las dificultades para mantener la función celular y su puesta a punto, los métodos físicos se consideran menos adecuados para la entrega *in vitro* e *in vivo* (*Ain et al., 2015; Cao et al., 2019; Han et al., 2015; Maresch et al., 2016; Maurisse et al., 2010; Wells, 2004; Wu et al., 2017*). Aunque los vectores virales como el adenovirus (AV), el virus adeno-asociado (AAV) y el lentivirus (LV) se han explorado ampliamente para la entrega del sistema CRISPR/Cas9 tanto *in vitro* como *in vivo* de forma eficiente, su traducción clínica se ha visto a menudo limitada por problemas de empaquetamiento, cuestiones de bioseguridad (como la carcinogénesis, la mutagénesis por inserción y la inmunogenicidad) y *targeting* (*B. Li et al., 2018; L. Li et al., 2015; Pack et al., 2005; Ran et al., 2015; Xue et al., 2014; Yin et al., 2014; W. Yu et al., 2017*). Los métodos químicos de administración del sistema CRISPR a través de vectores no virales para la edición del genoma tienen el potencial de abordar la mayoría de estas limitaciones mencionadas anteriormente, en particular con respecto a la bioseguridad, la carga y la capacidad de empaquetado. Como resultado, los vectores no virales tienen un gran potencial para servir como alternativas atractivas para avanzar en la investigación traslacional de la terapia génica basada en CRISPR/Cas9 (*Li and Huang, 2007; Yin et al., 2014*). Hasta la fecha, los distintos formatos de entrega de los componentes CRISPR se han podido administrarse mediante una amplia gama de vectores no virales, que abarcan desde lípidos (*Heldin et al., 2004; Jain and Stylianopoulos, 2010; Jiang et al., 2017; Khawar et al., 2015; Miller et al., 2017; Minchinton and Tannock, 2006; Rosenblum et al., 2020; Ross et al., 2015; Schuh et al., 2018; Torchilin, 2014; Trédan et al., 2007; C. F. Xu et al., 2019; Zhang et al., 2017*), materiales poliméricos (*Kang et al., 2017; Lao et al., 2018; Li et al., 2017; Liu et al., 2018; Timin et al., 2018; H. X. Wang et al., 2018; Xu et al., 2018; X. Zhang et al., 2019; Z. Zhang et al., 2019*), nanopartículas de oro (*Hansen-Bruhn et al., 2018; K. Lee et al., 2017; Mout et al., 2017b; Mout and Rotello, 2017; P. Wang et al., 2018, 2017*), óxido de grafeno (*Yue et al., 2018*),

componentes metal-orgánicos (Alsaïari et al., 2018), péptidos de penetración celular (*cell penetrating peptide*, CPP) (Gagat et al., 2017; S. M. Kim et al., 2018; Lostalé-Seijo et al., 2017; Ramakrishna et al., 2014) y nanoestructuras de ADN (Sun et al., 2015), entre otros.

CRISPR/CAS9 COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER

En las últimas dos décadas, la secuenciación de los tumores ha generado un enorme catálogo de alteraciones genéticas de prácticamente todos los tipos de cáncer. La identificación de los genes que impulsan la progresión y el mantenimiento del cáncer en modelos modificados genéticamente es un paso importante en el estudio de vías de señalización y en el desarrollo de nuevas terapias. La generación de estos modelos murinos tradicionales de *knock-out* y *knock-in* de genes van asociados a una alto coste temporal y monetario (Walrath et al., 2010). A lo largo de esta última década, el uso del sistema CRISPR/Cas ha incrementado notablemente a la hora de editar genes con el fin de desarrollar nuevos modelos murinos y celulares de cáncer, ya que proporciona un sistema genético rápido y sencillo con el que identificar y estudiar los determinantes genéticos del cáncer, complementando así las técnicas que había hasta ahora para la modulación endógena de la expresión de genes, como lo son los siRNA (*small interfering RNA*), los shRNA (*short hairpin RNA*) o los cDNAs de sobreexpresión. Algunas de las aplicaciones más significativas de la tecnología CRISPR para generar modelos de cáncer se encuentran recogidas en la figura 24.

En primer lugar, utilizando el sistema CRISPR/Cas permite generar líneas celulares de mamífero con una o varias mutaciones de una manera relativamente sencilla, lo que facilita y acelera la posibilidad de evaluar y validar nuevos fármacos, así como para realizar pruebas para terapias dirigidas (Fellmann et al., 2017). Así, por ejemplo, se ha conseguido validar nuevos fármacos para tumores de colon y pulmón deficientes de p53 (Wanzel et al., 2016), o para carcinomas endometriales deficientes en ARID1A (Megino-Luque et al., 2022) o FBXW7 (Lehrer and Rheinstein, 2021b), o corroborar el uso de ciertos fármacos contra nuevas dianas terapéuticas (Lin et al., 2017). Además, la capacidad de la herramienta CRISPR de introducir mutaciones puntuales ha permitido identificar nuevos genes y estudiar la relación que existe entre ciertas mutaciones y la adquisición de resistencias a fármacos de algunos tumores (Donovan et al., 2017; Ipsaro et al., 2017; Kwanten et al., 2022; Smurnyy et al., 2014). Esta herramienta también se ha usado para el estudio de la translocación cromosómica que se da en ciertos tipos de cánceres (Ghezraoui et al., 2014; Y. Li et al., 2015; Torres et al., 2014; Vanoli et al., 2017). Por otro lado, también se ha usado para recapitular el efecto de la combinación de ciertas mutaciones en diversos tipos de cáncer (Heckl et al., 2014; J. Lee et al., 2017), para modificar y caracterizar ciertas vías moleculares implicadas en cáncer, como es el caso de la vía Hippo (Plouffe et al., 2016), para mimetizar y estudiar la alteración de la función de promotores, potenciadores y localizaciones genómicas (Guo et al., 2015). Por otra parte, CRISPR se ha usado para generar mutaciones en organoides para comprender el papel y las interacciones

entre los genes implicados en el inicio y la progresión en diversos tipos de cáncer (Dekkers et al., 2020; Drost et al., 2017, 2015; Lo et al., 2021; Matano et al., 2015; Seino et al., 2018; Verissimo et al., 2016). Los sistemas de administración comúnmente utilizados para los cultivos celulares y los organoides incluyen la infección lentiviral, la electroporación y compuestos lipídicos.

En lo relacionado con los modelos animales, debido a la facilidad y eficiencia de utilizar la tecnología CRISPR para generar RMGs, esta técnica se ha convertido en una práctica de rutina en muchos animalarios y empresas comerciales de RMGs para generar modelos que mimeticen ciertas mutaciones. Además, al eliminar la necesidad de un complejo diseño de vectores y el laborioso cribado de las células madre embrionarias (CME), se ha hecho posible diseñar y generar, en un solo paso, modelos murinos que presenten combinaciones concurrentes de alteraciones genéticas (Huijbers et al., 2015; Wang et al., 2013; Yang et al., 2013). Han sido muchos las estrategias seguidas para mejorar el rendimiento y la eficacia de la edición en los cigotos, como la electroporación con ribonucleoproteína CRISPR (*CRISPR ribonucleoprotein (RNP) electroporation of zygotes*, CRISPREZ) (Modzelewski et al., 2018), la electroporación con RNP CRISPR y la infección con AAV (*CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection*, CRISPR-READI) (Chen et al., 2019), así como la mejora de la administración oviductal de ácidos nucleicos (iGONAD) (Ohtsuka et al., 2018). Por ello, la generación de diferentes modelos oncológicos de ratón se ha acelerado en los últimos años. Por ejemplo, en el año 2021 un estudio describió una nueva técnica para generar modelos utilizando la tecnología CRISPR con la que habían generado 70 nuevos modelos de ratón que expresaban la Cre recombinasa específica de tejido (Han et al., 2021).

Otra estrategia para generar modelos de cáncer *in vivo* es introducir los componentes CRISPR en los tejidos somáticos, bien mediante manipulación *ex vivo* y posterior trasplante de las células (modelos híbridos *ex vivo/in vivo*), o bien directamente *in vivo*. Así, por ejemplo, editando *ex vivo* células hematopoyéticas se ha conseguido inducir leucemia mieloide aguda (*acute myeloid leukaemia*, AML) en los ratones trasplantados (Heckl et al., 2014), o generar modelo *ex vivo* CRISPR en organoides para el estudio del cáncer del tracto biliar *in vivo* (Izumiya et al., 2021). Por otro lado, mediante la edición *in vivo* por ejemplo en hígado (Liang et al., 2020; Xue et al., 2014), páncreas (Chiou et al., 2015; Ideno et al., 2019; Yang et al., 2019), colon (Li et al., 2019; Michels et al., 2020), tracto digestivo (Biagioni et al., 2019), pulmón (Jiang et al., 2019; Sanchez-Rivera et al., 2014) y piel (Temblador et al., 2019; Zhou et al., 2019) se han generado diversos modelos de cáncer con diversos genotipos. Por otro lado, existen dos modelos de ratones con el gen de la *Cas9* inducible (Dow et al., 2015; Platt et al., 2014), estos proporcionan un escenario ideal para la realización de múltiples mutaciones somáticas específicas de tejidos y el estudio de la implicación de éstas en los diferentes tejidos. Con respecto a estos ratones, han sido usados por ejemplo, entre otras cosas para el estudio

e implicación de diversas mutaciones en cáncer de pulmón mediante el uso de lentivirus portadores de distintos *sgRNA* (Rogers et al., 2018, 2017).

Con todo, tal vez el mayor impacto del CRISPR en la investigación del cáncer se haya producido en el cribado (*screening*) mediante pruebas genéticas combinadas (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014; T. Wang et al., 2014). La facilidad de diseño, clonación, la mejora de la eficiencia y el continuo desarrollo de bibliotecas de *sgRNAs* mejoradas (Sanjana et al., 2014; Sanson et al., 2018) han convertido a los *screening* con CRISPR en el método idóneo para investigar la función de los genes en el cáncer. En líneas celulares, organoides y animales, los cribados CRISPR de selección positiva siguen perfeccionando nuestra comprensión de cómo los genes y las vías contribuyen a la tumorigénesis (Doench, 2018; Sánchez-Rivera and Jacks, 2015). Hay cientos de ejemplos de estudios de cribado eficaces en líneas celulares, aunque CRISPR también ha permitido realizar cribados genéticos agrupados en contextos más complejos como en organoides (Michels et al., 2020), o a gran escala *in vivo*, mediante la transducción *ex vivo* de la librería de *sgRNAs* en células y el posterior trasplante de estas en ratones (Chen et al., 2015), o a través de la administración *in situ* en órganos de los componentes CRISPR (Chow et al., 2017).

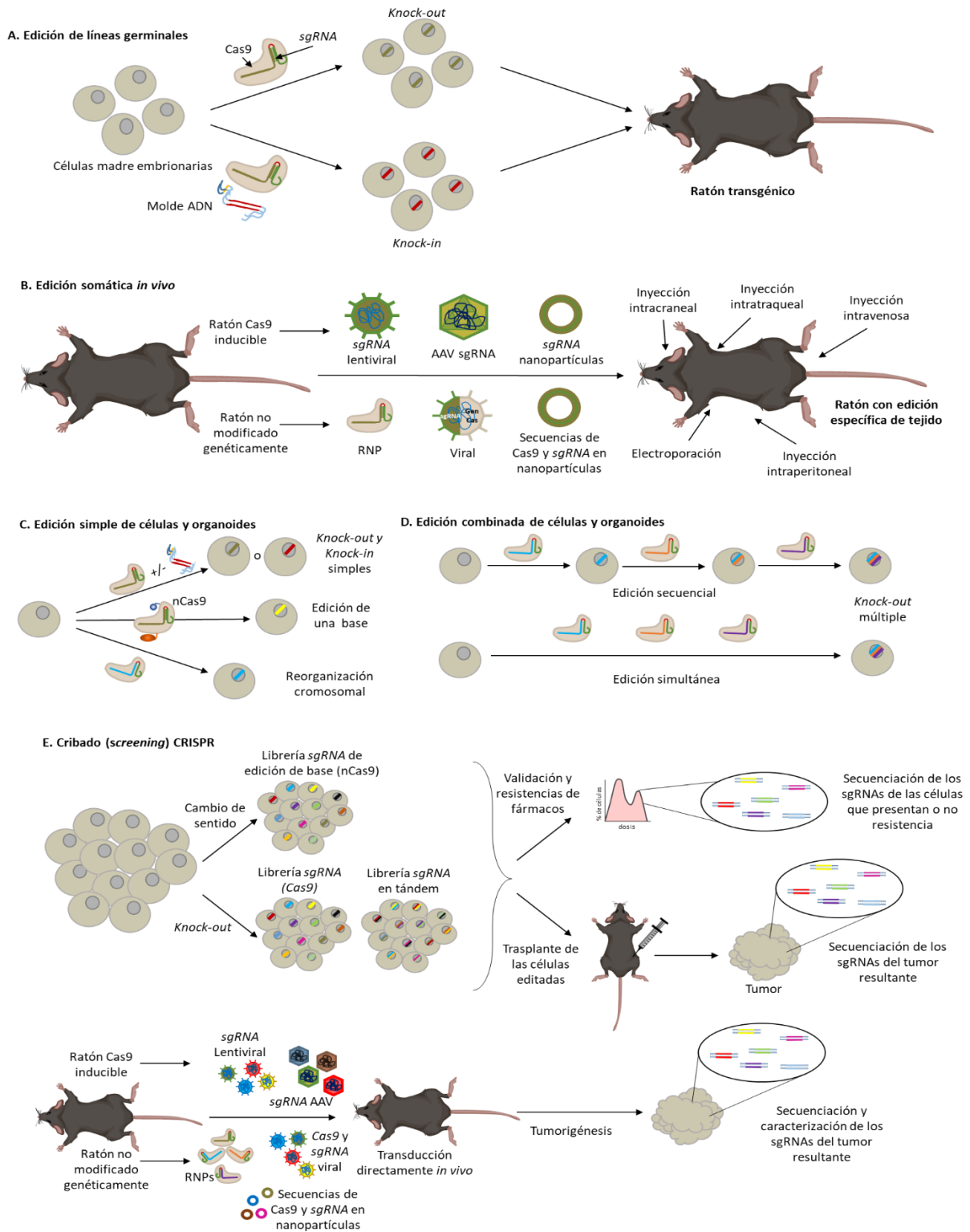


Figura 24. Principales aplicaciones de la tecnología CRISPR para construir modelos de cáncer. (A) Transfección de las células madre embrionarias para la generación de ratones transgénicos *knock-out* y *knock-in*. **(B)** Edición somática en ratones específica de tejido utilizando virus adeno-asociados (AAV), lentivirus o entrega de *sgRNA* en nanopartículas en el ratón Cas9 inducible y ribonucleoproteínas, virus o nanopartículas portadores de la secuencia del gen de la Cas y el *sgRNA*. **(C y D)** Edición simple y múltiple de células y organoides. **(E)** Modelos CRISPR empleados *in vitro* e *in vivo* para la selección de genes implicados en resistencias y tratamientos de fármacos, y la iniciación y progresión en cáncer, mediante el uso de librerías CRISPR. Modificado de (Chow and Chen, 2018; Katti et al., 2022).

A día de hoy, la mayor parte de los cribados del cáncer se han basado en la proliferación, pero existen otras estrategias para identificar reguladores clave del cáncer. Es el caso del uso de las proteínas de la superficie celular como marcadores para la citometría de flujo o la separación de células activadas magnéticamente (*magnetic-activated cell sorting*, MACS) ofrece una vía directa para aislar las células con cambios específicos en las proteínas efectoras que no participan en la proliferación o la muerte celular. Por ejemplo, el uso de marcadores funcionales como la proteína de muerte celular programada 1 (*programmed cell death protein 1*, PD1), el ligando PD1 (PDL1) o el complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) permite la identificación de genes que controlan la presentación de antígenos o la activación inmunitaria (Burr et al., 2019, 2017; Okada et al., 2017; Spel et al., 2018). Tecnologías más recientes y complejas permiten realizar cribados de librerías CRISPR "sin marcadores" midiendo directamente el transcriptoma de células individuales tras la disrupción génica mediada por CRISPR (Datlinger et al., 2017; Dixit et al., 2016; Mimitou et al., 2019).

CARCINOMA ENDOMETRIAL Y CRISPR

El papel de la tecnología CRISPR/Cas9 en el tratamiento de otros tipos de cáncer ha promovido su investigación en los cánceres ginecológicos, incluyendo el cribado y la identificación de los genes causantes de la enfermedad y los genes relacionados con la resistencia a los medicamentos, así como la eliminación de los genes causantes de la enfermedad.

En relación al carcinoma endometrial, el sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado en estudios para investigación básica, caracterizando el efecto de alteraciones génicas *in vitro*, así como en estudios para la búsqueda de nuevos tratamientos para este tipo de cáncer. Gran parte de ellos recogidos en la tabla 11. En comparación con otros tipos de cánceres ginecológicos y no ginecológicos, el uso de la tecnología CRISPR en el estudio del CE es a día de hoy algo reducida, de hecho, a fecha de hoy, aunque existen modelos *in vivo* que utilizan xenógrafos de líneas endometriales tumorales modificadas con CRISPR, no existe descrito ningún modelo de ratón que desarrolle cáncer de endometrio generado mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9. Por poner algún ejemplo de alguno de los estudios *in vitro*, en primer lugar, utilizando el *knock-out* CRISPR/Cas9 del gen *ARID1A* en la línea celular de cáncer de endometrio, Ishikawa, tanto la célula *knock-out* para *ARID1A* como la célula resistente a la progesterona mostraron una mayor capacidad de proliferación y de formación de clones que la sublínea parental, además se vio que al tratar las células con LY294002, un inhibidor de AKT, no se revertía la expresión de PRB en las células *knock-out* para *ARID1A*, pero sí en las parentales, lo que indica que la expresión de PRB está estrechamente relacionada con *ARID1A* y que *ARID1A* puede utilizarse como un biomarcador fiable para predecir la respuesta combinada al tratamiento de CE con el inhibidor de AKT (H. Wang et al., 2019). Otro estudio,

mediante el uso de la tecnología CRISPR, ha relacionado la importancia de la HDAC6, una histona deacetilasa, para la progresión tumoral del carcinoma de endometrio con alteraciones para *ARID1A* (Megino-Luque et al., 2022). Por otro lado, la supresión de *S100A4* en la línea celular de cáncer de endometrio HEC-1B mediante la tecnología CRISPR/Cas9 inhibe la fosforilación de AKT y la activación de MMP2, lo que conduce a una reducción de la proliferación y la invasión de las células HEC-1B (Tahara et al., 2016). Por otra parte, otro en otro estudio se observó que la supresión del gen *SDPR* mediante CRISPR/Cas9 en las células HEC-1B y HEC-108 puede suprimir la migración, la invasión y la EMT de las células tumorales mediante la inhibición de la vía ILK-ALDH1 (Tahara et al., 2019). Asimismo, el KO de *miR-203* en células RUCA-1 hizo que las células tumorales se estancaran en la fase G2 del ciclo celular y que la viabilidad celular también disminuyera (Zierau et al., 2018). En resumen, dado que el cáncer de endometrio es una enfermedad regulada por múltiples genes, muchos mecanismos específicos aún no están claros. Así, queda mucho por profundizar, complementar y modelizar mediante la utilización aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 al mecanismo patológico y al pronóstico del cáncer de endometrio.

| Gen diana | Línea o cultivo celular | Aplicación CRISPR/Cas9 | Función | Referencias |
|----------------|---------------------------|------------------------|---|-----------------------------|
| ARID1A | Ishikawa | Knock-out | Proliferación↑, formación de colonias↑ | (H. Wang et al., 2019) |
| ARID1A | Cultivo primario de ratón | Knock-out | Proliferación↑, invasión↑ EMT↑ | (Megino-Luque et al., 2022) |
| S100A4 | HEC-1A | Knock-out | Proliferación↓ invasión↓ | (Tahara et al., 2016) |
| SDPR | HEC-1B, HEC-108 | Knock-out | Migración↓, invasión↓, EMT↓, formación de colonias↓ | (Tahara et al., 2019) |
| miR-203 | RUCA-1 | Knock-out | Proliferación↓, parada de ciclo celular | (Zierau et al., 2018) |
| ESR1 | ECC1 | Knock-out | Correlación negativa de PR y Myc | (Kavlashvili et al., 2016) |
| CTCF | K562 | Knock-out | Proliferación↓, formación de colonias↓ | (C. G. Bailey et al., 2018) |

Tabla 11. Edición de genes mediante CRISPR/Cas9 en la investigación del cáncer de endometrio.

| <i>C-erbB-2</i> | HEC-1A | <i>Knock-out</i> | <i>Knock-out</i> exitoso, sin función investigadora | <i>(Cai et al., 2019; Peng et al., 2021)</i> |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|---|---|
| <i>PTEN</i> | HEC-1A | <i>Knock-out</i> | Reducción de la sensibilidad a la combinación de OLAPARIB y BKM120 | <i>(Bian et al., 2018)</i> |
| <i>ESR1</i> | Ishikawa | Mutación inducida | Migración↓ | <i>(Blanchard et al., 2019)</i> |
| <i>ETV4</i> | Ishikawa | <i>Knock-out</i> | Proliferación↓, Crecimiento del tumor en ratones↓ | <i>(Rodriguez et al., 2020)</i> |
| <i>LIFR</i> | Ishikawa, AN3CA | <i>Knock-out</i> | Proliferación↓, formación de colonias↓, Crecimiento del tumor en ratones↓ | <i>(Tang et al., 2021)</i> |
| <i>FBXW7</i> | HEC-50B, HEC-1B, ARK1 y ARK4 | <i>Knock-out</i> | Alteración de los niveles de L1CAM y TGM2, dos posibles dianas terapéuticas | <i>(Urlick et al., 2021; Urlick and Bell, 2018)</i> |
| <i>Men1,K mt2a y Ash2l</i> | Organoides | <i>Knock-out screening</i> | Proliferación↓, MI-136 como un potencial inhibidor del cáncer de endometrio | <i>(Chen et al., 2021)</i> |

Tabla 11 (continuación). Edición de genes mediante CRISPR/Cas9 en la investigación del cáncer de endometrio. ↓, down-regulación o bajada; ↑, up-regulación o aumento; EMT (Transición Epitelio-Mesenquima del inglés, *epithelial-to-mesenchymal transition*). Modificada de *Zhang et al., 2020*.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*“Si no sabes a dónde vas,
cualquier camino te llevará allí”*

Proverbio asiático

PTEN y *TP53* son dos de los supresores tumorales que presentan un mayor prevalencia mutacional en cánceres humanos, alcanzando una tasa mutacional de un 80% (*Hollander et al., 2011*) y 50% (*Olivier et al., 2010*) en algunos tipos de cáncer, respectivamente. Ambos genes juegan un papel importante en la tumorigénesis uterina, y la frecuencia de las mutaciones de uno, otro u ambos van variando según el tipo de cáncer uterino. Además de estas dos mutaciones, el carcinoma endometrial presenta un gran abanico de mutaciones y las múltiples combinaciones de éstas harán que el tumor endometrial progrese hacia uno u otro tipo histológico.

Sobre esta base, en el presente trabajo se pretende desarrollar modelos murinos con valor preclínico que permitan estudiar el proceso tumoral inducido por la ablación de *Pten* y *Trp53* de manera específica en el endometrio de los ratones. En este sentido, los **objetivos** de esta tesis son:

1. Establecimiento de modelos animales para el estudio del papel de PTEN y/o p53 en el desarrollo tumoral del endometrio
 - 1.1. Establecimiento y evaluación de un modelo murino para el estudio de neoplasias de origen epitelial inducidas por la pérdida de *Pten* y/o *p53*
 - 1.2. Establecimiento y evaluación de un modelo murino para el estudio de neoplasias inducidas por la pérdida de *Pten* y/o *p53* de manera específica en el útero.
2. Establecimiento y evaluación de un modelo murino para el estudio de neoplasias endometriales con mutaciones a la carta generadas *in vivo* de manera específica en el endometrio con el sistema de edición génica CRISPR/Cas9



MATERIALES Y MÉTODOS

"A la gente le encanta cortar madera. En esta actividad inmediatamente se encuentran los resultados"

Albert Einstein

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

REACTIVOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS CON CULTIVOS CELULARES

Los medios de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) y DMEM/F12, el suero fetal bovino inactivado (FBSi), el suero de caballo (horse serum, HS), la solución salina equilibrada de Hank (HBSS, del inglés *Hanks Balanced Salt Solution*), la anfotericina B, el EGF (factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor*) y el ITS (insulina-transferrina-selenito sódico) se adquieren en Invitrogen. La glicina a ThermoFisher. El piruvat sòdic, el HEPES, la penicilina/estreptomicina, el Tritón X-100, la bromodeoxiuridina (BrdU) y el Hoechst 33258 son de Sigma-Aldrich. El Matrigel® se obtuvo en la casa comercial BD Biosciences y el DCC (*dextran-coated charcoal-stripped serum*), la tripsina con rojo fenol al 0,25% d'EDTA y la tripsina al 2,5% sin rojo fenol en GIBCO.

AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO CELULARES DE FIBROBLASTOS DE RATÓN

En el presente trabajo, el aislamiento de los fibroblastos se realizó a partir de colas y orejas de ratón. En primer lugar, se lleva a cabo la trituración de estas con ayuda de un bisturí. Todos los fragmentos obtenidos de tejido se introducen en un tubo eppendorf el cual contiene 950µL de medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBSi, Invitrogen), 1 mmol/L HEPES (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L de piruvato sódico (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 0.1% de Anfotericina B (Invitrogen) y 50µL de Collagenase Type IA (200mg/mL, Worthington Biochemical Corporation). Entonces, se deja la mezcla durante 2-3h a 37°C, en agitación o realizando cada 15 minutos inversiones suaves al eppendorf para que los fragmentos de las colas y orejas no queden totalmente sedimentados en el fondo del tubo. Pasado el tiempo, se vuelca el contenido del eppendorf sobre un Sterile Cell Strainer (70µM Nylon Mesh, Fisherbrand®) y con ayuda de un émbolo de una jeringa se ayuda a que pasen las células a través de los poros del Strainer. Todo esto encima de una placa de cultivo P100 (Falcon). Para facilitar el paso de un mayor número de células, se va añadiendo poco a poco, a la vez que se va ejerciendo presión con el émbolo, medio DMEM suplementado. De esta forma, al quedar tan diluida, a su vez, se estará procediendo a la inactivación de la colagenasa. Una vez se considera que la mayor parte de fibroblastos ha traspasado el Strainer, se procede a añadir hasta un volumen final de unos 8mL y se incuban a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Al día siguiente, se procede a cambiar el medio por medio DMEM suplementado fresco, para tratar de eliminar posibles debris, grasa, colagenasa... que hayan quedado suspendidos en el medio de cultivo. Pasados unos 2-3 días se acabará teniendo la placa de cultivo P100 confluyente.

Los fibroblastos de ratón (msF, del inglés *mouse fibroblast*) en cultivo, crece adheridos al sustrato, es decir en monocapa a las placas de poliestireno en medio DMEM suplementado. Este tipo celular se incuba a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Estos cultivos se dividen cada 3-4 días cuando se encuentran confluentes, para asegurar su mantenimiento. En primer lugar, se hace un lavado con tampón fosfato salino (PBS), y a continuación, se disgrega con tripsina al 0,25% de EDTA durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se inactiva la tripsina con medio DMEM con 10% de suero, se recogen las células y se centrifugan a 1.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, el pellet celular se resuspende con el mismo medio de cultivo, y las células se plantaron en nuevas placas a una dilución determinada, en función del experimento a realizar y la tasa de proliferación.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES DE ÚTERO DE RATÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE LAS CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES

Para el aislamiento de las células epiteliales del endometrio de ratón y su posterior establecimiento en cultivos tridimensionales, se emplean hembras de entre 3-4 semanas de edad. Como se muestra en la figura 25, en primer lugar, se sacrifican los animales por dislocación cervical, se extrae el útero, que es bicórneo, y se corta cada rama en 3-4 trozos de 4 mm aproximadamente. Estos tejidos de útero se limpian con HBSS y se digieren con 1% de tripsina sin rojo fenol en HBSS, durante 1 hora a 4°C, y durante 45 minutos a temperatura ambiente. La tripsina se inactiva en DMEM con un 10% de FBS. En este momento, se puede proceder ya a la obtención de las células epiteliales del lumen del útero. Con esta finalidad, se aplica una ligera presión con una hoja de bisturí sobre los trozos de útero digeridos, obteniendo así, una lámina de células. Esta lámina epitelial se recoge y es lavada con PBS dos veces. Posteriormente, se disgrega mecánicamente pasando las células a través de una pipeta p1000, 50 veces. A continuación, las células, que se encuentran formando agregados de 4-5 células, se resuspenden en medio DMEM/F12 suplementado con 1 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B y 3% de DCC, y se plantaron, en primer lugar, en dos dimensiones. Estas células se cultivaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

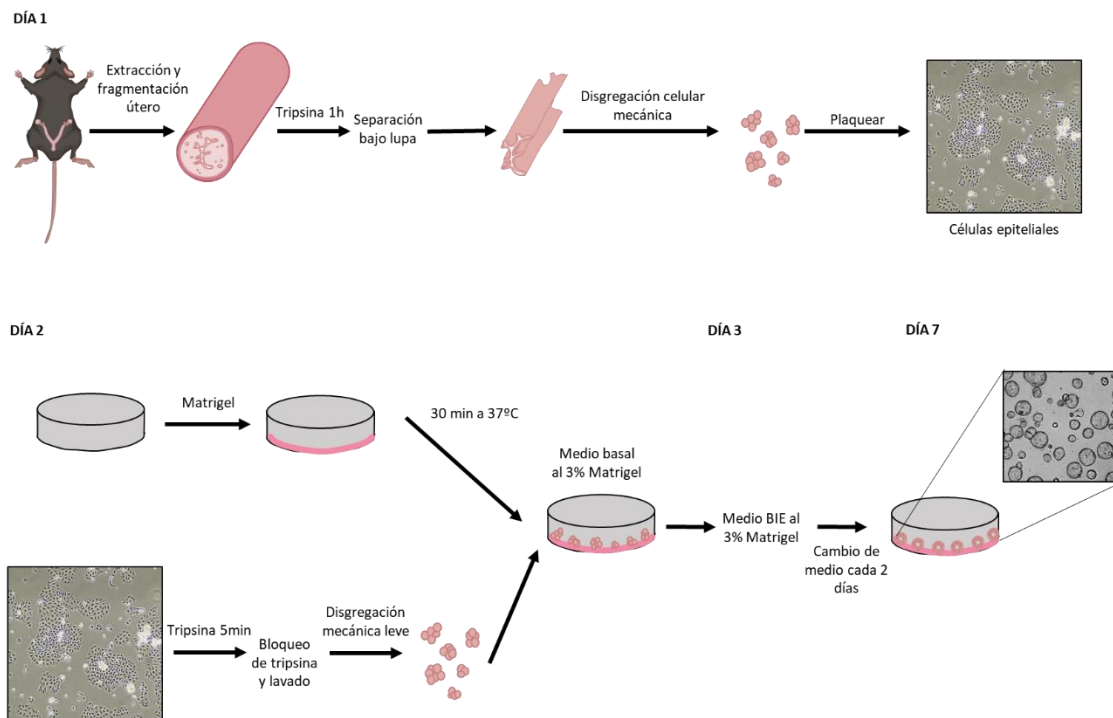


Figura 25. Diseño experimental para el aislamiento y establecimiento de cultivos tridimensionales de células epiteliales endometriales. Esquema del protocolo para el aislamiento y establecimiento de cultivos celulares tridimensionales de células epiteliales endometriales.

Al día siguiente, trascurridas entre 16 y 24 horas desde que el establecimiento del cultivo bidimensional, se procede a plantar las células endometriales en tres dimensiones. En primer lugar, las células epiteliales de endometrio murino, que se encuentran crecidas en dos dimensiones, se limpian con PBS y se disgregan con tripsina al 0,25% de EDTA durante 5 minutos a 37 °C. Seguidamente, la digestión se frena con la adición de medio DMEM suplementado con 10% FBSi. Se recogen las células y se centrifugan a 1.000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se limpian dos veces con PBS, y se disgregan mecánicamente, para formar agregados celulares de 2 a 8 células. Cualquier intento de individualizar las células provoca una drástica disminución de la viabilidad celular. A continuación, las células se resuspenden en medio basal, el cual está formado por DMEM/F12 suplementado con 1 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B y 3% de Matrigel®, y se plantan a una concentración final de 4×10^4 agregados celulares/ml, sobre una cama de Matrigel®, previamente polimerizado a 37°C durante media hora. Al día siguiente, se cambia el medio por un medio igual al anterior pero suplementado también con 5 ng/ml de EGF, una dilución 1:100 de ITS y 3% de Matrigel®. A partir de este momento, el medio se cambia cada 2 días empleando cada vez este último medio BIE (Basal+ITS+EGF) fresco al 3% de Matrigel®.

Para aislar células mesenquimales uterinas, una vez extraídas las células epiteliales endometriales del lumen uterino, se procede a la digestión de los fragmentos en 950µL de medio DMEM,

suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBSi, Invitrogen), 1 mmol/L HEPES (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L de piruvato sódico (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 0.1% de Anfotericina B (Invitrogen) y 50 μ L de colagenasa tipo IA (200mg/mL, Worthington Biochemical Corporation). Entonces, se deja la mezcla en agitación durante dos horas a 37°C. Una vez pasado el tiempo de digestión, se procede a la eliminación de la colagenasa mediante varios lavados con PBS de las células obtenidas. Posteriormente, se disgrega mecánicamente pasando las células a través de una pipeta p1000, 10 veces. A continuación, las células se resuspenden en medio DMEM/F12 suplementado con 1 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B y 3% de DCC, y se plantaron en monocapa. Estas células se cultivan a 37°C en una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

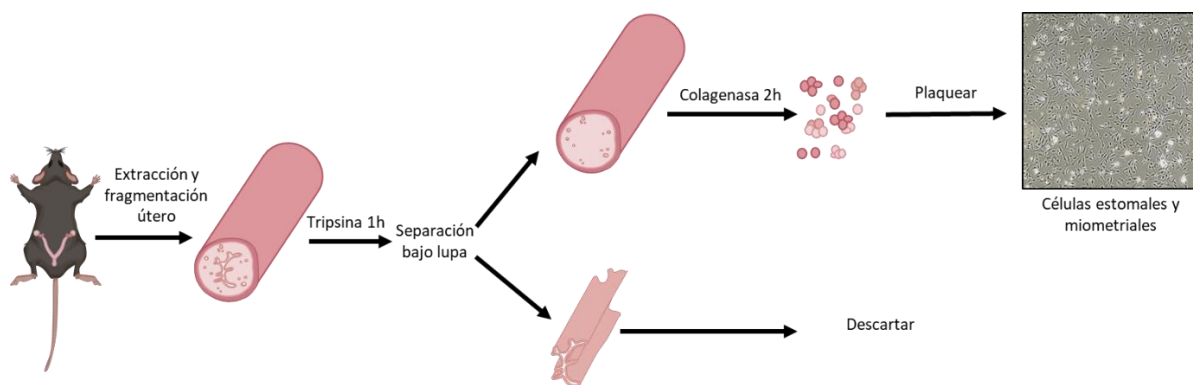


Figura 26. Diseño experimental para el aislamiento y establecimiento de cultivos de células mesenquimales uterinas. Esquema del protocolo para el aislamiento y establecimiento de cultivos mesenquimales uterinos.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

TAMOXIFENO

El tamoxifeno ((Z)-4-Hydroxytamoxifen) se adquiere en polvo (Sigma-Aldrich) y se disuelve, para su uso *in vitro*, en etanol absoluto hasta una concentración stock de 1 mM.

Para realizar la abalcción de *Pten* y/o *p53* *in vitro* en células epiteliales de endometrio de hembras de ratones Cre:ER^{T+/+} con los genes *Pten* o *p53* flanqueados por secuencias *loxP*, una vez aisladas las células y en el momento de plantarlas en dos dimensiones se añaden 0,5 μ g/mL de tamoxifeno al medio de cultivo. Al día siguiente, se puede proceder normalmente, sin añadir tamoxifeno, para llevar a cabo el cultivo tridimensional.

MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE LAS GLÁNDULAS CELULARES

En este trabajo, se han establecido cultivos tridimensionales con células epiteliales de endometrio de ratolí. Es posible determinar los diámetros de las glándulas de este tipo de cultivo tridimensional.

En primer lugar, se capturan imágenes de las glándulas con un microscopio estereoscópico (Nikon Eclipse Ts2R), y finalmente, se realiza la medición de los diámetros mediante un software de análisis de imagen (Image J versión 1.46r; NIH, Bethesda, MD). Se cuantificó, al menos, el diámetro de 150 glándulas por cada condición.

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE BRdU

La BrdU es un nucleótido sintético análogo a la timidina que se emplea comúnmente en la detección de células que proliferan. Así, las células pueden incorporar la BrdU, en lugar de la timidina, a las nuevas cadenas de ADN cuando se replican. En este trabajo, se ha hecho el ensayo de BrdU en cultivo en tres dimensiones de células epiteliales endometriales murinas.

Para hacer el ensayo de incorporación de la BrdU, es necesario en primer lugar, añadir la BrdU al medio de cultivo a una concentración final de 4 µg/mL durante 12 horas. Pasado este tiempo, los cultivos en tres dimensiones se fijaron con paraformaldehído (PFA) frío al 4% durante 20 minutos, y a continuación, se hacen tres lavados con PBS. Seguidamente, se desnaturaliza el ADN con HCl 2M durante 30 minutos a 37°C. Este paso permite que el anticuerpo primario pueda reconocer la BrdU. Transcurridos los 30 minutos, se añade Tetraborato Sódico 0,1 M durante 2 minutos para neutralizar el HCl. Posteriormente, el cultivo se limpia 3 veces más con PBS y se añade la solución de bloqueo durante 1 hora. Esta solución de bloqueo contenía un 5% de HS, 5% de FBSi; 0,2% de glicina y 0,1% de Tritón X-100 en PBS. A continuación, se realizan tres lavados más con PBS, y se incuban las células con el anticuerpo primario de ratón anti-BrdU (ref. M0744, dilución 1/100, Dako) durante 18 horas. Finalmente, se retira el anticuerpo primario, se lava con PBS tres veces y se incuba con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor 546 (ref. A11003, dilución 1/500, Life Technologies) y Hoechst 33258 durante 3-4 horas. Transcurrido este tiempo, ya se puede visualizar la tinción de la BrdU mediante un microscopio confocal (Olympus FluoView™1000).

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

CONSIDERACIONES PREVIAS

Para llevar a cabo este trabajo, se han utilizado como animales de experimentación ratones de laboratorio inmunodeprimidos SCID (*severe combined immunodeficiency*) y ratones modificados genéticamente (RMG), alojados los primeros en instalaciones de barrera SPF (*Specific-Pathogen Free*) e instalaciones convencionales los segundos. En estas instalaciones, los ratones se alojan en racks ventilados, que se cambian en cabinas de cambio o seguridad biológica, y en cubetas convencionales, respectivamente. Los ratones se han sometido a procedimientos libres de patógenos en las salas de trabajo y se han mantenido a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $50\pm 5\%$, siguiendo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y con un acceso *ad libitum* de la comida (Tecklad Global 14% Proteína 5% Grasa, Envigo) y el agua.

Los métodos experimentales utilizados con los animales de laboratorio que se detallan a continuación se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- Ley 5/1995, del 21 de junio, de la Generalitat de Catalunya, de protección de los animales utilizados para la experimentación y para otras finalidades científicas.
- Decreto 214/1997, del 30 de julio, de la Generalitat de Catalunya, por el cual se regula la utilización de animales para la experimentación y para fines científicos.
- Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación u otros fines científicos incluyendo la docencia.
- En el marco de la legislación europea, la Directiva 63/2012/UE, que deroga a la Directiva 86/609/CEE, del 22 de septiembre del Consejo de Europa sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales u otros fines científicos.

Finalmente, todos los procedimientos con ratones se han realizado bajo la supervisión del personal científico responsable y de los técnicos especialistas correspondientes en nuestra institución, y siempre respetando todas las directrices legales y éticas vigentes. Además, el estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Lleida.

CEPAS EMPLEADAS

RATONES CAG-CRE:ER^T

Los ratones transgénicos *CAG-Cre:ER^T* (de aquí en adelante *Cre:ER^T*) (B6.CG-Tg(CAG-cre/Esr1)5Amc/J) fueron generados en el laboratorio del Dr. Andrew P. McMahon mediante la técnica de inyección pronuclear, en la que el material genético se inyecta en el pronúcleo de un ovocito fecundado (*Hayashi and McMahon, 2002*). Nuestro laboratorio adquirió los ratones *Cre:ER^T* a través de la empresa The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Estos ratones transgénicos expresan la recombinasa Cre inducible por Tamoxifeno bajo el control del promotor de la CAG acoplado al promotor del citomegalovirus (CMV). EL transgen contiene la proteína de fusión formada por la CRE y una forma mutante del dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos murino que solo permite la unión con el Tamoxifeno (ER^T) y, por ende, impide la unión con estrógenos endógenos. La proteína de fusión *Cre:ER^T* se mantiene en el citoplasma con o sin estímulos estrogénicos, pero en presencia de Tamoxifeno, puede translocarse al compartimento nuclear y actuar como recombinasa sobre las secuencias *loxP*. (Figura 14)

Esta colonia se mantiene en heterocigosis, y los animales *Cre:ER^{T+/-}* son viables, fértiles presentan una medida normal, y además, no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento.

RATONES *PTEN FLOXED* (PTEN^{F/F})

Los ratones *Pten^{ff}* (C;129S4-Pten^{tm1Hwu}/J) fueron generados por el Dr. Hong Wu mediante la técnica de electroporación de células madre embrionarias (ESC) y la posterior inyección en blastocistos que fueron transferidos posteriormente a hembras pseudo-preñadas (*Lesche et al., 2002*). Nuestro laboratorio los adquirió a través de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Estos ratones presentan secuencias *loxP* flanqueando el exón 5 de *Pten*, que codifica para el dominio fosfatasa de la proteína. Es importante remarcar que el cruce de estos ratones con una cepa que expresa cualquier tipo de recombinación Cre dará lugar a la pérdida del exón 5, y como consecuencia, a la ausencia de la proteína PTEN. Además, su uso permite la escisión del exón de *Pten* flanqueado en diferentes tejidos o momentos del desarrollo en función de las recombinasa que se empleen para ello.

Esta colonia de ratones se mantiene en homocigosis y los ratones *Pten^{ff}* son viables, fértiles, presentan una media normal, y además, no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento. Si no se cruzan con ninguna cepa recombinasa, presentan niveles normales de PTEN.

RATONES CAG-CRE:ER^T PTEN^{F/F}

Los ratones *CAG-Cre:ER^T Pten^{ff}* (en adelante, *Cre:ER^T PTEN^{ff}*) fueron generados en 2013 por la Dra. Cristina Mirantes (Mirantes et al., 2013a) a partir del cruce de ratones *Cre:ER^{T+/-}* y *Pten^{ff}*, en un fondo genético mixto.

Para inducir la eliminación de *Pten*, los ratones *Cre:ER^T PTEN^{ff}* recibieron una única inyección de 0,5 mg de Tamoxifeno entre las 4-5 semanas de vida. Entre las 6-8 semanas posteriores, los ratones desarrollaron EIN, hgPIN e hiperplasia de tiroides, como consecuencia de la pérdida de PTEN.

RATONES P53 FLOXED (P53^{F/F})

Los ratones *p53^{ff}* (FVB.129P2-*Trp53^{tm1Brn}*/Nci) fueron generados por el Dr. Anton Berns mediante la técnica de electroporación de células madre embrionarias (ESC) 129/Ola y la posterior inyección en blastocistos que más tarde fueron transferidos a hembras pseudo-preñadas (Jonkers et al., 2001). La cepa fue adquirida por nuestro laboratorio a través de una cesión del laboratorio del Dr. Alvaro Aytés.

Estos ratones presentan secuencias *loxP* flanqueando por un lado el intrón 1 y por el otro el intrón 10 del locus *p53*. Es importante remarcar que el cruce de estos ratones con una cepa que expresa cualquier tipo de recombinación *Cre* dará lugar a la pérdida total de la proteína *p53*. Además, su uso permite la escisión del locus *p53* flanqueado en diferentes tejidos o momentos del desarrollo en función de las recombinasa que se empleen para ello.

Esta colonia de ratones se mantiene en homocigosis y los ratones *p53^{ff}* son viables, fértiles, presentan una media normal, y además, no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento. Si no se cruzan con ninguna cepa recombinasa, presentan niveles normales de *p53*. Los ratones homocigotos fueron monitorizados durante un año sin que aumentara la incidencia de tumores respecto a los controles de tipo salvaje.

RATONES MT/MG

El uso de ratones reporteros permite detectar la actividad recombinasa, de forma que se puede caracterizar tanto a nivel temporal como tisular. Este tipo de animales, expresan un gen marcador (*lacZ*, proteínas fluorescentes, etc) en aquellas células que sufren recombinación. A pesar de la gran utilidad de estos modelos, en algunos estudios es interesante detectar tanto las células en las cuales hay recombinación como en las que no y, para ello se utilizar los animales doble reportero.

En el presente estudio, se utilizan ratones *tdTomato (mT)/EGFP (mG)* (*Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)}Luo/J*), a partir de ahora *mT/mG* los cuales expresan de manera constitutiva fluorescencia roja en la membrana de todas sus células. Cuando la CRE provoca la recombinación del DNA, las

células afectadas pierden dicha fluorescencia y comienzan a mostrar fluorescencia verde (Figura 27).

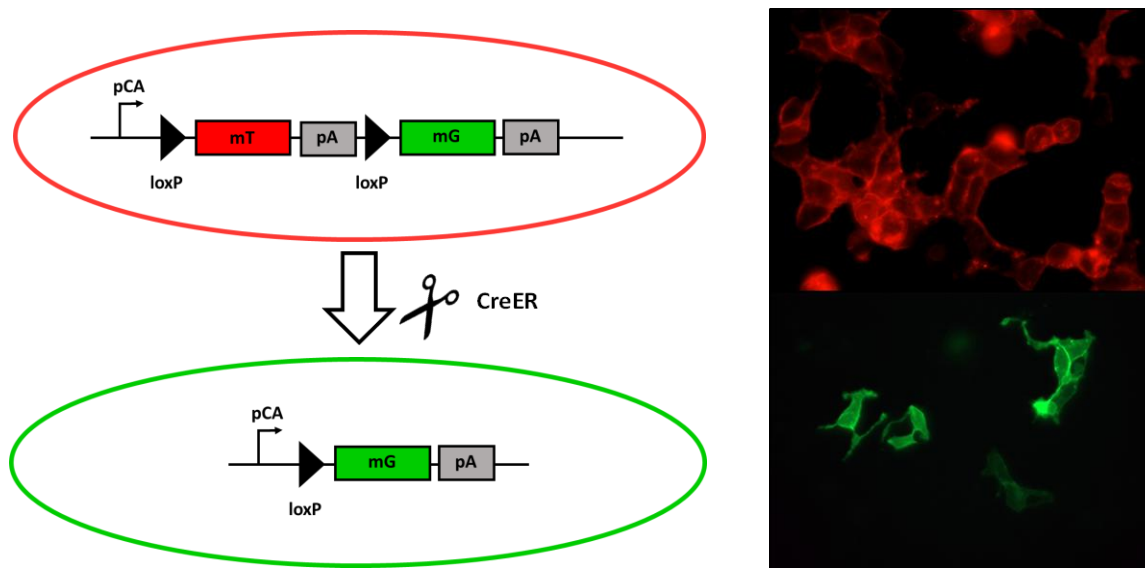


Figura 27: Sistema reportero mT/mG. A la derecha células HEK293T que expresan el plásmido mT/mG. pCA; promotor formado por potenciador de Citomegalovirus y el promotor de la β -Actina de gallina. mT; gen codificante para la tdTomato con localización membranaria, mG; gen codificante para la EGFP con localización membranaria pA; señal de poliadenilación de SV40.

El ratón mT/mG (Muzumdar *et al.*, 2007) fue generado por el Laboratorio del Dr. Liquin Luo y adquirido a través de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). El primer paso fue el diseño de un cassette de expresión en el cual se insertó la proteína tdTomato (mT) y una cola de poliadenilación (pA) flanqueadas por secuencias *loxP*. A continuación, se introdujo la proteína fluorescente EGFP (mG) seguida de una cola pA para su estabilización. Tanto la proteína mT como mG fueron modificadas para localizarse en la membrana celular. Una vez obtenida la construcción, se introdujo en el locus *ROSA26* del cromosoma 6 en células madre embrionarias. Por último, estas células se inyectaron en blastocistos que fueron transferidos a hebras pseudo-preñadas. La elección del locus *ROSA26* como lugar de inserción está justificada por el hecho de ser un locus expresado endógenamente de forma ubicua, el cual permite evitar el silenciamiento del inserto por la estructura de la cromatina (Soriano, 1999). El resultado son animales que expresan mT en todas sus células de forma constitutiva y mG exclusivamente en aquellas que han sufrido recombinación o que derivan de células recombinadas.

Los ratones mT/mG se mantienen en homocigosis (mT^{ff}/mG), son fértiles y no presentan ninguna alteración. Los picos de excitación de mT y mG se producen a 568 y 488 nm, mientras que la emisión máxima es a 581 y 507 nm, respectivamente.

RATONES SCID (SERVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY)

Los ratones SCID presentan una mutación genética autosómica recesiva denominada como $Prkdc^{scid}$, que se localiza en el cromosoma 16, y que impide la correcta recombinación V(D)J. De esta manera, los ratones, que son homocigóticos para la mutación, no son capaces de generar linfocitos funcionales y desarrollan una inmunodeficiencia combinada grave que afecta tanto a los linfocitos B como a los T. A nivel funcional, esta mutación provoca que el sistema inmunológico no madure y estos ratones no puedan combatir infecciones ni combatir tumores o trasplantes. Por lo tanto, son un modelo animal muy útil para el estudio de tumores subcutáneos o xenoinjertos. Nuestro laboratorio adquirió los ratones SCID a través de la compañía The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

SEXADO Y GENOTIPADO

Los ratones se destetan, sexan a las 3 semanas de vida, momento en que se procede a su genotipado. Para ello, los ratones son anestesiados con isoflurano al 2% por vía inhalatoria, se marcan con un código de cortes en las orejas y se obtiene una biopsia de la cola, inferior a 5 mm de longitud.

A continuación, las colas se digieren en un tampón de genotipado (25 mM NaOH (SIGMA) y 0.25 mM EDTA (PANREAC) en H₂O). La digestión se realiza durante aproximadamente 2 horas a 37°C y con una agitación de 750-800 rpm. A continuación, se inactiva el NaOH con 5 µL/200 µL de TRIS 1M (FISHER) a pH 5.5.

Una vez digeridas las colas cortadas, se puede proceder a realizar la PCR (*polymerase chain reaction*) correspondiente al genotipo esperado en cada animal. Finalmente, los productos de PCR se analizan mediante separación electroforética en gel de agarosa (FISHER) y las bandas se visualizan por tinción con MIDORI Green Advance DNA Strain (CULTEK).

| Gen | Secuencia de los primers usados | Programa de PCR | | | Bandas obtenidas | | |
|---------------------|---------------------------------|---|---------|--------|------------------|--|----------------------------------|
| | | T (°C) | Tiempos | Ciclos | Genotipo | Medida | |
| Cre:ER ^T | Fwd Rev | ACG AAC CTG GTC GAA ATC GT GCG CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG | 94 °C | 2' | 1 | Cre:ER ^{T/-} Cre:ER ^{T+/-} | no banda 350 bp |
| | | | 94 °C | 45'' | 32 | | |
| | | | 65 °C | 45'' | | | |
| | | | 72 °C | 45'' | | | |
| | | | 72 °C | 5' | 1 | | |
| Pten floxed | Fwd Rev | CAA GCA CTC TGC GAA CTG AG AAG TTT TTG AAG GCA AGA TGC | 94 °C | 3' | 1 | PTEN ^{+/+} PTEN ^{f/+} PTEN ^{f/f} | 156 bp 156 y 328 bp 328 bp |
| | | | 94 °C | 30'' | 35 | | |
| | | | 60 °C | 1' | | | |
| | | | 72 °C | 2' | | | |
| | | | 72 °C | 2' | 1 | | |
| p53 | WT Rev | CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC | 94 °C | 3' | 1 | P53 ^{+/+} P53 ^{f/+} P53 ^{f/f} | 288 bp 288 y 370 bp 370 bp |
| | | | 94 °C | 30'' | 35 | | |
| | | | 59 °C | 1' | | | |
| | | | 72 °C | 1' | | | |
| | | | 72 °C | 3' | 1 | | |
| mT/mG | Común WT Mutante | CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA TCA ATG GGC GGG GGT CGT T | 94 °C | 2' | 1 | mT/mG ^{+/+} mT/mG ^{f/+} mT/mG ^{f/f} | 330 bp 250y 330 bp 250 bp |
| | | | 94 °C | 30'' | 35 | | |
| | | | 57 °C | 1' | | | |
| | | | 72 °C | 1' | | | |
| | | | 72 °C | 2' | 1 | | |

Tabla 12: Genotipado de los ratones emprendidos en este trabajo. Se especifica la secuencia de los cebadores (primers), el programa de PCR y la medida de las bandas para discriminar entre los diferentes genotipos posibles. Fwd; primer *forward*. Rev; primer *reverse*. WT; salvaje (*wild-type*).

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*: TAMOXIFENO

La sal de citrato de tamoxifeno (*tamoxifen citrate salt*) se adquiere en polvo (Sigma-Aldrich) y se disuelve, para su uso *in vivo*, en etanol absoluto hasta una concentración de 10 mg/mL, y en aceite de maíz (corn oil, Sigma-Aldrich) hasta llegar a la concentración final de 5 mg/mL. Es importante calentar la preparación a 37°C y vortear bien para la correcta disolución de la sal.

En este estudio, para inducir la activación de la recombinasa Cre:ER^T y la consecuente delección de *Pten* y/o *p53*, se les administra el tamoxifeno por dos vías y en dos dosis diferentes según el experimento. Por un lado, las ratonas reciben una inyección intraperitoneal de 0.5 mg de Tamoxifeno a las 4-5 semanas de edad. Para asegurarse la fiabilidad de los resultados obtenidos, y que la inducción de la Cre:ER^T se debe exclusivamente a la estimulación por el fármaco y no a los efectos de los estrógenos endógenos, en todos los experimentos se incluyen un grupo de animales que se inyecta únicamente con aceite de maíz como control, ya que este es el diluyente empleado durante la preparación de la droga. Como control de que los tumores obtenidos no son debidos al

propio tamoxifeno (Emons *et al.*, 2020), en todos los experimentos se incluyen un grupo de animales Cre:ER^{T-/-}, es decir, que no expresan la recombinasa Cre, que reciben la dosis correspondiente de Tamoxifeno. Por otro lado, a otro grupo de ratones se les inoculó vía intravaginal 0.1 mg de Tamoxifeno por ratona. En este caso, la droga se encontraba a 5mg/mL pero en alcohol absoluto.

ESTABLECIMIENTO DE TUMORES SUBCUTÁNEOS EN RATONES SCID A PARTIR DE CÉLULAS AISLADAS DE ÚTEROS MURINOS

En primer lugar, se procede a la ablación génica de los ratones experimentales (con los genotipos de interés) mediante la administración *in vivo* intraperitoneal de tamoxifeno. Una vez aisladas y cultivadas las células epiteliales endometriales y las células mesenquimales uterinas siguiendo el protocolo descrito con anterioridad en el apartado “Aislamiento de células epiteliales y mesenquimales de útero de ratón y establecimiento de cultivos tridimensionales de las células epiteliales endometriales”, al día siguiente se procede al injerto de estas células de nuevo en ratones.

Para el establecimiento de estos xenoinjertos *in vivo*, como se muestra en la figura 28, se utilizaron hembras SCID de entre 8-12 semanas de edad y con un peso de entre 20-25 gramos. Se inyectan por vía subcutánea, a cada flanco del ratón, una mezcla 1:1 de las células epiteliales endometriales provenientes de una rama uterina del ratón con genotipo de interés junto con las mesenquimales de un ratón C57BLACK/6J, para así asegurarse que únicamente las células epiteliales han sufrido modificaciones génicas. Las células se resuspenden en medio DMEM/F12 suplementado con 1 mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B, al 2% de DCC y 20% de Matrigel®. El volumen total inyectado en cada flanco es de 100 µL.

El crecimiento tumoral fue monitorizado cada 2 semanas con un pie de rey digital y el volumen tumoral se calcula de acuerdo a la fórmula: TV (*tumor volume*) = $(D \times d^2)/2$, donde D corresponde al diámetro grande del tumor y d, al pequeño. Los ratones se sacrifican por dislocación cervical una vez los tumores alcanzan un tamaño superior a 1 cm³. Los tumores se colectan para su análisis macroscópico e inmunohistológico.

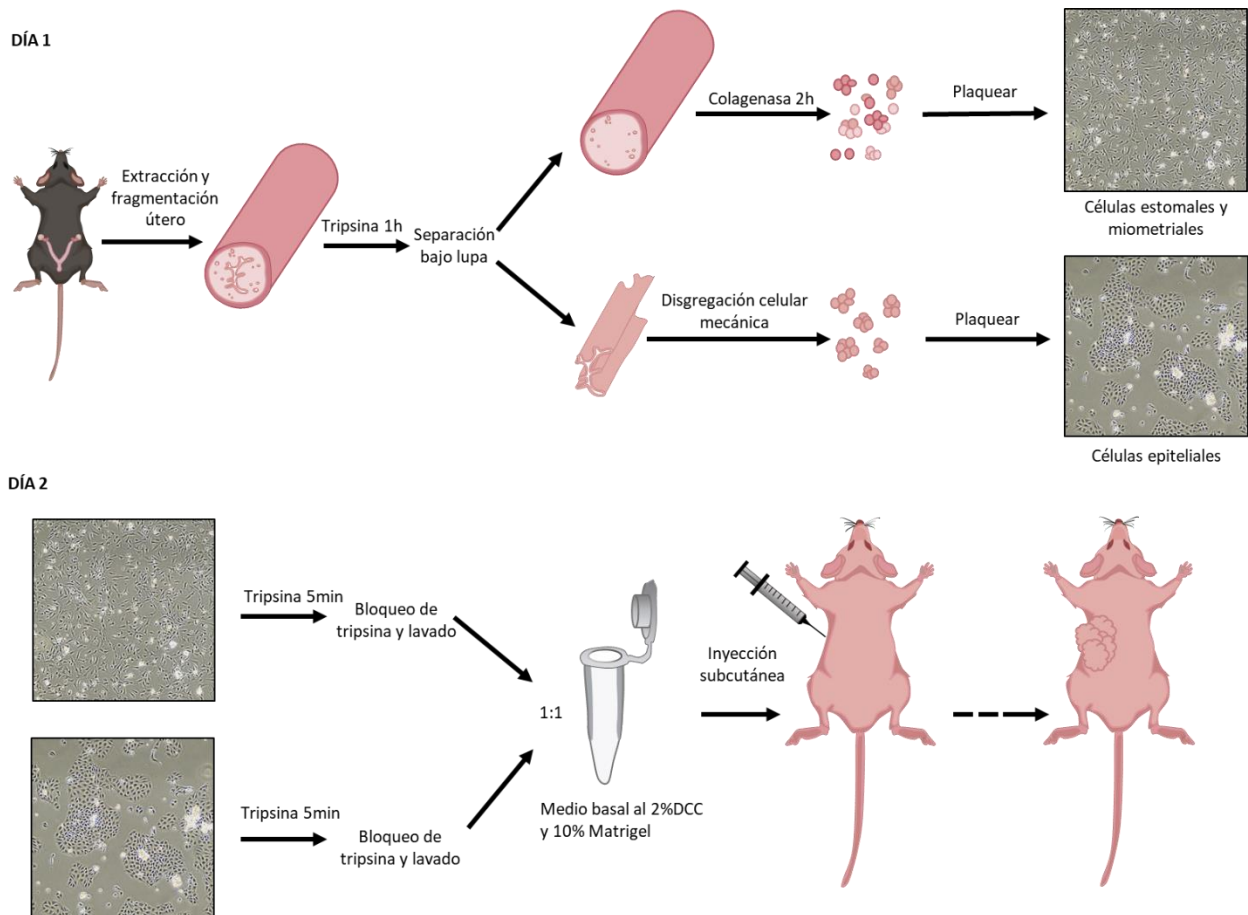


Figura 28. Diseño experimental la generación de xenógrafos subcutáneos de células uterinas. Esquema para el aislamiento y establecimiento de cultivos de células epiteliales endometriales y células mesenquimales uterinas. Esquema del protocolo para el aislamiento y establecimiento de cultivos de estas células uterinas (DÍA 1). Protocolo para la inyección subcutánea de las células uterinas en ratones SCID (DÍA 2).

OVARIECTOMÍAS

Para inducir la falta de estrógenos en las ratonas y así mimetizar un ambiente uterino similar a un estado postmenopáusico, se realizaron ovariectomías en ratonas antes y después de la inducción de la delección de *p53* con Tamoxifeno.

Las ovariectomías a ratonas vivas se realizan mediante cirugía donde las ratonas son anestesiadas con isoflurano al 2% por vía inhalatoria. Para la operación, se realiza una incisión en la línea media del ratón, colocado hacia arriba. En todos los animales, se entra en la cavidad abdominal mediante una punción roma a través de la pared abdominal y se extrae el ovario (y la almohadilla de grasa adjunta) individualmente de la cavidad abdominal. Se cauteriza la trompa de Falopio y se disecciona el ovario. Salvo la almohadilla de grasa y el ovario, el resto de tejidos se devuelven a la cavidad abdominal, y el proceso se repite en el lado opuesto. La incisión de la piel se cierra con una grapadora para heridas especial para ratones (AutoClip® System 12020-09, FST).

ESTABLECIMIENTO DE XENOTRASPLANTES SUBCUTÁNEOS EN RATONES SCID DE EXPLANTES UTERINOS

Para la realización de los xenotrasplantes subcutáneos de explantes uterinos, como se observa en la figura 29, se llevaron a cabo dos estrategias en las que variaba el momento de ablación génica en las células epiteliales del endometrio. En la primera de ellas, se administraba intraperitonealmente (i.p.) tamoxifeno a los ratones Cre:ER^{T+/-} que presentaban los genes de interés flanqueados por secuencias *loxP*. Transcurridas 2 semanas desde el momento de la ablación génica se procede al disecado de las ramas uterinas. Se limpia el cuerno uterino eliminando la membrana mesometrial (junto con la grasa y los vasos sanguíneos) y cortando por el corpus uterino y las trompas de Falopio, eliminando así el cérvix y los ovarios. Una vez limpias, las ramas uterinas son limpiadas con PBS. A continuación, son mantenidas en hielo y embebidas en HBSS hasta el momento de la introducción de manera subcutánea en ratones hembra SCID. Para la otra técnica empleada para la ablación génica se siguió el mismo protocolo de extirpación de las ramas uterinas, pero la administración i.p. de Tamoxifeno fue realizada en las ratonas una semana después del establecimiento del xenotrasplante.

Para la introducción del explantes uterino en los ratones SCIDs, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2% por vía inhalatoria, una vez dormidos, se realiza un pequeño corte en la dermis de la región lumbar y se introduce con cuidado el explante sujetado con unas pinzas de borde romo en dirección hacia la región cervical. La incisión de la piel se cierra con una grapadora para heridas especial para ratones (AutoClip® System 12020-09, FST).

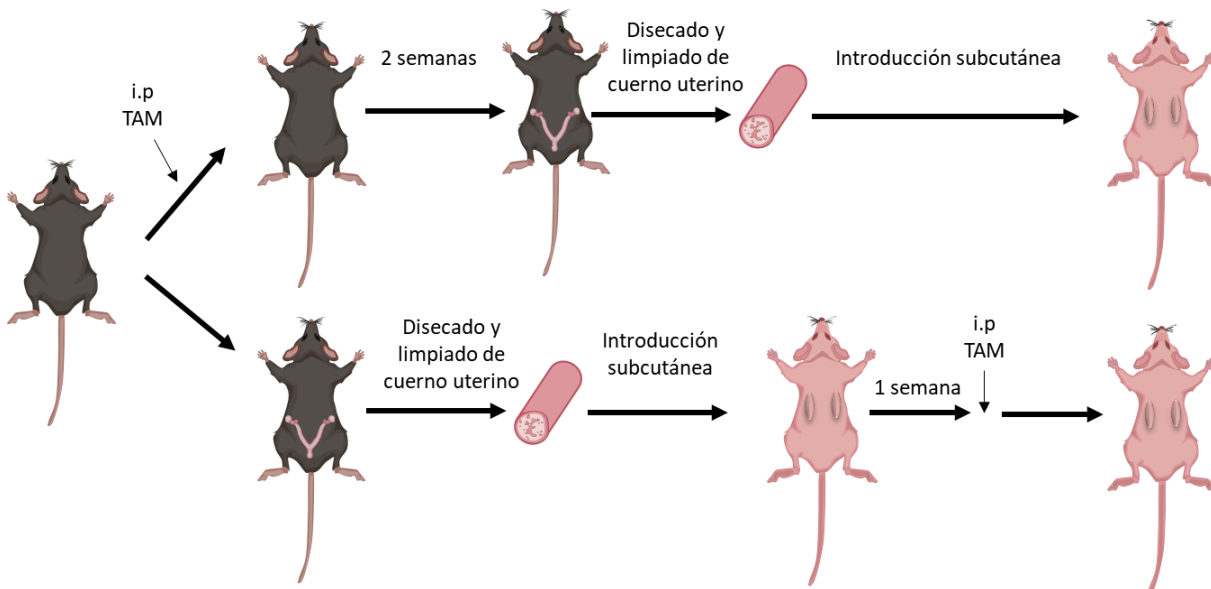


Figura 29. Esquema ilustrativo para la generación de xenotrasplantes de explantes uterinos. i.p.; inyección intraperitoneal, TAM; Tamoxifeno

PROTEÍNA RECOMBINANTE TAT-CRE

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTES TAT-CRE

Para la construcción de la proteína recombinante TAT-Cre, se empleó el vector LIC (clonación independiente de la ligación, del inglés *ligation independent cloning*), denominado pLATE11, mediante el sistema de clonación y expresión aLICator (figura 30) que estuviera conformado por la secuencia codificante para la proteína de fusión.

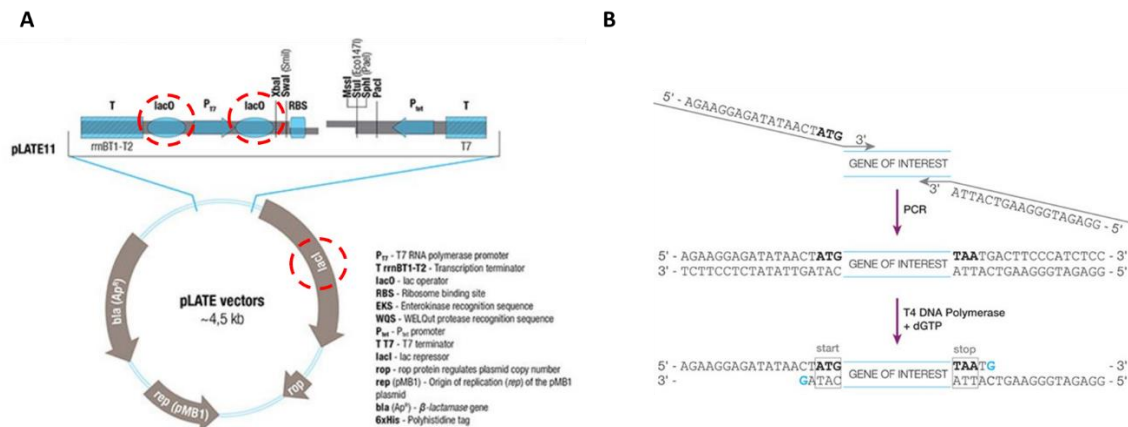


Figura 30. Esquema de los componentes sistema de clonación y expresión aLICator. (A) Componentes del vector pLATE11. **(B)** Generación de extremos pegajosos en el gen de interés con el ADN polimerasa T4 y dGTP.

En primer lugar, como se muestra en la figura 31, siguiendo un protocolo de PCR seriadas (Tabla 13), un fragmento de PCR con extremos como que codificara de 5' a 3' una etiqueta de polihistidinas (6xHis), el péptido de penetración celular TAT, una secuencia codificante para un dominio de localización nuclear (NLS) y la proteína recombinasa Cre todo ello flanqueado por secuencias homólogas a la región de inserción del fragmento de interés en el plásmido pLATE11. Para que el fragmento resultante quedara con extremos cohesivos y así pudiera clonarse de manera correcta en el vector, el fragmento obtenido de la serie de PCRs se digiere con dos enzimas de restricción que tienen como secuencia diana los extremos de este fragmento. En este caso la digestión enzimática del fragmento se realizó con BamHI (Thermo) y NcoI (Takara) durante 2 horas a 37°C.

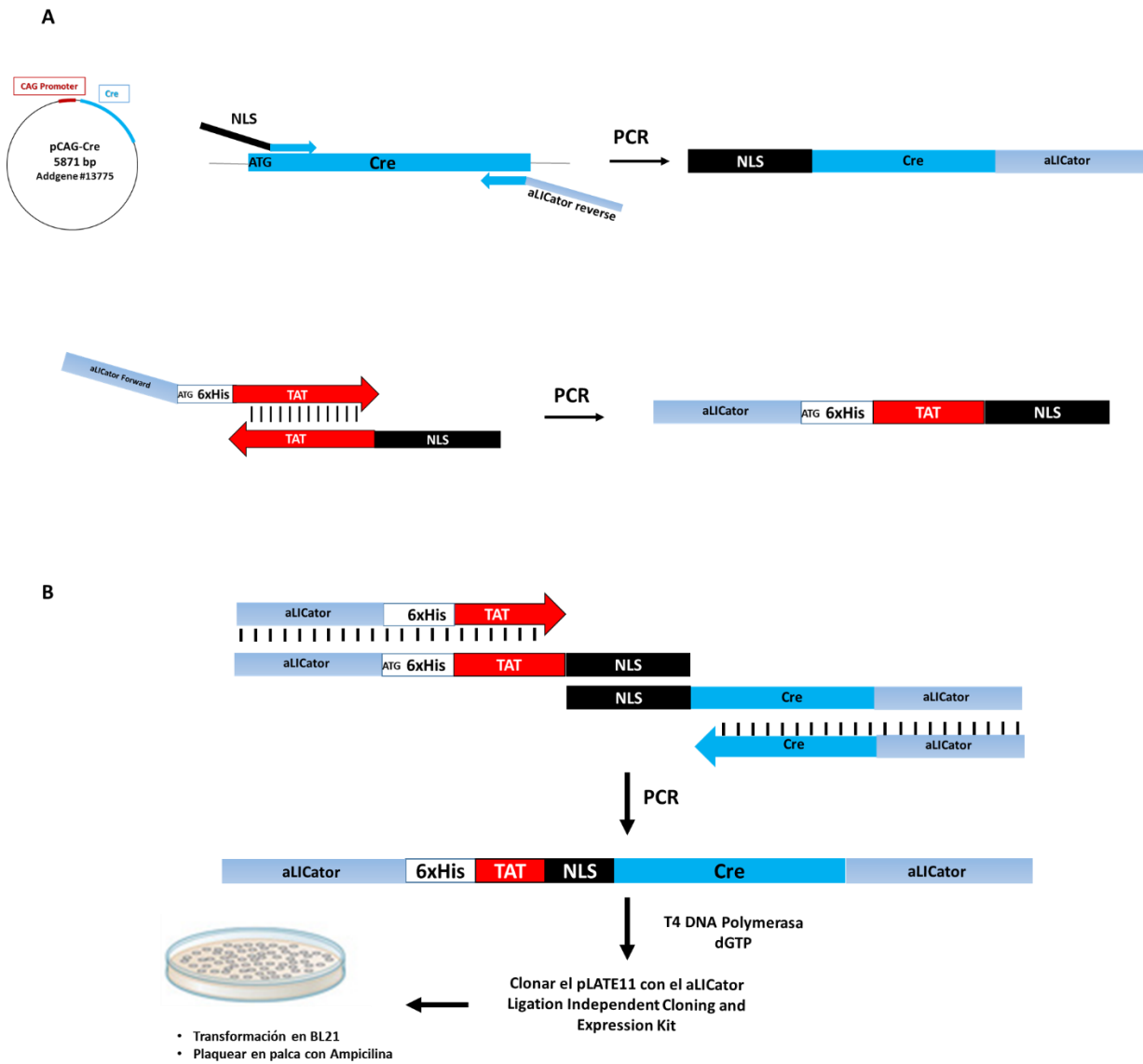


Figura 31. Esquema representativo de la clonación en bacterias competentes para la expresión de la proteína recombinante TAT-Cre. (A) Ilustración de las PCRs realizadas para la generación del inserto a clonar en el plásmido pLATE11. Arriba PCR realizada para generar el fragmento NLS-Cre-aLICator a partir del plásmido pCAG-Cre. Abajo, PCR realizada para la generación del fragmento aLICator-ATG-6xHis-TAT-NLS. **(B)** Esquema de la PCR empleando los como cebadores los fragmentos obtenidos en las PCRs del apartado A. Se puede observar el procesamiento del inserto resultante con la T4 DNA Polimerasa (+dGTP) antes del clonaje con el Kit *aLICator Ligation Independent Cloning and expression* y transformación en *E. coli* BL21 (DE3). 6xHis; etiqueta de poli-histidinas, TAT; péptido de penetración celular TAT (*transactivator of transcription*), NLS; una secuencia codificante para un dominio de localización nuclear.

A continuación, se procedió a la clonación del fragmento digerido usando el sistema de clonación LIC aLICator. Este sistema utiliza la tecnología de clonación LIC direccional para agilizar y facilitar la clonación en un vector de expresión. El método LIC utiliza la ADN polimerasa T4 para crear extremos cohesivos específicos de 14-21 nucleótidos de una sola hebra en el vector pLATE y en los insertos de ADN (2). La ADN polimerasa T4 tiene dos actividades enzimáticas: la actividad polimerasa 5'-3' y la actividad exonucleasa 3'-5'. La actividad exonucleasa elimina los nucleótidos de los extremos 3' del ADN mientras que la actividad polimerasa, usando la cadena de ADN complementaria como

plantilla, restablece la cadena utilizando dNTPs. En el protocolo LIC, sólo se incluye el dGTP, lo que hace que la exonucleasa 3'-5' y la polimerasa 5'-3' se equilibren en la primera aparición de citosina en la cadena complementaria (Figura 30). Tras el anillamiento, el vector LIC y el inserto se transforman en células *E. coli* BL21 (DE3) competentes (MERCK) con el Kit *aLICator Ligation Independent Cloning and expression* (Thermo). La formación de enlaces covalentes en las uniones vector-inserto se produce dentro de la célula para dar lugar a un plásmido circular. Las bacterias se plaquean en placas de con medio LB Broth con agar (Condalab) suplementadas con 2µM de ampicilina (SIGMA) y se dejan crecer a 37°C durante toda la noche.

| Fragmento | Molde | Secuencia de los primers usados | Programa de PCR | | |
|---|-------------------------------|---|-----------------|---------|--------|
| | | | T (°C) | Tiempos | Ciclos |
| NLS-Cre-aLICator | pCAG-Cre Addgene #13775 | Fwd TGC AGG CAC TAG TGT AAG CTT GAA GAA GAA GAG GAA GGT GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA | 95 °C | 2' | 1 |
| | | | 95 °C | 30'' | |
| | | | 55 °C | 30'' | |
| | | Rev AGG CCG GAT CCT TAT TAA TCG CCA TCT TCC AGC AGG CGC ACC A | 72 °C | 3' | 1 |
| | | | 72 °C | 5' | |
| | | | 4 °C | ∞ | |
| aLICator-ATG-6xHis-TAT-NLS | No | Fwd TAT ACC ATG GGC CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGC ATG GGC GCT GCA GGT CGC AAG AAA CGT | 95 °C | 2' | 1 |
| | | | 95 °C | 10'' | |
| | | | 55 °C | 20'' | |
| | | Rev CAC CTT CTT CTT CTT CTT CAA GCT TAC ACT CGT GCC TGC AGG CGG ACG GCG ACG TTG GCG AC | 72 °C | 30'' | 1 |
| | | | 72 °C | 5' | |
| | | | 4 °C | ∞ | |
| aLICator-ATG-6xHis-TAT-NLS-Cre-aLICator | No | Fwd Fragmento NLS-Cre-aLICator | 94 °C | 3' | 1 |
| | | | 94 °C | 30'' | |
| | | | 59 °C | 30'' | |
| | | Rev aLICator-ATG-6xHis-TAT-NLS | 72 °C | 3' 30'' | 1 |
| | | | 72 °C | 10' | |
| | | | 4 °C | ∞ | |

Tabla 13: Protocolo de PCR para la generación del inserto TAT-Cre. Se especifica la secuencia de los cebadores (primers), el programa de PCR. Fwd; primer *forward*. Rev; primer *reverse*.

Al día siguiente, se pica una colonia de la placa sembrada y se crecen en un pre-cultivo de 10 mL de Medio LB suplementado, se deja crecer durante 16h a 37°C. A continuación, se añade 1L de Medio LB *Overnight Express™ Instant* (Novagen) y se crece a 30°C y agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, se centrifuga el cultivo a 8000 g y se procede a su lisado (10 mL de buffer de lisis cada 250 mL de cultivo). El buffer de lisis está compuesto por 50 mM de base de Tris (FISHER) a pH7.5, 1 M NaCl (Merck), 10% de glicerol, 0,1% de Tritón-X (Sigma-Aldrich) y 20mm de Imidazol (SIGMA), una tableta cComplete™ Cóctel de Inhibidores de Proteasas (Roche)/100 mL de buffer de

lisis, 5mM β -Mercaptoetanol (Bio-Rad), 1 mg/mL de lisozima (Roche). Una vez añadido el buffer de lisis se deja reposar el lisado durante 30 minutos en hielo. Seguidamente se sonicán las muestras a una amplitud del 20% durante 1 minuto (intervalos de 20 segundos manteniendo el lisado en hielo).

El lisado se limpió mediante centrifugación a 15000g durante 45 minutos a 4°C antes de comenzar la purificación con resina de cobalto HisPur™ (Thermo) la cual presenta afinidad a la poli-histidina. Antes de poner el lisado con la resina, ésta ha de estar previamente equilibrada con el mismo buffer de lisis que se usó para lisar las bacterias (centrifugaciones y lavados con el buffer). Una vez se añade la resina al lisado, se deja la muestra durante 1 hora en un agitado rotativo orbital a 4 grados. Una vez transcurrido este tiempo, se procede al lavado de la resina de nuevo con buffer de lisis (x3). Después de lavar la resina (que se encontrará unida a la proteína recombinante), se añade a la muestra de nuevo buffer de lisis, pero esta vez suplementado con 300 mM de imidazol. Esta mezcla se deja reposar durante 30 minutos en hielo. En el sobrenadante se encuentra diluida la TAT-Cre.

Para proceder a la concentración de la proteína recombinante se añade el sobrenadante en una *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit* y se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El eluido es descartado. En el volumen que queda sin pasar por el *Amicon®* estará la TAT-Cre concentrada. Este volumen se diluye 1:1 en PBS suplementado con 20mM HEPES, pH 7.4, 50% glicerol y 500 mM NaCl. Como la mezcla tiene un 25% de glicerol se puede almacenar a -20°C.

Del volumen resultante se procedió a la cuantificación con el espectrofotómetro NanoDrop™ donde obtuvimos una concentración de la TAT-Cre de 17.6 mg/mL.

Para comprobar que realmente habíamos purificado la proteína TAT-Cre, se cargaron muestras del lisado de bacterias crecidas con y sin el medio de sobreexpresión, el volumen eluido y 3.2 μ g de la TAT-Cre concentrada en un gel desnaturalizante del 10% de poliacrilamida, donde pudimos ver que habíamos purificado una proteína de entre 55kDa y 36kDa (Figura 32).

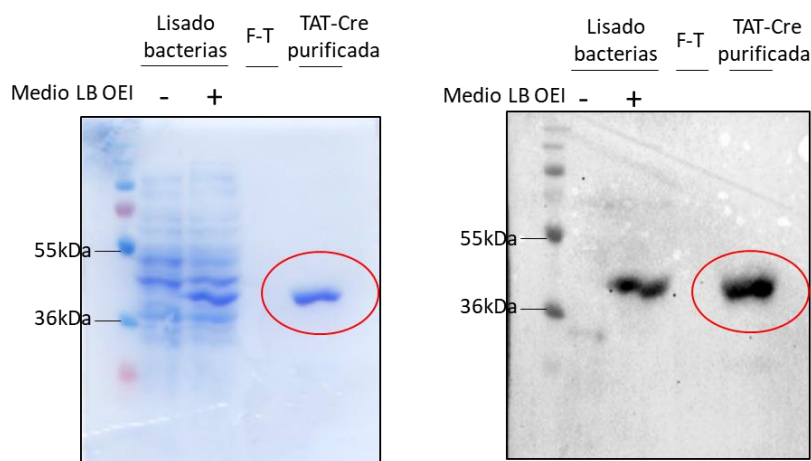


Figura 32. Gel del 10% de poliacrilamida para comprobar la purificación de la TAT-Cre. Imágenes del gel teñido con azul de Coomassie (izquierda) y tras la inmunodetección contra la etiqueta de poli-histidinas. F-T; volumen eluido del *Amicon*[®] (del inglés flow-through), Medio LB OEI; Medio Lysogeny Broth *Overnight Express™ Instant*. kDa; kilodaltons. Marcadores de proteínas BenchMark™ (THERMO).

La proteína TAT-Cre tenía una masa molecular isotópica promedia de 42735.9336 kDa y un punto isoeléctrico de 10.26. La secuencia aminoacídica aceptada para la proteína obtenida fue la que se muestra a continuación, con lo que producimos y purificamos de manera satisfactoria la proteína recombinante.

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| MGHHHHHGM | GAAGRKKRRQ | RRRPPAGTSV | SLKKKKKVS | LLTVHQNLPA | LPVDATSDEV | 60 |
| RKNLMDMFRD | RQAFSEHTWK | MLLSVCRSWA | AWCKLNNRKY | FPAEPEDVRD | YLLYLQARGL | 120 |
| AVKTIQQHLG | QLNMLHRRSG | LPRPSDSNAV | SLVMRRIRKE | NVDAGERAKQ | ALAFERTDFD | 180 |
| QVRSLMENS | RCQDIRNLAF | LGIAYNTLLR | IAEIARIRVK | DISRTDGGRM | LIHIGRTKTL | 240 |
| VSTAGVEKAL | SLGVTKLVER | WISVSGVADD | PNNYLFRCRVR | KNGVAAPSAT | SQLSTRALEG | 300 |
| IFEATHRLIY | GAKDDSGQRY | LAWSGHSARV | GAARDMARAG | VSIPEIMQAG | GWTNVNIVMN | 360 |
| YIRNLDSETG | AMVRLLEDGD | | | | | 380 |

ENSAYO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD RECOMBINASA DE LA TAT-CRE

Para comprobar que la proteína recombinante purificada tiene la actividad enzimática como ha de ser, se lleva a cabo un ensayo *in vitro* de la actividad recombinasa de la proteína recombinante química TAT-Cre.

Para realizar este ensayo, se añade en 10µL de medio de suero reducido Opti-MEM™ (GIBCO) o 0.5U de la TAT-Cre recombinante comercial (Millipore), o 0.1 µg o 0.2 µg de la TAT-Cre casera. A continuación, se añaden 2 µg del plásmido pCA-mTmG (#26123, Addgene) y se incuba a 37°C durante 1 hora.

Finalmente, las digestiones se resuelven en un gel del 1% de agarosa, se usa el total del volumen post-incubación junto con 5µL Orangina (10mM EDTA 0.5M pH6.8, 10mM TRIS, 30% glicerol, Orange G y enrasar hasta 20mL con H2O mQ). Para la TAT-Cre comercial, el estándar de 100 unidades (U) se define como la cantidad de TAT-CRE (µg) en 1mL de medio de cultivo tisular que se requiere para inducir el 50% de expresión de GFP en un ensayo de línea celular reportera mT/mG HEK293T.

Como control se incubó *in vitro* una condición en la que se añadió únicamente el vector con medio Opti-MEM™.

INCUBACIÓN DE LA TAT-CRE EN CULTIVOS CELULARES

En el presente trabajo se ha procedido a la incubación de diversos tipos celulares (fibroblastos de ratón, cultivos de células epiteliales endometriales en dos y tres dimensiones) la proteína recombinante TAT-Cre. Para ello, una vez las células están adheridas a la placa, o el cultivo 3D está bien formado, se cambia el medio de cultivo por medio de suero reducido Opti-MEM™ (GIBCO) en el que se diluyen las concentraciones de la TAT-Cre pertinentes a cada experimento. Una vez transcurridas 16 horas desde el inicio de la incubación, se procede a retirar la proteína TAT-Cre sustituyendo el medio por el medio fresco correspondiente a cada tipo celular.

ADMINISTRACIÓN UTERINA DE LA PROTEÍNA TAT-CRE

Para generar de manera específica la delección génica en las células uterinas, se procedió a la inyección de la TAT-Cre siguiendo dos estrategias de administración, intrauterina e intravaginal (Figura 33). Así, se realiza la administración de la TAT-Cre mediante cirugía donde las ratonas son anestesiadas con isofluorano al 2% por vía inhalatoria. Para la operación, se realiza una incisión en la línea media del ratón, colocado hacia arriba. En todos los animales, se entra en la cavidad abdominal mediante un corte a través de la pared abdominal. Una vez localizado el endometrio se procede o a la inyección uterina (jeringa Hamilton™ Neuros™) o a la inoculación vaginal (pipeta) de 10 μ L de proteína recombinante a 8,8 μ g/ μ L teñidos con *Fast Green FCF* (SIGMA) por cada rama uterina. El *Fast Green FCF* se emplea para poder visualizar la correcta administración de la TAT-Cre dentro del lumen uterino. La incisión de la piel se cierra con una grapadora para heridas especial para ratones (AutoClip® System 12020-09, FST).

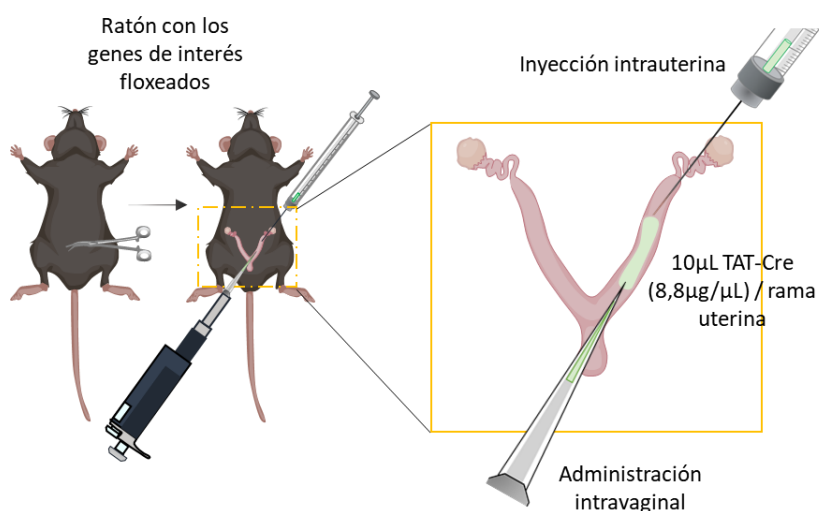


Figura 33. Imagen ilustrativa del protocolo para la administración de la TAT-Cre en el lumen úterino.

HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

HISTOLOGÍA BÁSICA

Una vez sacrificados los animales, se documenta, en los casos existentes, la presencia de alteraciones macroscópicas, y se extraen los órganos de interés, que se fijan inmediatamente con formol durante 16 horas a 4°C. A continuación, se colocan en cassettes de inclusión (Simport), se deshidratan y se incluyen en parafina. Con la finalidad de estudiar la histología de cada tejido, se hacen cortes de los bloques FFPE (del inglés *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) de 5 µm y se tiñen con hematoxilina y eosina (H-E). Dos patólogos revisan y evalúan de manera independiente y a ciegas la histología de cada uno de los tejidos siguiendo criterios preestablecidos.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Después de incluir los tejidos en parafina, puede ser necesario recurrir al análisis inmunohistoquímico de las muestras en caso de que se quieran estudiar marcadores específicos. Así, se realizan cortes de 3 µm de los bloques de parafina y se secan durante una hora a 80°C. A continuación, se realiza un pretratamiento de desparafinación y rehidratación de los tejidos. El siguiente paso consiste en el desenmascaramiento antigénico, que permite recuperar y exponer antígenos enmascarados durante la preparación de la muestra. Así, se incuban los portaobjetos con un tampón comercial, que contiene o Tris/EDTA a pH 9 o ácido cítrico/nonoxinol/bronidox a pH 6, en un módulo de pretratamiento PT-LINK (Dako) durante 20 minutos a 95°C. Para ello, según el anticuerpo a usar se emplea una u otra solución de desenmascaramiento con pH alto o bajo, *EnVision™ FLEX, High pH* o *Low pH* (Dako), respectivamente. A continuación, se bloquea la peroxidasa endógena de la muestra incubando los portaobjetos con una solución de H₂O₂ al 3%. De esta forma se reduce el ruido de fondo que se obtiene con el cromógeno utilizado. Seguidamente, se realizan tres lavados con suero salino y se incuba la muestra con anticuerpo primario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se hacen tres lavados más con suero salino (Dako, DM831) y se incuba la muestra con el anticuerpo secundario. Si la señal es suficientemente fuerte, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa (HRP) y se incuba durante 30 minutos. Por el contrario, en aquellos casos donde sea necesario amplificar la señal, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado a biotina durante 30 minutos, y finalmente, se incuba la muestra 15 minutos más con estreptavidina unida a la peroxidasa, siempre a temperatura ambiente. Para acabar, se aplica el cromógeno diaminobenzimida (DAB, Dako) para rebelar la reacción, y se realiza una contra-tinción con hematoxilina para visualizar los núcleos de las células del tejido analizado. A la tabla 14 se indican los anticuerpos que se han empleado para el análisis inmunohistoquímico.

| Anticuerpo | Dilución | Proveedor | Referencia | EnVision™ FLEX | Anticuerpo secundario |
|--------------------------------|----------|--------------------|-------------|-------------------|--------------------------|
| PTEN | 1:100 | Dako | M3627 | High pH | EV FLEX Kit |
| Ki-67 | 1:50 | Dako | M7249 | Low pH | EV FLEX Kit |
| ERG | RTU | Dako | IR659 | High pH | EV FLEX Kit |
| αER (1D5) | RTU | Dako | IR657 | High pH | EV FLEX Kit |
| E-cadherina | RTU | Dako | IR059 | High pH | EV FLEX Kit |
| TTF1 | RTU | Dako | M3575 | High pH | EV FLEX Kit |
| Citoqueratina 8 | 1:200 | DSHB | AB531826 | High pH | Rata anti-biotina |
| αSMA | RTU | Dako | IR611 | High pH | EV FLEX Kit |
| h-caldesmon | RTU | Dako | GA054 | High pH | EV FLEX Kit |
| Calretinina | RTU | Dako | IR627 | High pH | EV FLEX Kit |
| CD10 | RTU | Dako | GA648 | High pH | EV FLEX Kit |
| Desmina | RTU | Dako | IR606 | High pH | EV FLEX Kit |
| PAX8 | 1:100 | GENOVA | AP10903 | High pH | EV FLEX Kit |
| GFP | 1:100 | Rockland | 600-101-215 | High pH | Cabra anti-biotina |
| p-AKT (Ser473) | 1:50 | Cell signalling | 3787 | High pH | Conejo anti-biotina |
| EnVision FLEX detection kit | RTU | Dako | K8002 | - | - |
| Cabra anti-biotina | 1:200 | Santacruz | SC-2489 | - | - |
| Rata anti-biotina | 1:200 | ABCAM | AB6733 | - | - |
| Conejo anti- biotina | 1:200 | Jackson | 111-065-144 | - | - |
| Estreptavidina- HRP | 1:400 | Dako | P0397 | - | - |

Tabla 14. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la inmunodetección de proteínas mediante inmunohistoquímica en parafina. RTU; *Ready to use*. EV FLEX kit; EnVision FLEX detection kit.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El Ki-67 es un marcador que se expresa en células proliferativas. De esta manera, la cuantificación de la IHC de Ki-67 da una medida de la tasa proliferativa de un determinado tejido en unas

determinadas condiciones, por ejemplo, después de un tratamiento o tras la pérdida de expresión de un gen de interés.

Para la cuantificación, se toman fotografías de 5 campos representativos de cada animal y se calcula la proliferación celular como el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 respecto al número total de núcleos por campo. Se evalúan entre 1500-2000 núcleos por animal. Las imágenes de la tinción se toman con el microscopio DMD 108 (Leica) y se cuantifican manualmente con el programa *ImageJ*.

ANÁLISIS DEL TAMAÑO NUCLEAR CELULAR

Mediante el uso del programa QuPath 0.1.2 (*Bankhead et al., 2017*) se realizó la medición del área nuclear, empleando cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, de tumores subcutáneos de células endometriales epiteliales. La región de interés (ROI) se definió como las células epiteliales tumorales, excluyendo las regiones de matriz extracelular y las células mesenquimales. A través de un algoritmo del programa, se detectaron las células que entraban dentro del estándar marcado como célula epitelial y se aplicó un baremo colorimétrico de morado a amarillo que se correspondía con el área nuclear más pequeña ($10 \mu\text{m}^2$) hasta la más grande ($210 \mu\text{m}^2$), respectivamente.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RECOMBINASA TAT-CRE

Para evaluar la actividad recombinasa con el animal reportero mT/mG, se sacrifican los animales por dislocación cervical y se diseccionan los órganos de interés. Inmediatamente, se fijan ligeramente en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (pH 7-7.4) durante 2 horas (más tiempo dependiendo del tamaño del tejido a analizar) a 4°C, para conservar la estructura del tejido sin perder la fluorescencia. Los tejidos fijados se sumergen en una solución de PBS con sacarosa (Sigma-Aldrich) al 30% durante toda la noche a 4°C para crioprotegerlos y a continuación se incluyen en OCT (VWR), se congelan a -20°C y se cortan secciones de 5 μm con el criostato. Finalmente, se tiñen los núcleos con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente y se montan las muestras con PBS:glicerol (1:1). Las imágenes se toman utilizando un microscopio confocal Olympus FluoView™1000 y el programa FluoView ASW 4.1 (Olympus). Durante todo el proceso, es importante preservar las muestras de la luz al máximo, para conservar la fluorescencia al máximo. Los tejidos en los que no se detectan actividad recombinasa emiten fluorescencia roja. Por otro lado, la actividad de la proteína recombinasa TAT-Cre se detecta por la presencia de fluorescencia verde, como se ha explicado en secciones anteriores.

TÉCNICA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

EXTRACCIÓN DE ARN

Para el análisis del transcriptoma, se han realizado extracciones de ARN a partir de cultivos celulares epiteliales endometriales tridimensionales que se encuentran creciendo sobre una cama de Matrigel™.

El ARN de las muestras, triplicados obtenidos de cultivos 3D generados de manera independiente de animales de los genotipos de interés, fue extraído, con el fin de preservar el ARN resultante en condiciones óptimas, con el kit *SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification* (Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, el kit incluye una digestión con ADNsa I, que permite eliminar el ADN genómico contaminante que podría quedar en la muestra. Los extractos de RNA se cuantifican con el NanoDrop® (ND-1000 UV/Vis Spectrofotometer, Nanodrop Technologies) y se guardan congelados a -80°C.

Para aumentar la concentración de ARN total extraído, se puede realizar una extracción de RNA de los cultivos con Trizol/cloroformo previo al uso del kit comercial.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Análisis de los datos mediante Gene Set enrichment analysis (GSEA)

Siguiendo las directrices del tutorial proporcionado por los desarrolladores de la aplicación GSEA, los datos obtenidos del análisis de la secuenciación del transcriptoma entero para la clonación al azar (RNA-seq) proporcionados por el CRG Barcelona de las muestras de ARN de nuestros cultivos 3D, los valores de expresión utilizados en la aplicación no se introdujeron en escala logarítmica en base 2 (*Subramanian et al., 2005*). El conjunto de genes (*gene set*) mostrado en este trabajo tiene los valores estadísticos pertinentes para ser considerado como significativamente asociado a una de las condiciones ($p < 0.05$; FDR < 0.25).

PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA: RT-PCR

Síntesis ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN extendido en el primer paso, se puede sintetizar, mediante la reacción de la transcripción inversa o retrotranscripción (RT), el ADNc. En primer lugar, se someten 500 ng del ARN a 90°C durante 2 minutos, con el fin de deshacer posibles dímeros o bucles que se generen en su estructura de ARN. A continuación, se realiza la reacción de síntesis de ADNc con la enzima retrotranscriptasa del kit Taqman® (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción (reverse transcription PCR) son: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. Una vez sintetizado, el ADNc se puede guardar a -20°C hasta el momento de su uso, o se puede emprender directamente la técnica de la PCR a tiempo real (del inglés *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction RT-qPCR*).

PCR a tiempo real (RT-qPCR)

La técnica de PCR a tiempo real utiliza una sonda específica para cada gen a analizar. Esta sonda está marcada con un fluorocromo que el termociclador CFX96TM (BioRad) lee y cuantifica. El programa que se utiliza comienza por 10 minutos a 95°C y después, consta de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 1 minuto a 60°C. Las sondas emprendidas se adquieren en Applied Biosystems y se detallan en la tabla 15. Como control endógeno de expresión se empleó Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

| Gen | Especie | Nº de catálogo |
|-----------|---------|----------------|
| Vimentina | Ratón | Mm01333430_m1 |
| MMP2 | Ratón | Mm00439498_m1 |
| Snai1 | Ratón | Mm00441533_g1 |
| ZEB1 | Ratón | Mm00495564_m1 |
| GAPDH | Ratón | Mm99999915_g1 |

Tabla 15. Sondas utilizadas para el análisis por RT-qPCR obtenidas de *Applied Biosystems*

Los resultados se obtienen en forma de número de Ct (*cycle threshold*), que es el ciclo de PCR en el que comienza el crecimiento exponencial del producto de la PCR y, por tanto, de la síntesis de la muestra analizada. Así, como más grande es el valor de Ct obtenido, menor es el nivel de expresión del gen estudiado. La cantidad relativa de ARNm de cada gen se calcula de la siguiente manera:

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

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

A partir de estos cálculos, el nivel relativo de ARNm de la condición experimental respecto al control es $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Con estos valores se calcula la media de cada muestra (se realizan triplicados) y el error estándar.

En todos los experimentos realizados, se incluyó también, para cada sonda, un control negativo con agua y un control negativo de la retrotranscripción RT⁻, para descartar la presencia de ADN genómico contaminante.

INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNA

WESTERN BLOT

Extracción de proteína total en SDS

Para la detección de los niveles de proteína, se han realizado extracciones proteicas a partir de cultivos celulares primarios de ratón de células epiteliales de endometrio.

Es importante realizar la extracción proteica de forma rápida y eficiente, para evitar la alteración y la degradación de la muestra, de manera que refleje el estado fisiológico con la mayor fidelidad posible. Así, en los cultivos celulares, después de cada tratamiento (p.ej. con TAT-Cre), las células del experimento en cuestión se limpian con PBS frío, y a continuación, se recogen en el tampón de extracción proteica. Este tampón es una solución de suero desnaturalizado que contiene 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) y 2% de SDS (dodecilsulfato de sodio, del inglés *sodium dodecyl sulfate*, Sigma-Aldrich). Este método permite llevar a cabo una extracción eficiente, ya que elimina las interacciones entre las proteínas y permite la liberación de las proteínas unidas a estructuras macromoleculares. Además, el detergente SDS desnaturaliza e inactiva la mayoría de las enzimas presentes en la muestra, incluyendo fosfatasas y proteasas, que podrían dañar el extracto.

Finalmente, los extractos proteicos se procesan con el sonicador digital Sonifier S450D (BRANSON®) antes de proceder a su cuantificación.

Cuantificación de proteínas por el método Lowry

Dado que el número de células y la eficiencia de la extracción proteica pueden variar entre una y otra muestra, es importante cuantificar la cantidad de proteína presente en cada una de ellas para facilitar la posterior interpretación de los resultados. Si la cantidad de proteína cargada en el gel es diferente entre condiciones será imposible extraer conclusiones fiables de nuestros resultados, ya que no se podrá discernir si las diferencias observadas se deben al tratamiento estudiado o al efecto de la carga. Por este motivo, se utiliza el método de *Lowry* para determinar la cantidad de proteína total presente en cada muestra, utilizando los reactivos comercializados por Bio-Rad, y comparándolos con una recta patrón de concentración proteica conocida de BSA (albúmina sérica bovina). Luego, en una placa M96, en primer lugar, se añaden 5 μ L de cada una de las diferentes muestras que constituyen nuestra recta patrón y 3 μ L de cada condición experimental, siempre por duplicado. A continuación, se mezclan los reactivos A y S en proporción 50:1, y se añaden 25 μ L de esta mezcla a cada uno de los pocillos, donde con anterioridad habíamos añadido la muestra o la recta patrón. A continuación, se añaden 200 μ L del sustrato fluorogénico (reactivo B), y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se lee la absorción de la placa a 595 nm. Los valores de absorción obtenidos para las muestras se extrapolan a la recta patrón, determinando así, la concentración proteica de cada una de las muestras.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Una vez los extractos proteicos se han obtenido y cuantificado, las muestras se preparan cogiendo la misma cantidad de proteína para las diferentes condiciones que se quieren comparar y añadiendo tampón de carga 5x (10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM β -mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8 y azul de bromofenol). Además, se llevan todas a un mismo volumen con el mismo tampón de lisis y se hierven 5 minutos a 95°C para acabar de desnaturalizar las proteínas. De esta forma, las muestras ya están listas para llevar a cabo la separación proteica por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Estos geles son desnaturalizantes y permiten la separación de las distintas proteínas de la muestra en función de su peso molecular. Se preparan a partir de la solución ACRYL/BIS™ (BioRad), que contiene 39% de acrilamida y un 1% de bis-acrilamida. La polimerización se realiza con 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) como iniciador de la reacción y persulfato de amonio (Sigma-Aldrich) al 0,05% como catalizador.

Para ello, se han empleado geles discontinuos, formados básicamente por dos partes con porcentajes de acrilamida diferentes. En la parte superior o gel concentrador se cargan las muestras, y sirve para concentrar el frente de proteínas de forma que todas entren a su vez en el gel separador. Se encuentra constituido por un porcentaje bajo de acrilamida (5%) que se prepara en tampón 125 μ M Tris-HCl a pH 6,8. Por otra parte, el gel separador es donde realmente se separan las proteínas según su peso molecular. Se prepara en tampón 375 μ M Tris-HCl a pH 8,8, y su porcentaje de acrilamida depende del peso molecular de las proteínas que se quieran detectar, oscilando entre el 6 y el 15%.

Una vez los geles han polimerizado, se cargan las muestras previamente preparadas y se dejan migrar a un voltaje constante de 120 V en un tampón de migración (25 mM Tris 25; 1,44% de glicina y 0,1% de SDS) en el sistema MiniProtean® de BioRad. Es importante cargar también, en uno de los carriles, un marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler, ThermoFisher Scientific), para disponer de una referencia sobre el peso molecular de las proteínas detectadas.

Transferencia de proteínas

Después de la separación de las proteínas en el gel, se transfieren a una membrana de PDVF (Immobilon-P, Millipore). El método emprendido para la transferencia es de nuevo el sistema MiniProtean® de BioRad, en el que se forma un *sándwich* con el gel, la membrana, dos papeles Watman y dos esponjas. El conjunto de capas, se coloca en una solución de transferencia (25 mM Tris 25 y 192 mM glicina a pH=8,3) con un bloque de hielo que evita los sobrecalentamientos, y se dejan transferir las proteínas del gel a la membrana durante 1 hora a un voltaje constante de 70V.

Para terminar la transferencia y para evitar posibles uniones inespecíficas, la membrana se bloquea con leche en polvo desnatada al 5% en tampón TBS-T (20 mM Tris a pH 7,4; 150 mM NaCl y 0,1% de Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente.

Inmunodetección de proteínas

Una vez bloqueada con leche, se realizan tres lavados de 15 minutos a la membrana con TBS-T y se incuba la membrana con el anticuerpo primario de interés. Los anticuerpos y diluciones empleadas en este trabajo se detallan en la tabla 16. La dilución del anticuerpo primario se prepara en una solución de TBS-T con 3% de BSA y 0,02% de Azida sódica, que evita contaminaciones bacterianas y permite reutilizar el anticuerpo. Generalmente, la incubación suele realizarse durante toda la noche a 4°C, aunque en algunos casos y en función del anticuerpo, se puede llevar a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se recupera el anticuerpo primario y se guarda a 4°C hasta su próximo uso. Se realizan tres lavados en la membrana de 15 minutos cada uno con TBS-T, y se incuba con la dilución adecuada de anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la membrana se vuelve a lavar tres veces más con TBS-T.

Llegados a este punto, se puede proceder a la visualización de la inmunodetección proteica. Por eso, el anticuerpo secundario se encuentra conjugado a peroxidasa, que permite la detección de la señal. En este sentido, la membrana se incuba durante 3 minutos con el reactivo comercial Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Este reactivo asocia la catálisis del agua oxigenada a la oxidación de luminol, produciendo un incremento de la quimioluminiscencia. Por último, la membrana se visualiza con el sistema de documentación *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad) y se analiza con el programa informático asociado, *Image Lab*.

| Antígeno | Dilución | Proveedor | Referencia |
|----------------|----------|---------------------------|-------------|
| PTEN | 1:1000 | Cell Signaling technology | 9188 |
| P53 | 1:1000 | Leica | VP-P956 |
| β-Actina | 1:5.000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-1616 |
| GAPDH | 1:20.000 | Abcam | 8245 |
| HIS-TAG | 1:1000 | Cell Signaling technology | 2365 |
| Conejo IgG-HRP | 1:10.000 | Jackson | 111-035-003 |
| Ratón IgG-HRP | 1:10.000 | Jackson | 115-035-003 |

Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección proteica mediante la técnica del Western blot.

INMUNOFUORESCENCIA

En el presente trabajo, se han realizado inmunofluorescencias de cultivos celulares epiteliales endometriales tridimensionales que se encuentran creciendo sobre una cama de Matrigel™.

Cuando se considera que el cultivo está en un estado óptimo para su análisis proteico por inmunofluorescencia, los cultivos se limpian con PBS frío y se fijan o con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos o con metanol 100% frío durante 5 minutos. Una vez transcurridos este tiempo, se hacen tres lavados más con PBS. En todos los momentos donde se agrega o quita un volumen en los pocillos, se ha de intentar hacer con el máximo cuidado y delicadeza posible para evitar el desprendimiento celular en la placa.

Previamente a la incubación con el anticuerpo primario, la muestra se deja a temperatura ambiente durante una hora con una solución de bloqueo (PBS al 2% de HS, 2% BSA y 0,2% de Tritón X-100). Durante esta hora tienen lugar dos procesos importantes para la correcta inmunodetección proteica, por un lado, la albumina bovina y el suero de caballo bloquean los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. Por otro lado, el Tritón X-100 facilita la permeabilización de las membranas dando acceso a los anticuerpos a reconocer sus antígenos específicos de la proteína diana dentro de los diversos compartimentos celulares.

Transcurrido el tiempo de bloqueo, el anticuerpo primario se incuba a 4°C durante 16 horas. Pasado este tiempo, se hacen tres lavados más con PBS y se incuba con el anticuerpo secundario y el Hoechst 33258 (como marcaje nuclear) (Sigma-Aldrich) durante 16 horas a 4°C. La incubación ha de ser protegida de la luz, ya que el secundario está fusionado con un fluorocromo que se excitara al ser expuesto a la luz natural. Terminado el tiempo de incubación, se hacen tres lavados con PBS y las muestras se pueden conservar a 4°C y resguardadas de la luz hasta su visualización con el microscopio de fluorescencia confocal Olympus FluoView™1000. Los anticuerpos y diluciones empleadas en este trabajo se detallan en la tabla 17.

| Antígeno | Dilución | Proveedor | Referencia |
|----------------------------------|----------|---------------|------------|
| Faloidina | 1:1000 | Sigma-Aldrich | P1951 |
| Vimentina | 1:200 | BD bioscience | 550513 |
| Citoqueratina | 1:200 | Abcam | 9377 |
| Anti-ratón IgG Alexa Fluor™ 488 | 1:250 | ThermoFisher | A11029 |
| Anti-conejo IgG Alexa Fluor™ 546 | 1:250 | ThermoFisher | A11010 |

Tabla 17. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección proteica mediante la técnica del inmunofluorescencia.

SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/CAS9

PRODUCCIÓN DE LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS CRISPR/CAS9

GENERACIÓN DEL DÚPLEX CRRNA:TRACR RNA

El primer paso para generar la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9, consiste en la generación del ARN que hará de guía (ARNg o sgRNA) para direccionar la actividad nucleasa de la proteína Cas9 hacia la secuencia donde queremos desencadenar la edición génica. Este ARNg está formado por un dúplex de ARN formado por la unión del ARNcr (crRNA) y el ARNtracr (tracrRNA), y es conocido como crRNA:tracrRNA. El tracrRNA, Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA (IDT), es común para todos los ARNg. En cambio, la secuencia del crRNA, Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA (IDT), es la que varía según la secuencia diana. Las secuencias de los crRNAs utilizados en este trabajo se encuentran recogidas en la tabla 18. Los *off-targets* de estos crRNA fueron previamente analizados con la herramienta Cas-OFFinder del software CRISPR RGEN.

| Secuencia diana | Secuencia crRNA |
|---------------------------|----------------------|
| <i>mT/mG (loxP)</i> | GUAUGCUAUACGAAGUUAUU |
| <i>Exón 5 Pten/PTEN</i> | AAUUCACUGUAAAGCUGGAA |
| <i>Exón 7 Trp53/p53</i> | GGAGUCUCCAGUGUGAUGA |
| <i>Exón 3 Fbxw7/FBXW7</i> | GUUGUUGGUGUUGCUCAACA |

Tabla 18. Listado de las secuencias de los crRNAs empleados para la modificación génica CRISPR/Cas9

Los crRNA vienen en versión liofilizada, por lo que para la hibridación del crRNA con el tracrRNA, primeramente, se ha de disolver este oligonucleótido liofilizado en buffer dúplex libre de nucleasas (*Nuclease-Free Duplex buffer*, IDT) (100 mM de acetato de potasio; 30 mM de HEPES, pH 7,5); esto

proporciona un entorno protector y necesario para la hibridación de los oligonucleótidos. El volumen necesario de buffer para diluir el crRNA variará según el formato que se adquiera de éste, pero para este trabajo, la concentración de almacenamiento (*stock*) a la que se disuelven los diversos crRNAs es de 100 μM (p.ej. 2 ηmoles de crRNA se diluyen en 20 μL de buffer dúplex). Para una correcta disolución del crRNA liofilizado, es aconsejable calentar el tampón dúplex y vortear durante un tiempo dentro del vial donde se encuentra el pellet liofilizado.

Para hibridar el crRNA con el tracrRNA, ambos oligonucleótidos han de mezclarse en una concentración equimolar, esto es de vital importancia, ya que así se evitará la aparición de RNA monocatenario residual, que pueda inhibir la correcta formación de la ribonucleoproteína en futuros pasos. Así, se generaron dúplex de ARN de 20 μM (10 μL crRNA, 10 μL tracrRNA y 30 μL de *Duplex Buffer*). Los oligonucleótidos mezclados se calientan a 94°C durante 5 minutos y se enfrían de manera gradual, o bien transfiriendo las muestras del bloque térmico a la mesa de trabajo a temperatura ambiente, o bien, la opción más recomendable la de realizar refrigeración gradual. Esto se hace fácilmente colocando la solución de oligos en un baño de agua o en un bloque de calor y desenchufando/apagando la máquina (dejar hasta que se enfríe del todo).

PREPARACIÓN DE LAS MIXES DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS

Seguidamente, una vez tenemos bien anillados los oligonucleótidos a 20 μM , se procede a la formación del complejo ribonucleoproteico. Para un correcto aprovechamiento, formación y funcionamiento de las ribonucleoproteínas, tanto la Cas9, Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3 (IDT), como el dúplex crRNA:tracrRNA han de estar en concentraciones equimolares. La nucleasa Cas9 recombinante de *S. pyogenes* de IDT, está purificada a partir de una cepa de *E. coli* que expresa la nucleasa. La proteína contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) y la etiqueta 6x-His en el extremo C-terminal. La Cas9 comercial se encuentra en solución a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En 100 μg de nucleasa Cas9 = 610 pmol. Por lo que 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ es igual a 61 μM . Una vez sabida la concentración a la que disponemos la nucleasa recombinante, se prepara una mezcla a 6 μM de RNP (0,5 μL de Cas9 61 μM , 1,5 μL de crRNA:tracrRNA 20 μM y 3 μL de Opti-MEM™). Esta mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos con el fin de que la proteína y el ARN hibriden entre ellos. Transcurrido el tiempo de incubación, la RNP ya estará lista para su uso *in vitro* o *in vivo* (las concentraciones de uso para según que experimento varían, concentraciones explicadas más adelante).

ENSAYO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA DE LAS DISTINTAS RNP

Para los experimentos de ensayos de la actividad nucleasa, se han generado ribonucleoproteínas contra las secuencias *loxP* del constructo mT/mG, contra el exón 5 de *Pten*, contra el exón 7 de *p53*

y contra el exón 3 de *Fbxw7*. Por ello, una vez generadas las RNP se procede a la prueba *in vitro* de su actividad nucleasa contra la secuencia diana.

En primer lugar, salvo en el caso de la secuencia contra la secuencia *loxP*, se realiza una PCR que flanquee la región de corte a partir de ADN genómico extraído de células murinas salvajes. El ADN genómico se extrae empleado el kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NYZTech), siguiendo las indicaciones marcadas por la casa comercial. Las secuencias de los primers y las condiciones de la PCR utilizados para la amplificación del fragmento se especifican en la tabla 19.

| Gen diana | Secuencia de los primers usados (0.8 μM/rxn) | | Programa de PCR | | | Tamaño fragmento resultante |
|--------------|--|--|-----------------|---------|--------|-----------------------------|
| | | | T (°C) | Tiempos | Ciclos | |
| <i>Pten</i> | Fwd Rev | GAGCACAATGCTTGTTCCATG TACTACTAAGTGGATACAACCAC | 95 °C | 2' | 1 | 622bp |
| | | | 95 °C | 30'' | 45 | |
| | | | 55 °C | 30'' | | |
| | | | 72 °C | 1'20'' | | |
| | | | 72 °C | 7' | 1 | |
| <i>p53</i> | Fwd Rev | CCATGCTAAGCAAGTGTGG CCCTAAGCCCAAGAGGAAAC | 95 °C | 2' | 1 | 451bp |
| | | | 95 °C | 30'' | 45 | |
| | | | 55 °C | 30'' | | |
| | | | 72 °C | 1'20'' | | |
| | | | 72 °C | 7' | 1 | |
| <i>Fbxw7</i> | Fwd Rev | TTAAATACATCTGGGGCAAGC TCCGCTTACATCTGGCTTCT | 95 °C | 2' | 1 | 427bp |
| | | | 95 °C | 30'' | 45 | |
| | | | 55 °C | 30'' | | |
| | | | 72 °C | 1'20'' | | |
| | | | 72 °C | 7' | 1 | |

Tabla 19: Protocolo de PCR para la generación fragmentos de ADN que contengan la región de corte de las diversas RNP. Se especifica la secuencia de los cebadores (primers), el programa de PCR. Fwd; primer *forward*. Rev; primer *reverse*.

Los fragmentos de PCR se purifican y limpian utilizando el kit NZYGelpure (NYZTech) siguiendo el protocolo propuesto por la compañía. De esta forma eliminamos los restos de ADN genómico, dNTPs, polimerasa y sales de los fragmentos de PCR de interés. Posteriormente se realiza una cuantificación con el espectrofotómetro NanoDrop™ de dichos fragmentos.

Seguidamente, el vector pCA-mTmG (#26123, Addgene) y estos fragmentos de *Pten*, *p53* y *Fbxw7*, son digeridos por la *loxP*-RNP, *Pten*-RNP, *p53*-RNP y *Fbxw7*-RNP, respectivamente. La digestión se realiza juntando 3 μL de la RNP correspondiente a cada digestión a 2 μM (partiendo del stock de 6 μM preparado previamente) (queda a 0,6 μM), con entre 0,5 y 1 μg de su respectivo ADN (2 μL) y 4 μL de Opti-MEM™ (GIBCO), e incubándolo todo durante 1 hora y media a 37°C. Tras el tiempo de digestión se incuba la mix a 95°C durante 5 minutos con el fin de bloquear la Cas9 y liberar posibles fragmentos que aun queden adheridos a ella. Como controles de la actividad nucleasa de la Cas9, de manera simultánea, se incuba el ADN en condiciones donde falta uno o varios componentes de la digestión.

Los fragmentos resultantes de la digestión se resuelven en un gel de agarosa al 1% en TAE (Tris, acetato glacial y EDTA) junto con 5 μ L Orangina (10mM EDTA 0.5M pH6.8, 10mM TRIS, 30% glicerol, Orange G y enrasar hasta 20mL con H₂O mQ).

TRANSFECCIÓN *IN VITRO* DE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA CRISPR/CAS9 EN CULTIVOS CELULARES

En el presente trabajo, se ha probado *in vitro* la actividad de la *loxP*-RNP en fibroblastos aislados de piel de ratón mT/mG. Como método de transfección de la ribonucleoproteína se empleó el reactivo Lipofectamina 2000 (ThermoFisher). Para ello, se plantan los fibroblastos murinos a una confluencia del 60-70%, se sustituye el medio de cultivo por Opti-MEM™. Por otro lado, se realizan dos mixes por separado, una de ellas contiene 0,12 μ M de la RNP (partiendo de la 6 μ M) diluida en Opti-MEM™, y la otra la lipofectamina también diluida en Opti-MEM™ (1,5 μ L Lipofectamina 2000/25 μ L). Ambas mixes se mezclan entre ellas y se dejan reposar en temperatura ambiente durante 20 minutos. El volumen de la mezcla resultante se añade sobre los pocillos a los cuales habíamos cambiado el medio previamente en una proporción 1:8 (p. ej. en una placa M24 se añaden 50 μ L de mix sobre 400 μ L de medio).

ELECTROPORACIÓN *IN ÚTERO* DE LOS COMPONENTES CRISPR/CAS9

En el presente trabajo se ha puesto a punto la ablación génica *in situ* mediante la electroporación *in vivo* de la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9 en úteros de ratones. Todos los ratones utilizados para este tema en este trabajo son mT/mG con fondo genético C57BLACK/6J.

Una vez generadas las distintas RNPs como se describe en apartados anteriores, se procede a realizar una cirugía donde las ratonas son anestesiadas con isoflurano al 2% por vía inhalatoria. Para la operación, se realiza una incisión en la línea media del ratón, colocado hacia arriba. En todos los animales, se entra en la cavidad abdominal mediante un corte a través de la pared abdominal. Una vez localizado el endometrio se introducen, con ayuda de una jeringa Hamilton™ Neuros™, 5 μ L de la RNP 6 μ M teñidos con *Fast Green FCF* (SIGMA) por cada rama uterina. En los casos donde se añaden más de una RNP, de igual manera se introducen 5 μ L por rama uterina, con una proporción 1:1 de cada una de las ribonucleoproteínas a añadir.

Utilizando un electroporador cuadrado BTX830, se aplicaron 4 pulsos de 50mV durante 50 mseg espaciados por 950 mseg de separación al cuerno uterino inyectado. Este protocolo se repite oponiendo la orientación de las pinzas y se repitió de nuevo a lo largo de todo el cuerno uterino. Las pinzas empleadas, *Platinum Tweezertrode, 5 mm Diameter* (BTX), para la electroporación son unos electrodos reutilizables tipo pinza para aplicaciones *in vivo* e *in utero* en tejidos animales.



Figura 34. Fotografía representativa de la electroporación *in utero* de la RNP CRISPR/Cas9.

Una vez electroporados, se reintroducen con cuidado los órganos de nuevo dentro de la cavidad peritoneal, y la incisión de la piel se cierra con una grapadora para heridas especial para ratones (AutoClip® System 12020-09, FST).

Dependiendo de cada experimento, los animales serán sacrificados, por dislocación cervical, en un tiempo u otro desde la operación. El útero será disecado y tratado según requiera el análisis de cada caso.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA EFICIENCIA DE CORTE DE LA RNP *IN VIVO*

Con el fin de conocer la eficiencia de corte en las células epiteliales endometriales tras la edición génica *in situ* mediante al electroporación *in vivo*, en este trabajo se procedió a realizar la técnica NGS de secuenciación de amplicones procedentes de ADN de las células epiteliales de la región uterina electroporada.

EXTRACCIÓN ADN GENÓMICO DE CÉLULAS EPITELIALES

En primer lugar, como los animales utilizados son mT/mG y, por tanto, en todos los casos se usó la *loxP*-RNP como reportera de la actividad nucleasa en las células epiteliales endometriales del lumen uterino. Por este motivo, para seleccionar la región uterina electroporada, se procede a realizar un corte longitudinal a través del cuerpo uterino. De esta forma mediante un microscopio estereoscópico (Nikon Eclipse Ts2R), se pueden discernir entre aquellas zonas donde las células epiteliales luminares han adquirido la actividad nucleasa y por tanto presentan un marcaje membranario verde.

Una vez seleccionada la región electroporada, esta se limpia con HBSS (Invitrogen) y con ayuda de la hoja de un bisturí se realiza un legrado uterino de las células epiteliales endometriales luminares de esta zona uterina. Estas células son recogidas con ayuda de una pipeta, y limpiadas con PBS a base de una serie de centrifugaciones. El pellet celular será procesado sacar el ADN genómico de las células epiteliales endometriales, el ADN genómico se extrae empleado el kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NYZTech), siguiendo las indicaciones marcadas por la casa comercial.

GENERACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR Y SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES

Después de la obtención del ADN genómico, se realiza una PCR que amplifique la región de corte de cada una de las nucleasas empleadas. Los cebadores empleados en cada uno de los experimentos, así como las condiciones de PCR se encuentran detallados en la tabla 20.

| Gen/secuencia diana de la RNP | Secuencia de los primers usados (0.8 μ M/rxn) | | Programa de PCR | | | |
|-------------------------------|---|--|-------------------|---------|--------|---|
| | | | T ($^{\circ}$ C) | Tiempos | Ciclos | |
| <i>Pten</i> | Fwd Rev | TTATCTTTTACCACAGTTGCAC GTGGTTGTATCCAAGTAGTGTA | 95 $^{\circ}$ C | 2' | 45 | |
| | | | 95 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 55 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 1'20'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 7' | | 1 |
| <i>p53</i> | Fwd Rev | CCATGCTAAGCAAGTGTGG CCCTAAGCCCAAGAGGAAAC | 95 $^{\circ}$ C | 2' | 45 | |
| | | | 95 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 55 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 1'20'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 7' | | 1 |
| <i>Fbxw7</i> | Fwd Rev | TTAAATACATCTGGGGCAAGC TCCGCTTACATCTGGCTTCT | 95 $^{\circ}$ C | 30'' | 45 | |
| | | | 55 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 1'20'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 7' | | 1 |
| | | | 95 $^{\circ}$ C | 2' | | 1 |
| <i>loxP</i> | Fwd Rev | TGGTTATTGTGCTGTCTCATC GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT | 95 $^{\circ}$ C | 30'' | 45 | |
| | | | 55 $^{\circ}$ C | 30'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 1'20'' | | |
| | | | 72 $^{\circ}$ C | 7' | | 1 |

Tabla 20: Protocolo de PCR para la amplificación de fragmentos de ADN que contengan la región de corte de las diversas RNP para su secuenciación NGS de amplicones. Se especifica la secuencia de los cebadores (primers), el programa de PCR. Fwd; primer *forward*. Rev; primer *reverse*.

Los fragmentos de PCR se purifican y limpian utilizando el kit NZYGelpure (NZYTech) siguiendo el protocolo propuesto por la compañía. De esta forma eliminamos los restos de ADN genómico, dNTPs, polimerasa y sales de los fragmentos de PCR de interés. Posteriormente se realiza una cuantificación con el espectrofotómetro NanoDrop™ de dichos fragmentos. Y se mandan a secuenciar estos fragmentos al servicio GENEWIZ de la empresa AZENTA Life Science.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los datos obtenidos de la secuenciación de amplicones, en formato FASTQ, fueron analizados empleando dos softwares gratuitos, la herramienta Cas-Analyzer de CRISPR RGEN y el software CRISPResso2. Ambos programas son didácticos y de fácil uso. Ambos programas en primer lugar añaden las secuencias introducidas en el formato FASTQ con una secuencia de referencia que se le ha de proporcionar al programa (ha de ser la secuencia correspondiente al fragmento esperable en caso de no haber mutaciones). Así, introduciendo la secuencia del crRNA que se empleó para generar la RNP de cada experimento, los programas alinean los amplicones buscando deleciones, inserciones y sustituciones próximas a la región predicha de corte. En este trabajo por defecto, predeterminados por los programas, se analizan las modificaciones a 70 o 100 nucleótidos a cada lado del sitio de corte.

WHOLE-ORGAN IMAGING

En el presente trabajo, se han realizado imágenes 3D de fragmentos uterinos enteros que habían sido modificados genéticamente *in situ* mediante la electroporación *in vivo* de la RNP CRISPR/Cas9.

ACLARADO TISULAR CUBIC (CUBIC CLEARING)

Para ello, como las muestras uterinas analizadas provienen de ratones mT/mG electroporados con *loxP*-RNP con y sin la *Pten*-RNP. De manera natural (sin necesidad de realizar ninguna inmunofluorescencia del órgano completo), los tejidos expresan en todas sus células la proteína tdTomate membranaria, a excepción de aquellas donde se haya producido la actividad nucleasa de la *loxP*-RNP donde las células expresaran la EGFP membranaria. Al ser proteínas fluorescentes naturales (no fluorocromos sintéticos) para conservar su conformación natural y por tanto su fluorescencia se ha de realizar un aclarado tisular en condiciones acuosas. Esto, es porque las proteínas fluorescentes necesitan de la presencia de H₂O para su correcta preservación estructural. Por ello, para este trabajo se ha realizado el clareamiento uterino basándose en el protocolo descrito previamente por Dr. Tainaka donde se usan reactivos hidrófilos (*Tainaka et al., 2018*).

En primer lugar, se fijan los tejidos ligeramente en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (pH 7-7.4) durante 2-3 horas (más tiempo dependiendo del tamaño del tejido a analizar) a 4°C, para conservar la estructura del tejido sin perder la fluorescencia. Una vez fijado, se realizan un lavado de los tejidos de 30 minutos con PBS. Estos tejidos son posteriormente embebidos en la solución de aclarado tisular CUBIC-L (*Clear, Unobstructed Body Imaging Cocktails-deLipidation*) formado por 10 wt% de *N-Butyldiethanolamine* (Tokyo Chemical Industry), 10 wt% de Tritón X-100 y 80 wt% H₂O MilliQ. Esta mezcla producirá la delipidación y decoloración tisular. Se deja en agitación durante 7 días a 37°C, en este tiempo, a los 3-4 días de procesamiento se ha de sustituir el medio por CUBIC-L fresco. Trascurrido el tiempo de aclarado tisular se lavan los tejidos con PBS (3 lavados de 30 minutos cada uno). Tras el lavado de PBS el tejido se rehidrata y pierde claridad (color blanquecino), aun así, como se puede ver en la figura 35, el tejido queda incoloro y traslucido. Durante todo el proceso, es importante preservar las muestras de la luz al máximo, para conservar la fluorescencia al máximo.

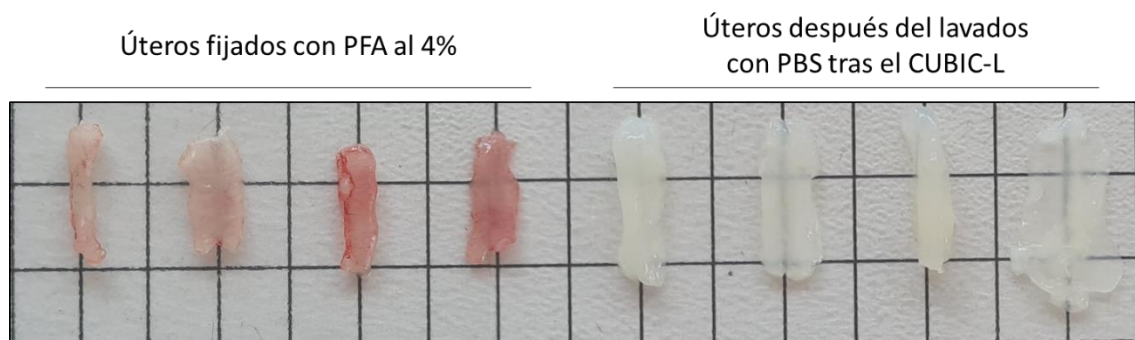


Figura 35. Fotografía macroscópica de las secciones uterinas murinas antes y después del aclarado tisular. Se comparan úteros tras ser fijados con PFA al 4% durante 2 horas (izquierda), con úteros aclarados durante 7 días con CUBIC-L y lavados durante una hora y media en PBS (derecha). El orden de colocación de los tejidos en un fragmento uterino cerrado y otro abierto longitudinalmente. Se puede ver que, aunque el útero en condiciones normales ya sea un tejido algo traslucido, una vez procesados estos tejidos pierden coloración y son más traslúcidos (sobre todo en aquellos tejidos abiertos).

Una vez lavados los tejidos, estos son introducidos en una solución al 0,8% de agarosa con baja temperatura de gelificación (A9045, Sigma) en H₂O MilliQ. Como se ilustra en la figura 36, se usa como molde para orientar el tejido en la posición adecuada para la visualización tridimensional una jeringuilla de 5 mL sin embolo (previamente cerrado con Parafilm el agujero donde iría la aguja). Así introduciendo el útero, con intervalos de frio y posicionamiento del tejido, se consigue encarar en la posición adecuada el tejido.

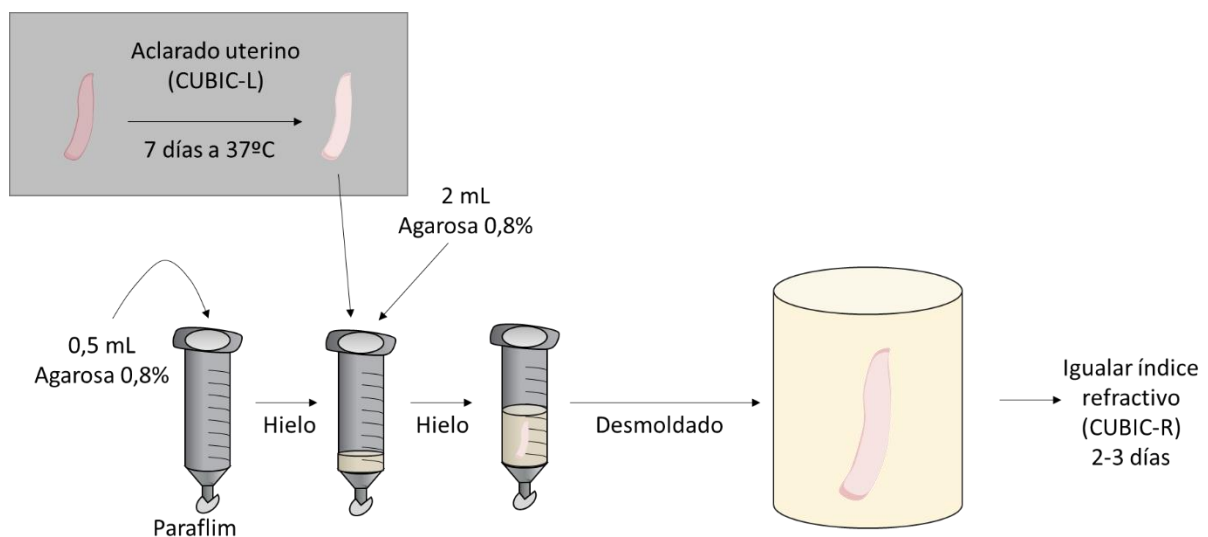


Figura 36. Esquema del protocolo de la preparación del tejido uterino para la visualización de la fluorescencia en todo el tejido. Se detalla el aclarado del tejido con CUBIC-L, seguido del encaramiento del tejido en un bloque de agarosa al 0,8%, y de la incubación con CUBIC-R para el igualado de los índices refractivos entre el tejido y la agarosa.

El siguiente paso consiste en igualar el índice refractivo (RI, *Refractive index*) entre la muestra y la agarosa que la embebe. Para ello, una vez solidificada la agarosa, se incluye el cilindro en una solución denominada CUBIC-R (*Clear, Unobstructed Body Imaging Cocktails-RI-matching*) al 50% en H₂O MilliQ durante 3-4 horas a temperatura ambiente y en agitación suave. Ésta solución CUBIC está compuesta por 45 wt% de antipyrine (Tokyo Chemical Industry), 30 wt% de N-methylnicotinamide (Tokyo Chemical Industry), 0.5 wt% de N-Butyldiethanolamine y 24.5 wt% de H₂O MilliQ. Pasadas las 3-4 horas de incubación se sustituye la solución por CUBIC-R al 100% y se deja procesando durante 2-3 días a temperatura ambiente y en agitación suave.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, cuando los RI están igualados, se puede proceder a la visualización tridimensional de todo el tejido utilizando un ultramicroscopio de fluorescencia en lámina de luz (*light-sheet microscopy*)

LIGHT-SHEET MICROSCOPY

Para la visualización mesoscópica de los úteros electroporados con la RNP CRISPR/Cas9 se empleó la ultramicroscopia de fluorescencia en lámina de luz (*light-sheet microscopy*) basada en microscopia de dos fotones (*two-photon microscopy*), donde la muestra es excitada desde dos puntos opuestos enfrentados. Tal y como se muestra en la figura 37, el bloque de agarosa donde se encuentra retenido el tejido, se coloca en una cubeta de cristal de cuarzo y se sumerge en el mismo CUBIC-R que se usó para igualar los índices de refracción entre la agarosa y el tejido. Es importante que se exactamente el mismo ya que si se sustituye por uno nuevo el índice de refracción volverá a variar entre la agarosa, el tejido y el CUBIC-R, haciendo que la visualización no sea del todo óptima.

El bloque de agarosa se coloca sobre un mecanismo imantado con ayuda de unos pines de entomólogo, el cual está compuesto por dos imanes multipolares, a uno a cada lado de la cubeta de cuarzo. Este mecanismo magnético permite la rotación de la muestra de manera remota con el fin de poder encararla de la mejor manera posible.

La obtención de imágenes se realizó con aumentos de 7,2x (Figura 104) y 4,8x (Figura 112), con un tamaño de píxel respectivo XY = 0,902 y 0,677 μm , y con pasos Z de 2,5 μm . La anchura de la hoja de luz se ajustó para que fuera de 4,5 a 5 μm para la resolución axial. La fluorescencia de tdTomato se excitó con un láser de 561 nm, y se recogió con un filtro de paso de banda BP609/54, y la fluorescencia de GFP se indujo con una línea de 488 nm, recogida con un BP525/50 (filtros Semrock).

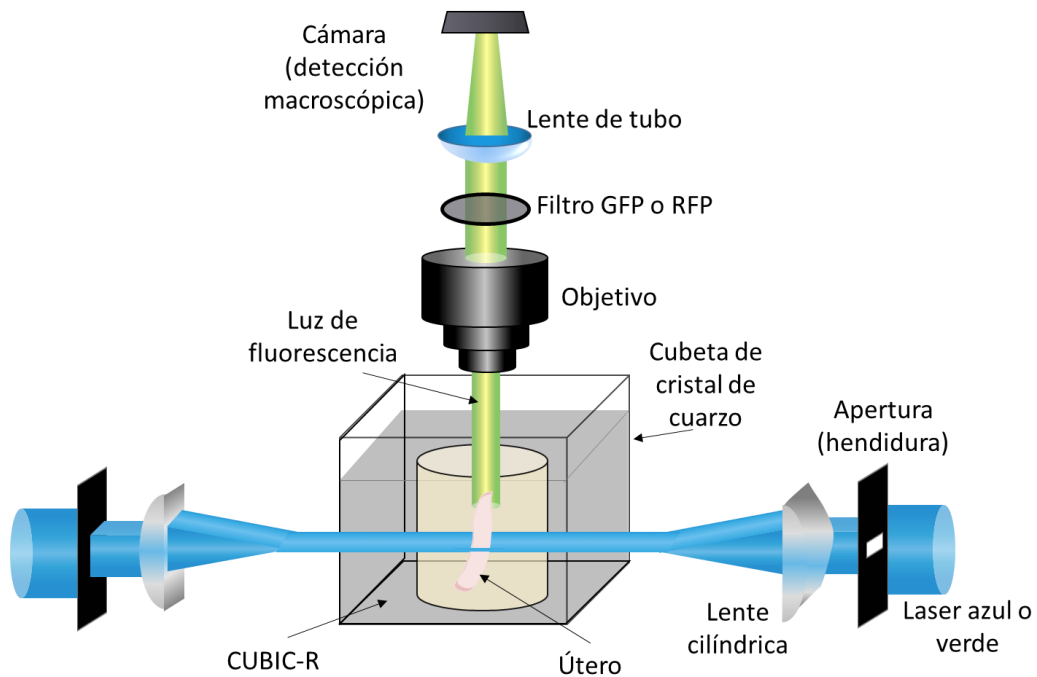


Figura 37. Principio de la ultramicroscopía de fluorescencia en lámina de luz. Donde se aprecia que el bloque de agarosa donde se encuentra retenido el fragmento uterino es excitado mediante microscopía de dos fotones (*two-photon microscopy*). El bloque de agarosa se encuentra en una cubeta de cristal de cuarzo y embebido en el mismo CUBIC-R que se usó para igualar los índices de refracción entre la agarosa y el tejido. Imagen basada en (Dodt et al., 2007).

Las imágenes crudas se procesaron en primer lugar con la macro de código abierto MosaicExplorerJ que se ejecuta en Fiji para el ensamblaje de grandes mosaicos. El procesamiento de imágenes se realizó igualmente con Fiji. La segmentación de las lesiones GFP+ se realizó con una macro personalizada de ImageJ que, en resumen, permite i) generar regiones de interés (ROIs) utilizando una combinación de la herramienta Magic Wand y Lasso cada 10 planos, ii) interpolar entre esas ROIs, y iii) guardar las máscaras en formato tiff de 16bit para su posterior visualización. La visualización tridimensional se realizó con el visor gratuito Imaris Viewer (Bitplane, Oxford Instrument), incluyendo la representación de la superficie en el modo "Normal Shading". Imaris 9.1 (Bitplane, Oxford Instrument) se utilizó únicamente para generar superficies suavizadas de las marcas de las lesiones y los vídeos suplementarios.



RESULTADOS

*"No importa con la lentitud con la que
avances siempre y cuando no te detengas"*

Confucio

1. ESTABLECIMIENTO DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE PTEN Y/O P53 EN EL DESARROLLO TUMORAL DEL ENDOMETRIO

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS ENDOMETRIALES DE ORIGEN EPITELIAL INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *P53*

GENERACIÓN DEL MODELO MURINO CON ABLACIÓN DE *PTEN* Y *P53* EN LAS CÉLULAS EPITELIALES

El carcinoma endometrial humano, un tipo tumoral de origen epitelial, de una manera histológica se divide en dos grupos: tipo I y tipo II. Los carcinomas endometrioides (o de tipo I) son los más frecuentes y representan el 85% de los cánceres de endometrio, los carcinomas no endometrioides (o de tipo II) son menos frecuentes (entre un 15 y un 20% de los CE) pero son tumores mucho más agresivos (Bokhman, 1983; Matias-Guiu and Davidson, 2014). La mutación por excelencia en el primer grupo es *PTEN* (Mutter et al., 2000), mientras que en el segundo lo son las mutaciones en *P53* (H Tashiro et al., 1997; Sherman et al., 1995). El carcinoma endometrioide endometrial se divide en tres grados arquitectónicos, en el de peor pronóstico, el de grado 3, coexisten mutaciones tanto de *PTEN* como de *p53* (Lax et al., 2000).

Así, el primer objetivo de este trabajo fue obtener un modelo inducible que nos permitiera estudiar el papel de *PTEN* y *P53* en el proceso tumoral de las células epiteliales del endometrio. Nos interesaba un modelo inducible, para poder así controlar el momento de la ablación génica de ambos genes. El laboratorio disponía del ratón *knock-out* de *Pten* inducible por tamoxifeno (Cre:ER^T; *PTEN*^{f/f}) (Mirantes et al., 2013a) que expresa de forma constitutiva una proteína de fusión (Cre:ER^T) entre la recombinasa Cre y el receptor de estrógenos, modificado para que responda al tamoxifeno pero no a los estrógenos endógenos del animal. (Explicado con mayor claridad en el apartado de Materiales y métodos). De esta manera se generó un modelo murino Cre:ER^T; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/f} a partir de este ratón inducible y otro modelo que presentaba las secuencias *loxP* insertadas en los intrones 1 y 10 del gen *Trp53* (*P53*^{floxed/floxed}, *P53*^{f/f}) (Jonkers et al., 2001; Marino et al., 2000). Por lo tanto, cuando se estimula el sistema Cre con tamoxifeno, se producirá la ausencia total de la proteína *PTEN* y/o la proteína *p53* en las células epiteliales del endometrio. Como se puede ver en la figura 38, se siguió un protocolo de tres cruces, utilizando como fundadores los ratones con genotipos Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f} y *P53*^{f/f}. De esta manera obtuvimos ratones con el genotipo deseado Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/f}, ratones donde con pérdida bialélica de *Pten* pero monoalélica de *Trp53* (Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/+}), sus controles Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{+/+} donde solo se altera la expresión de *Pten*, y Cre:ER^{T-/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/f} que se usaron como control sin alteraciones. Para conseguir ratones con el mismo fondo genético (*background*) que perdieran solamente la expresión del gen

Trp53 se realizaron cruces entre las F1 hasta dar con la colonia $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}$ y su control $Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}$.

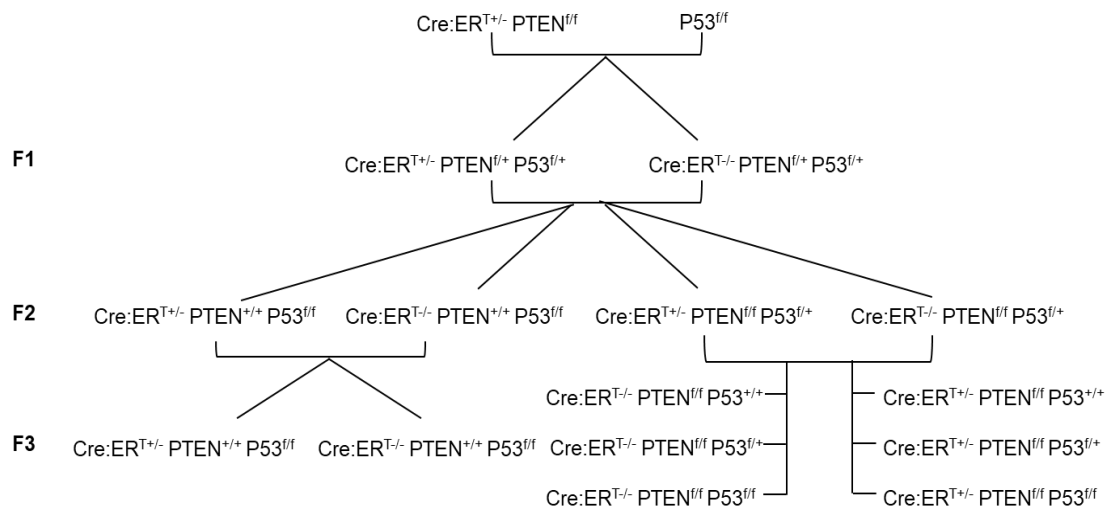


Figura 38: Estrategia de cría para la generación de modelos murinos $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ (*double knock-out, dKo*), $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}$ (*Pten knock-out, PTENKO*) y $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}$ (*Trp53 knock-out, p53KO*).

LA INYECCIÓN DE TAMOXIFENO INDUCE LA PÉRDIDA DE PTEN Y P53 EN LOS RATONES $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$

Tras establecer las colonias y obtener animales con los genotipos de interés, el siguiente paso fue comprobar la pérdida de expresión en el endometrio de los genes de interés en nuestro modelo al inducir la ablación genética mediada por tamoxifeno.

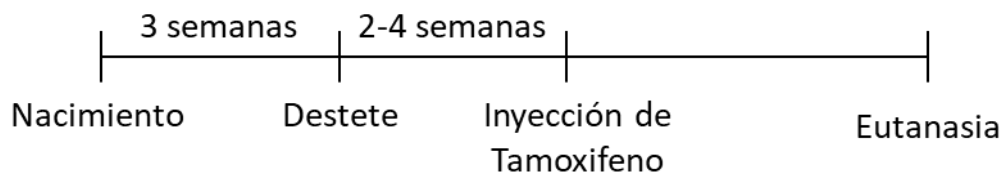


Figura 39. Diseño experimental para el análisis de los animales de la colonia *Cre PTEN p53*. De manera resumida, los ratones de todos los genotipos reciben una única dosis de Tamoxifeno vía intraperitoneal entre las 5-7 semanas de vida. Los animales son sacrificados tras una monitorización exhaustiva hasta que requieren de eutanasia post-tratamiento.

Así, tras seguir el modelo experimental que se muestra en la figura 39, a las 6 semanas tras la administración de la monodosis de tamoxifeno (0,5mg/raton), mediante una prueba inmunohistoquímica se observa una bajada en la expresión de la proteína PTEN en los animales $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}$ y $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ con respecto a los animales que no presentan alteraciones en este gen (Figura 40). No conseguimos ningún anticuerpo para la detección inmunohistoquímica de p53 murino.

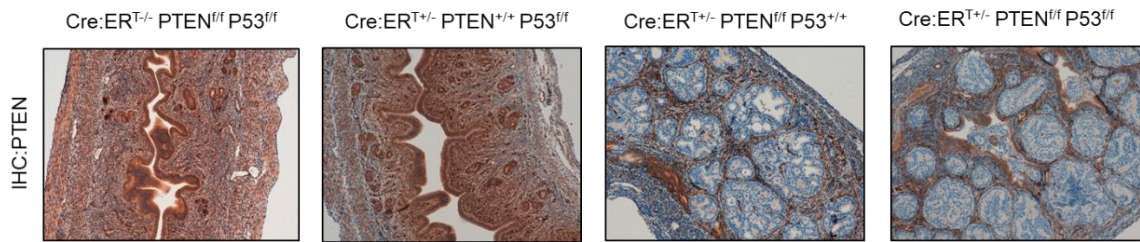


Figura 40. La inyección de tamoxifeno induce la pérdida de *PTEN* y de *p53* de forma eficiente en un patrón mosaico. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de PTEN de endometrios Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} 6 semanas después del tratamiento con Tamoxifeno, obtenidas a 10x..

LA PÉRDIDA DE *PTEN* EN EL EPITELIO ENDOMETRIAL EN EL MODELO CRE:ER^T PROVOCA EL DESARROLLO DE HIPERPLASIAS Y ADENOCARCINOMAS *IN SITU* DE MANERA EFICIENTE Y RÁPIDA INDEPENDIEMENTE DE P53.

En primer lugar, evaluamos las consecuencias de la pérdida de *Pten* y *p53* en el endometrio. Para ello se administró tamoxifeno a hembras de 5 semanas de edad y se estableció tres franjas temporales en las cuales fueron sacrificadas: 1-2 semanas, 3-4 semanas y 5-6 semanas post-inyección. En todos los casos se llevó a cabo un estudio patológico mediante tinción de hematoxilina/eosina (H&E). Como se puede observar en la figura 41, en las primeras dos semanas tras la activación del sistema, no se detectó ningún tipo de anomalía histológica ni morfológica. No obstante, estas anomalías se hicieron presentes con el transcurso de las semanas. En el segundo periodo temporal, a partir de la tercera semana, un 30% de los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} desarrollaron hiperplasias complejas, mientras que alrededor de un 50-55% de los ratones presentaban hiperplasia con atipia compleja y adenocarcinomas endometriales *in situ*, también denominados EIN (del inglés, *endometrial intraepithelial neoplasia*). Finalmente, a partir de la 5 semana, casi la totalidad de los ratones que había sufrido la ablación de *Pten* presentaban adenocarcinomas de bajo grado en el endometrio de una manera independiente a la pérdida o no de la expresión de *p53*. Así, las diferencias histológicas observadas entre los genotipos experimentales que presentaban alteraciones en la expresión de *Pten* no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los grupos de estudio. Si bien se intentó extender el estudio más tiempo, no fue posible, ya que la totalidad de los animales que presentaban ablación de *Pten* o *Pten* y *p53* requirieron eutanasia a las 8 y 6 semanas tras la administración de tamoxifeno respectivamente. Entre los signos de la enfermedad predominan dificultades respiratorias severas, letargo y anorexia.

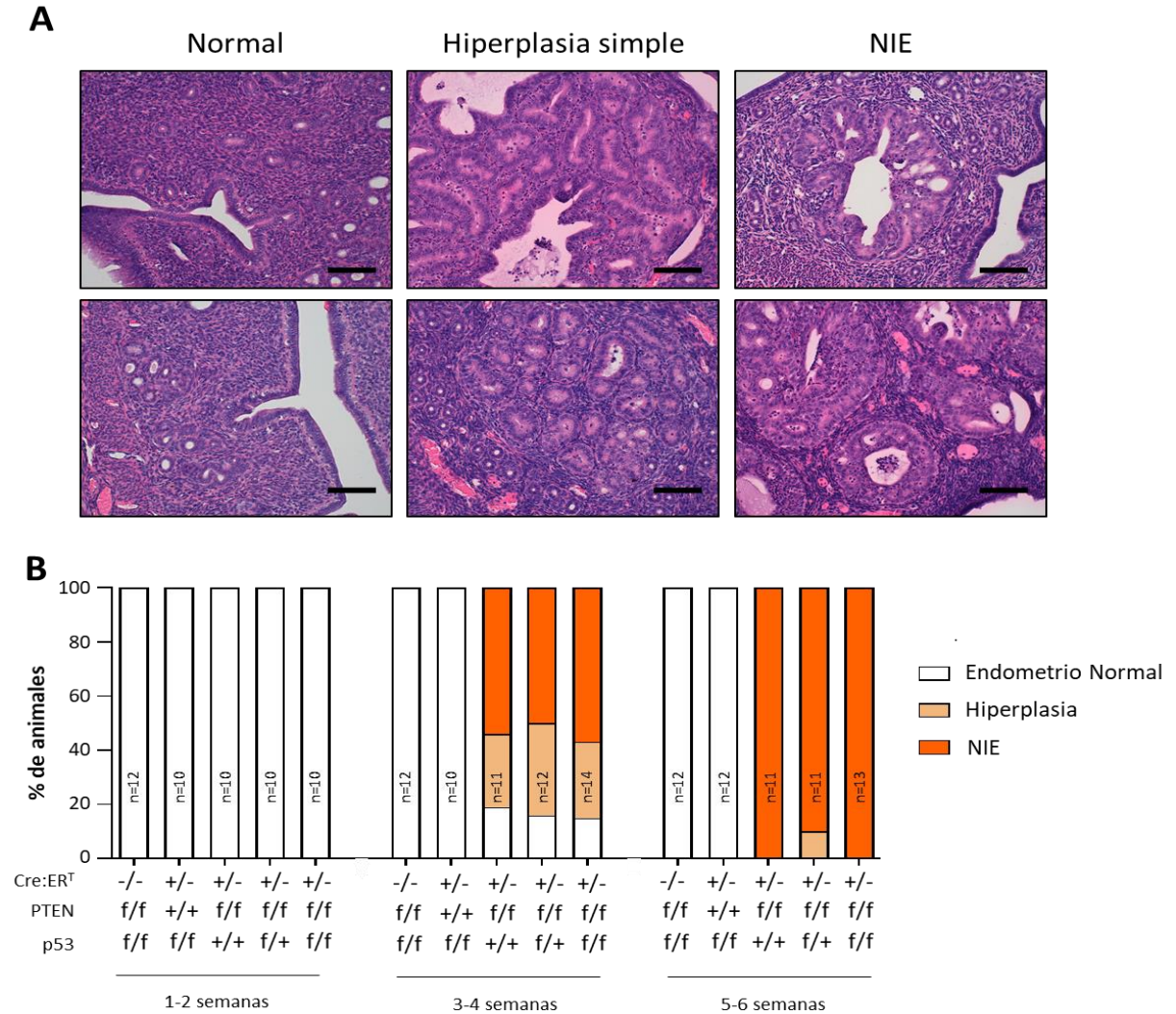


Figura 41. La pérdida monoalélica y bialélica de *p53* en los tumores epiteliales endometriales deficientes de *PTEN* no incrementan ni acelera la progresión tumoral en el modelo *Cre:ER^{T+/+}*. (A) Imágenes ejemplificativas de la tinción con hematoxilina-eosina de las distintas lesiones encontradas en los úteros de los ratones *Cre:ER^{T-/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{f/f}*, *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{+/+}*; *P53^{f/f}*, *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{+/+}* y *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{f/f}* a las distintas semanas tras la administración con tamoxifeno. Imágenes a 20x. Barras de 100µm (B) Cuantificación de las lesiones diagnosticadas en los úteros de los ratones a cada franja temporal tras la administración de tamoxifeno. No se observan diferencias estadísticas según el análisis de χ^2 . NIE; Neoplasia Intraepitelial Endometrial.

Además, mediante la tinción con Ki-67, se demostró que las lesiones presentes en el endometrio de los ratones *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{+/+}*, *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{f/+}* y *Cre:ER^{T+/-}*; *PTEN^{f/f}*; *P53^{f/f}* presentaban el mismo nivel de expresión del marcador de proliferación a las 6 semanas tras la ablación génica, y que por tanto, a este periodo temporal, la ausencia de *p53* no ejercía ningún efecto en la proliferación de estos tumores.

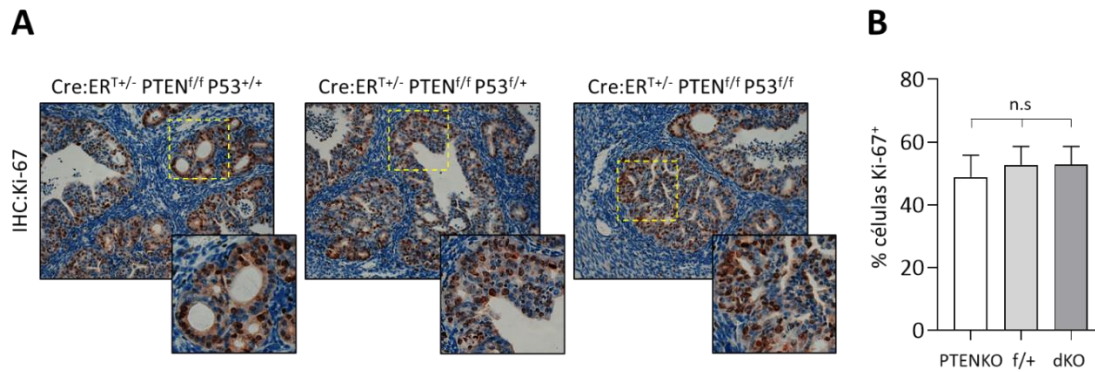


Figura 41. La falta de p53 no induce un efecto pro-proliferativo en los tumores endometriales deficientes de PTEN a las 6 semanas de delección génica. (A) Imágenes representativas de la tinción con Ki-67 de los tumores endometriales de ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (20x). **(B)** Cuantificación de la tinción de Ki-67. Los datos provienen de n=6 animales por cada grupo y los valores se expresan como la media ± s.e.m. No se observan diferencias según el análisis t-test.

LA PÉRDIDA DE *P53* EN EL MODELO CRE:ER^T EN EL EPITELIO ENDOMETRIAL DE ENDOMETRIO NORMALES Y ATRÓFICOS NO PROVOCA ALTERACIONES HISTOLÓGICAS ENDOMETRIALES PATOLÓGICAS

Sorprendentemente, y contrariamente a lo esperado, los ratones *knock-out* para *p53*, la principal mutación en los CE de tipo II (*H Tashiro et al., 1997*), no presentaron ninguna alteración patológica en ninguno de los tramos temporales marcados (figura 41). En este caso, se prolongó el estudio hasta transcurridas 70 semanas tras la inyección intraperitoneal del tamoxifeno. Dado que el CE de tipo II se da en mujeres postmenopáusicas (*Talwar et al., 2021*), como se muestra en la figura 42, se quiso mimetizar el endometrio atrófico mediante la extirpación de los dos ovarios en las ratonas antes o después de la administración del tamoxifeno (0,5mg/ratón). En ninguno de los casos, tras un estudio histopatológico de los endometrios de 6 ratonas de cada grupo, se observó desarrollo de ninguna patología endometrial, más allá de una cierta atrofia endometrial debida a la ovariectomía independientemente de la alteración o no de la expresión de *p53*.

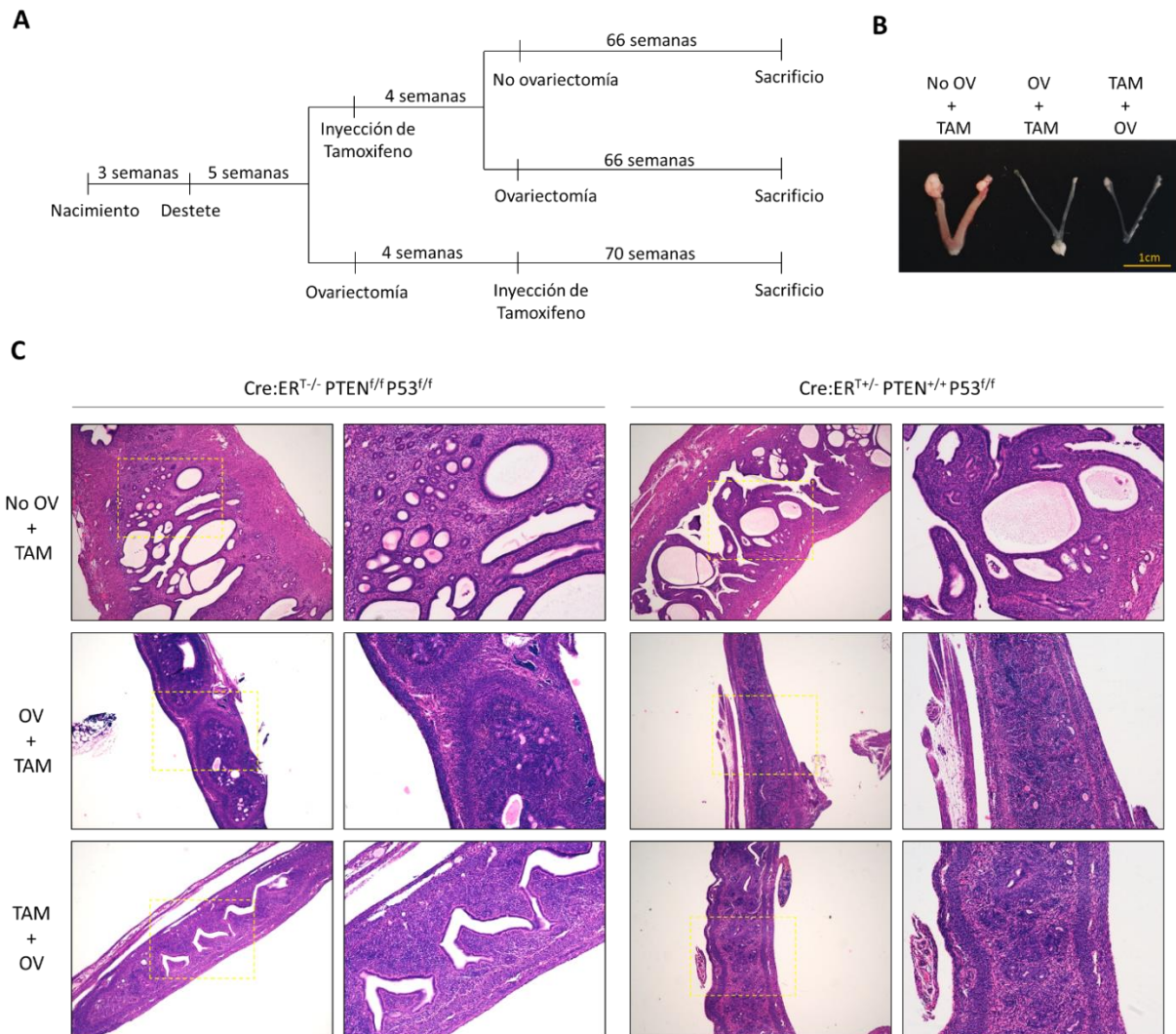


Figura 42. La pérdida exclusiva de $p53$ en el epitelio endometrial no genera lesiones endometriales. (A) Diseño experimental para el análisis de la ablación de $p53$ en endometrios atróficos y no atróficos. **(B)** Imagen macroscópica representativa de los endometrios de las ratonas no ovariectomizadas (No OV+TAM) y ovariectomizadas pre (OV+TAM) y post tamoxifeno (TAM+OV) independientemente del genotipo **(C)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los endometrios de ratonas Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/-}; P53^{f/f} tras 70 semanas de la administración de tamoxifeno (TAM) habiendo sido extirpados (OV) o no (No OV) sus ovarios de manera quirúrgica antes (OV+TAM) o después (TAM+OV) de la inyección del fármaco. Imágenes a 4x y 10x. (n=6/grupo)

LOS ANIMALES QUE PRESENTAN ABLACIÓN DE *p53* Y *PTEN* PRESENTAN UNA PEOR PROGNOSIS QUE EN LOS QUE SOLO SE ALTERA LA EXPRESIÓN DE *PTEN*.

El siguiente paso en nuestro estudio fue la evaluación de la supervivencia de los distintos genotipos tras la activación del sistema recombinasa. Para ello, se administró tamoxifeno a hembras de 5-7 semanas de edad y se estableció un seguimiento diario del estado de los animales. A pesar de que se ha demostrado que el fondo genético de los ratones afecta al desarrollo de los tumores inducidos por la pérdida de *Pten* (Freeman et al., 2006), al igual que en el modelo de la colonia Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f} descrito en (Mirantes et al., 2013a), el grueso de los animales Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}, que solo presentan ablación en *Pten*, requieren eutanasia entre las 6 y las 8 semanas después de la administración de tamoxifeno. Así mismo, en el caso de los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} tras la monitorización exhaustiva de su estado de salud, se observó que requerían eutanasia aparentemente antes que el resto de grupos estudiados (Figura 43). Utilizando el test de Log-rank (Mantel-Cox) para analizar la supervivencia solo aparece significancia entre el grupo Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y no con respecto al grupo Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (aunque exista la misma tendencia) puesto que uno de los ratones que se presentará más adelante sobrevivió hasta la semana 10 tras la ablación de *Pten* y *p53* (si se eliminaba este ratón la diferencia entre estos grupos sí que era significativa). Por otro lado, los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} y Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} no requirieron eutanasia en ningún momento y fueron sacrificados al cabo de 15 semanas tras la determinación de conclusión del experimento (Figura 43).

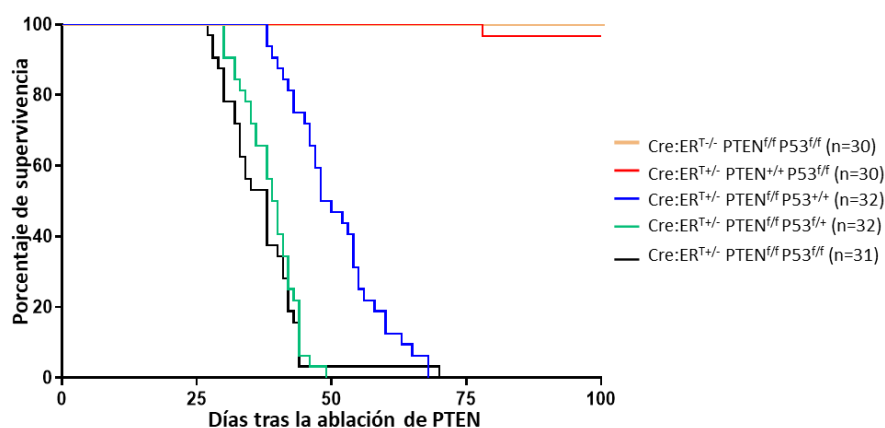


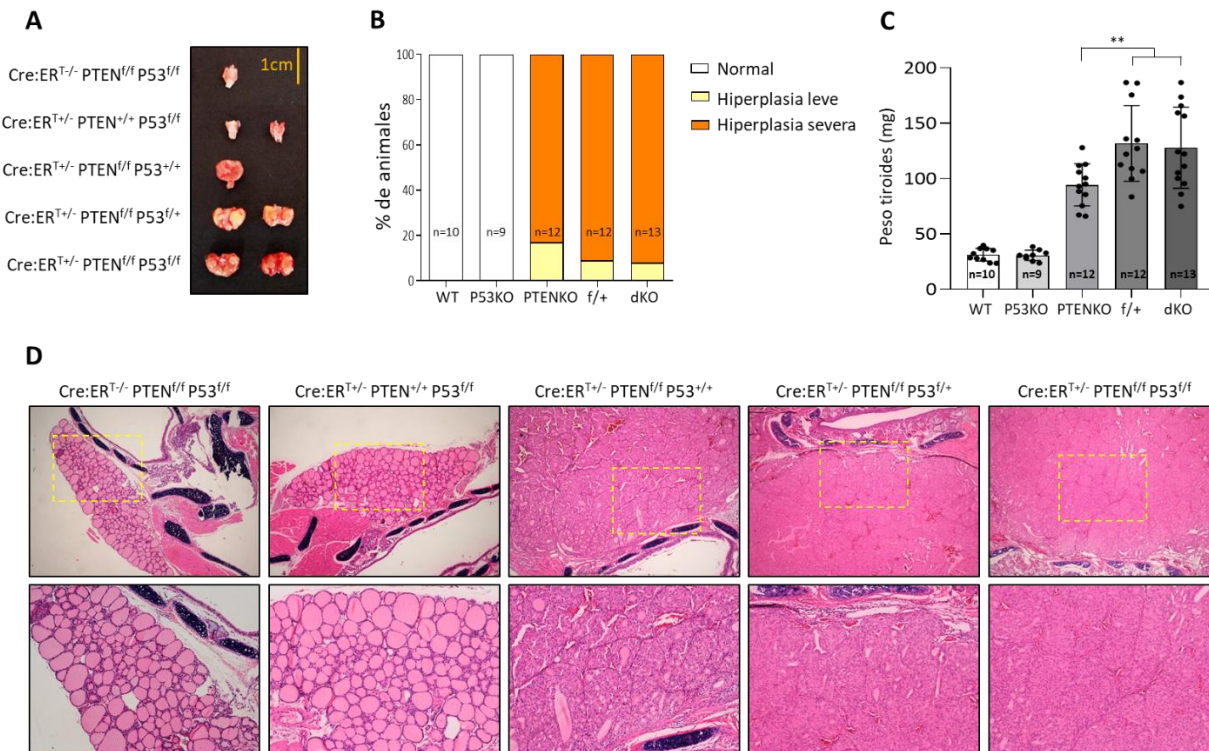
Figura 43. Los animales que presentan ablación de *p53* y *Pten* presentan una peor prognosis que en los que solo se altera la expresión de *Pten*. Representación gráfica Kaplan-Meier mostrando la supervivencia de los animales Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO). Solo entre el grupo f/+ y PTENKO existe una p-value<0.01. Estadística realizada con el test de Log-rank (Mantel-Cox).

LA INYECCIÓN DE TAMOXIFENO INDUCE RECOMBINACIÓN EN DIVERSOS TEJIDOS EPITELIALES Y NO EPITELIALES.

Como se explica en la introducción, el modelo murino Cre:ER^T presenta actividad recombinasa tras la administración de tamoxifeno fuera del epitelio endometrial, como por ejemplo las células foliculares de la tiroides (Mirantes et al., 2013a). Así, al igual que en la colonia Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} de este estudio, en nuestro caso, tal y como se observa en la figura 44, a las 5-6 semanas tras la activación del sistema recombinasa, el 100% de los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} desarrollaron tiromegalia e hiperplasias foliculares nodulares en la tiroides, al igual que lo hicieron los ratones de los grupos Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}. En ninguno de los casos se observó carcinomas con invasión de la cápsula, aunque si se percibió un aumento significativo en el peso de las tiroides en aquellos casos donde además de la expresión de *Pten*, se modificaba la expresión de *p53*.

No obstante, es importante destacar que el efecto de la ausencia exclusiva de *p53* en las tiroides en los animales que conservaban la expresión de *Pten* no desencadenaron ningún tipo de patología tiroidea, ya en el grupo Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} no se detectaron diferencias macroscópicas ni histológicas en comparación con el grupo sin alteraciones.

Figura 44. La pérdida monoalélica y bialélica de *p53* incrementa el peso de la tiroides, pero no agrava la patología debida a la pérdida de *Pten*. (A) Imagen macroscópica de la comparación del tamaño entre tiroides de los animales Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO) a las 5-6 semanas tras la administración de tamoxifeno. (B) Cuantificación de la evaluación de las lesiones diagnosticadas entre los 5 genotipos experimentales. No se observan diferencias estadísticas según el análisis de χ^2 . En cada columna se indica el número de ratones usados en dicho grupo (C) Cuantificación del peso de la tiroides a las 5-6 semanas de la inyección con tamoxifeno, indicando un aumento significativo debido a la alteración de la expresión de *p53* en ratones *knock-out* para *Pten*. En cada columna se indica el número de ratones usados en dicho grupo (**p-value<0,01 obtenido mediante χ^2). (D) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de las tiroides de los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO) a las 5-6 semanas tras la ablación génica (4x y 10x).



Por otro lado, como se describe anteriormente, la inyección de tamoxifeno el modelo murino Cre:ER^T mT/mG^{f/f} reveló la actividad recombinasa de forma ubicua en numerosos tejidos (Mirantes et al., 2013a). Así, además del endometrio y la tiroides, la activación del sistema de recombinación se da en células epiteliales en otros tejidos como pulmón, colon, hígado y riñón, pero no en células estromales de los mismos, ni en órganos linfoides como lo son la médula ósea, el bazo y ganglios. De igual manera que en este estudio, como se presenta en las figuras 44-46, la delección de *Pten*, salvo en la tiroides y colon, en otros órganos no generó neoplasias o alteraciones histopatológicas de otro tipo en ninguno de ellos a las 5-6 semanas tras la administración de tamoxifeno. En cambio, los modelos Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, donde además de la modificación de la expresión de *Pten* se alteraba la expresión del supresor tumoral *Trp53* presentaron alteraciones histopatológicas en el resto de tejidos, posibles causantes del motivo del adelanto de requerimiento de la eutanasia (Figura 43). Así, como se muestra en la figura 45 estos dos grupos desencadenaron a nivel de hígado hepatomegalias y displasias en los hepatocitos, con hipertrofia celular (aumento celular), pleomorfismos nucleares y células multinucleadas, adenomas colorrectales (presencia de pólipos en el colon) e hiperplasia en la médula de la glándula suprarrenal (no mostrado en la imagen).

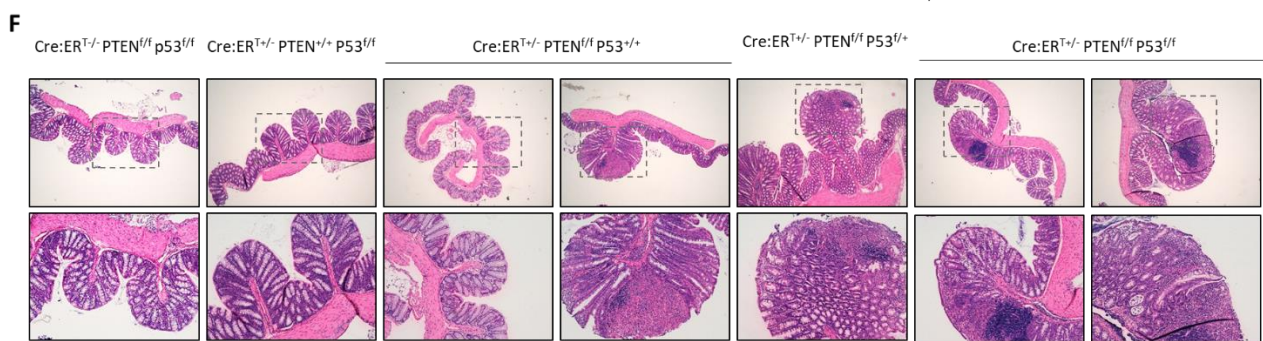
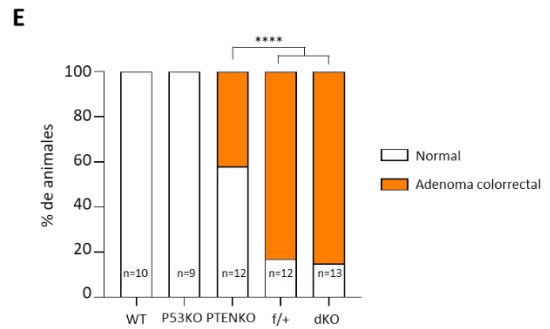
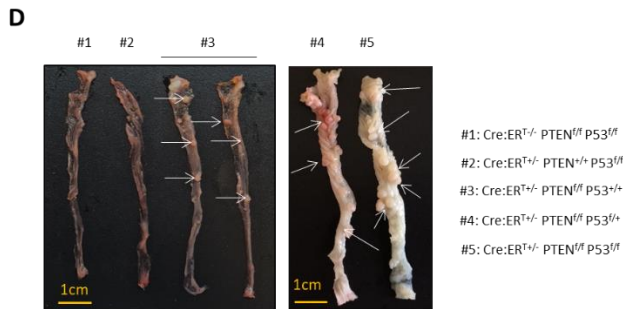
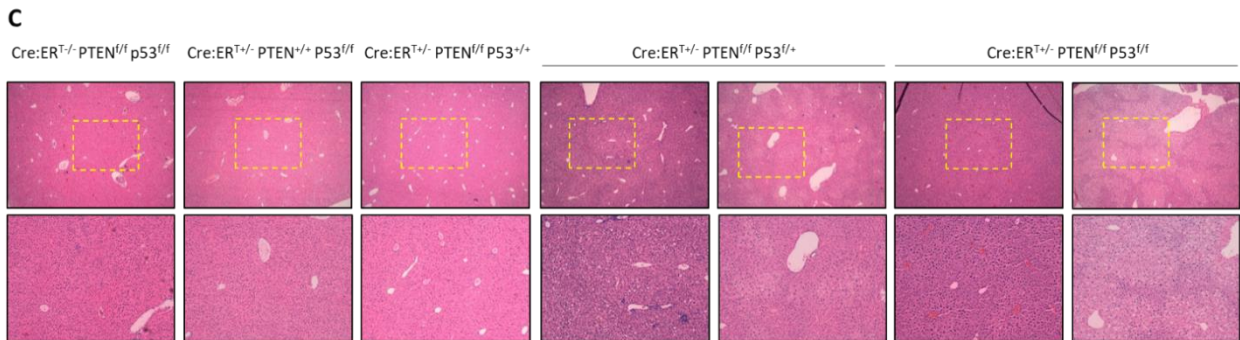
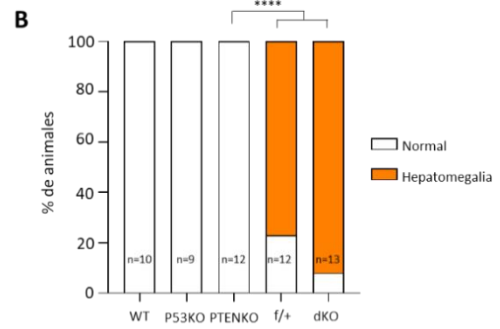
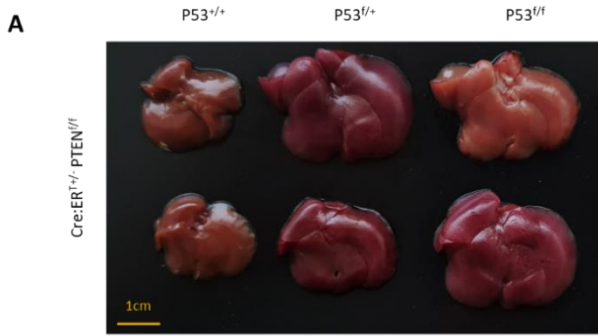


Figura 45. La pérdida monoalélica y bialélica de *p53* induce lesiones en el hígado y colon en ratones *knock-out para Pten* (A) Comparación del tamaño entre los hígados de los animales Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO) a las 5-6 semanas tras la administración de tamoxifeno. (B) Cuantificación de la evaluación de las lesiones diagnosticadas entre los 5 genotipos experimentales. (****p-value<0,0001 obtenido mediante χ^2). En cada columna se indica el número de ratones usados en dicho grupo. (C) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los hígados de los ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}(P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO). Imágenes a 4x y a 10x. (D) Imágenes macroscópicas de los cólores de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}(P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO). Las flechas señalan las zonas donde se observan lesiones en los ratones PTENKO, f/+ y dKO. (E) Cuantificación del número de ratones que presentan lesiones en el colon de cada grupo (****p-value<0,0001 obtenido mediante χ^2). En cada columna se indica el número de ratones usados en dicho grupo. (F) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de colon de los ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}(P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO). Imágenes a 4x y a 10x.

Además, posiblemente debido al cambio del fondo genético de nuestro modelo, contrariamente a lo que ocurría en el modelo original, en los dos grupos donde se modula la expresión de *Pten* y *p53*, la expresión de ambos genes se veía alterada también en el tejido hematopoyético, desencadenando entorno al 70% esplenomegalia y linfomas primario de alto grado en el bazo. Lo que conlleva a linfomas clonales de células hematopoyéticas infiltrantes en los riñones, hígados, pulmones en muchos de los casos estudiados (Figura 46).

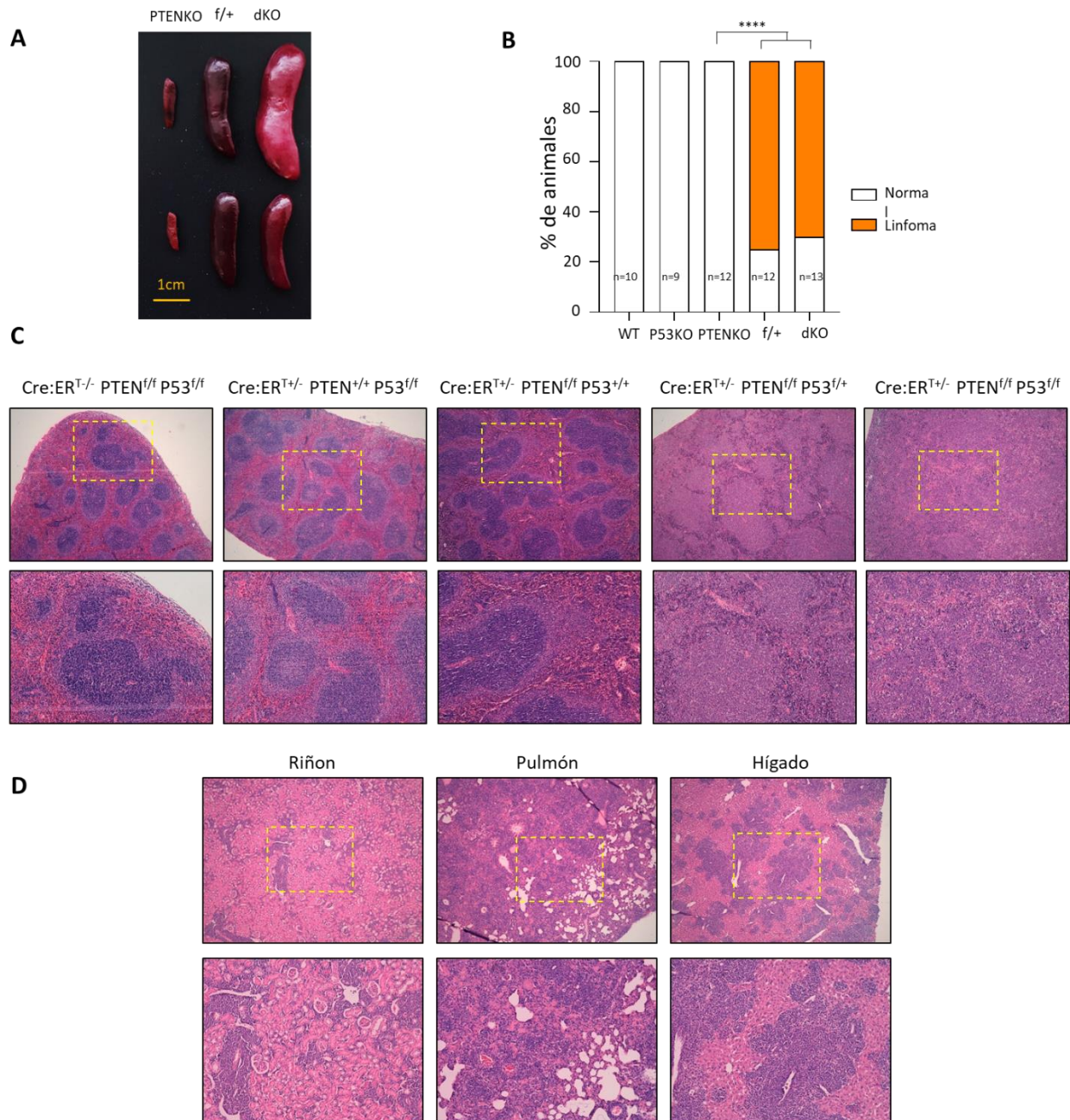


Figura 46. La pérdida monoalélica y bialélica de *p53* induce lesiones en el tejido hematopoyético en ratones *knock-out* para *Pten* (A) Imagen macroscópica de la comparación de tamaño de los bazo de los animales Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO) a las 5-6 semanas tras la administración de tamoxifeno. (B) Cuantificación de la evaluación de las lesiones diagnosticadas entre los 5 genotipos experimentales. (****p-value<0,0001 obtenido mediante χ^2). En cada columna se indica el número de ratones usados en dicho grupo. (C) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los bazo de los ratones Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^T/-; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}(P53KO), Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO), Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/+}(f/+) y Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}(dKO). Imágenes a 4x y a 10x. (D) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los animales Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^T/-; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} que presentan infiltraciones de las células hematopoyéticas en riñón (izquierda), pulmón (medio) e hígado (derecha). Imágenes a 4x y a 10x.

LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y *P53* EN EL EPITELIO ENDOMETRIAL EN EL MODELO Cre:ER^T GENERÓ UN CASO DE CARCINOMA ENDOMETRIAL ENDOMETRIOIDE DE ALTO GRADO INVASIVO.

Con todo, como se muestra en la figura 43 uno de los ratones estudiados del grupo Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} presentó en grado menor las patologías alienas al endometrio presentadas en el apartado anterior. Por consiguiente, este ratón superó en varias semanas la esperanza de vida de sus compañeros de grupo. A pesar de ser un solo caso, y no ser significativo a nivel estadístico, su significancia a nivel histológico sí que lo es, puesto que, al realizarse un análisis patológico del endometrio de este animal, se vio que presentaba una arquitectura más agresiva, correspondiéndose a un CEE de grado 3, caracterizada por una atipia nuclear, nucléolos marcados y una elevada actividad mitótica. En este sentido, tal y como se observa en la figura 47A, se identificaron mediante el estudio patológico empleando tinciones de H&E una serie de zonas donde las células epiteliales tumorales parecían estar invadiendo los vasos sanguíneos, hecho que tiene sentido debido a la mayor agresividad de los CEE de grado 3 con respecto a los de menor grado. Además, para asegurarnos de la procedencia de estas células y de su localización dentro del vaso sanguíneo, mediante una tinción con un marcador nuclear de las células endoteliales conocido como ERG (del inglés, *ETS-related gene*) y con una tinción del receptor de estrógenos (ER, del inglés *estrogen receptor*) que marca las células epiteliales endometriales, se demostró que este ratón presentaba una lesión angioinvasiva en el endometrio (Figura 47B), fenómeno de la progresión tumoral que no se encontró en ningún otro ratón estudiado.

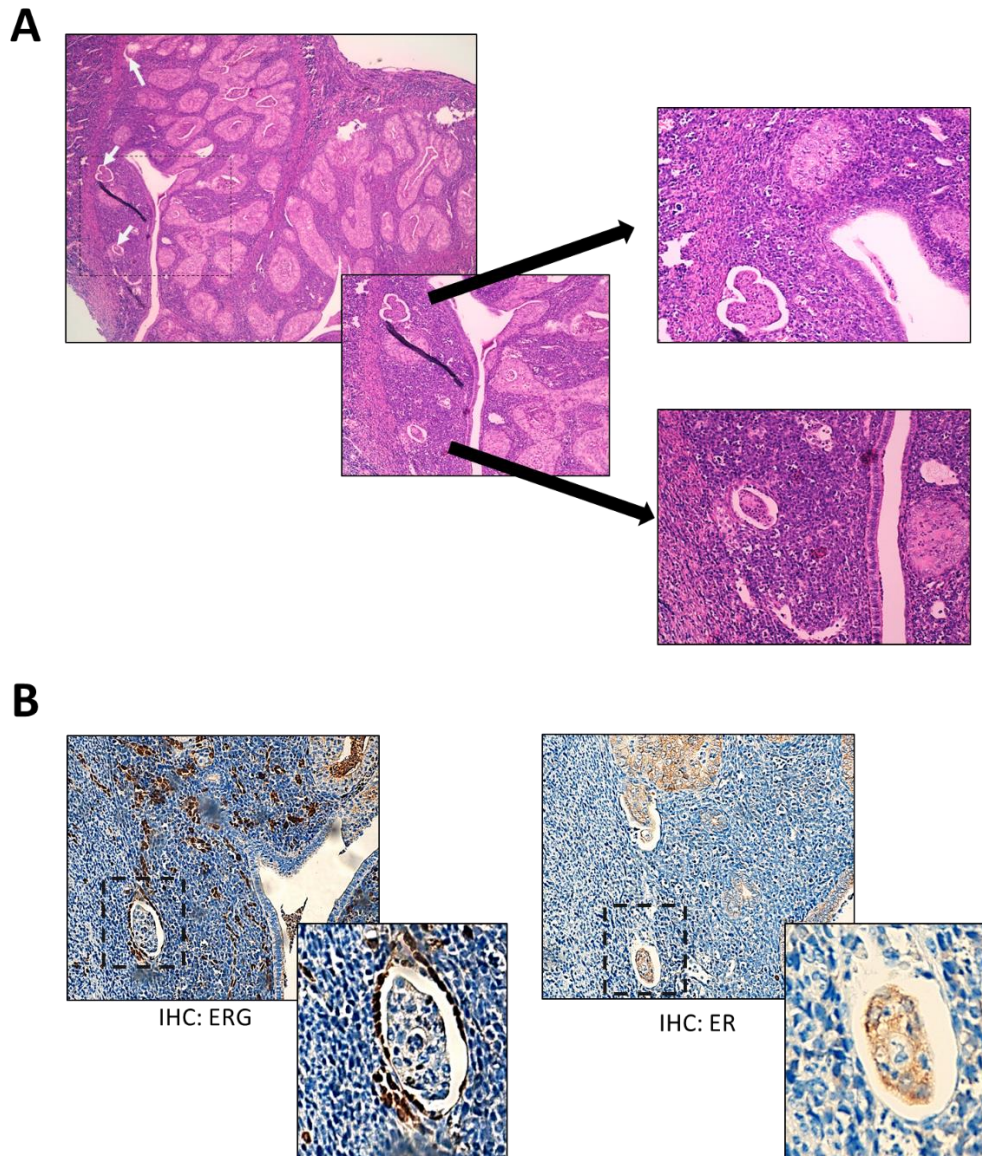


Figura 47. La falta de *Pten* y *p53* induce la angioinvasión del carcinoma endometrial de alto grado. (A) Imágenes representativas de la tinción de H-E del ratón Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} que presento un grado mayor de complejidad de adenocarcinoma endometrial con focos de invasión endotelial (señaladas con flechas blancas) (Imágenes a 4x, ampliaciones a 10x y 20x). **(B)** El estudio inmunohistoquímico con ERG y ER corroboró que las células se encontraban dentro de vasos sanguíneos y eran parte del componente epitelial del endometrio (20x).

LA DELECIÓN *IN VITRO* DE PTEN Y/O P53 EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE LAS CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES MUESTRA UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO EN LAS CÉLULAS DEFICIENTES PARA PTEN Y P53

Después de demostrar *in vivo* que si pudiéramos prescindir del resto de patologías no uterinas, los ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, podían llegar a desarrollar un nivel de progresión tumoral mayor que los Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}, se quiso comprobar si podíamos observar este fenotipo más agresivo en cultivos tridimensionales generados a partir de células epiteliales de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}.

En primer lugar, para comprobar nuestra hipótesis, estudiamos el efecto de la pérdida de expresión de *Pten* y/o *p53* en el tamaño glandular de cultivos tridimensionales generados a partir de células epiteliales de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/-}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/-} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}. Así, mediante la medición del perímetro glandular de los cultivos generados a partir de los 4 genotipos, como se muestra en la figura 48 se concluyó que la pérdida de p53 en las glándulas deficientes también para PTEN desencadenaba un aumento en la medida glandular con respecto a aquellas en las que solo se producía la delección en el segundo gen.

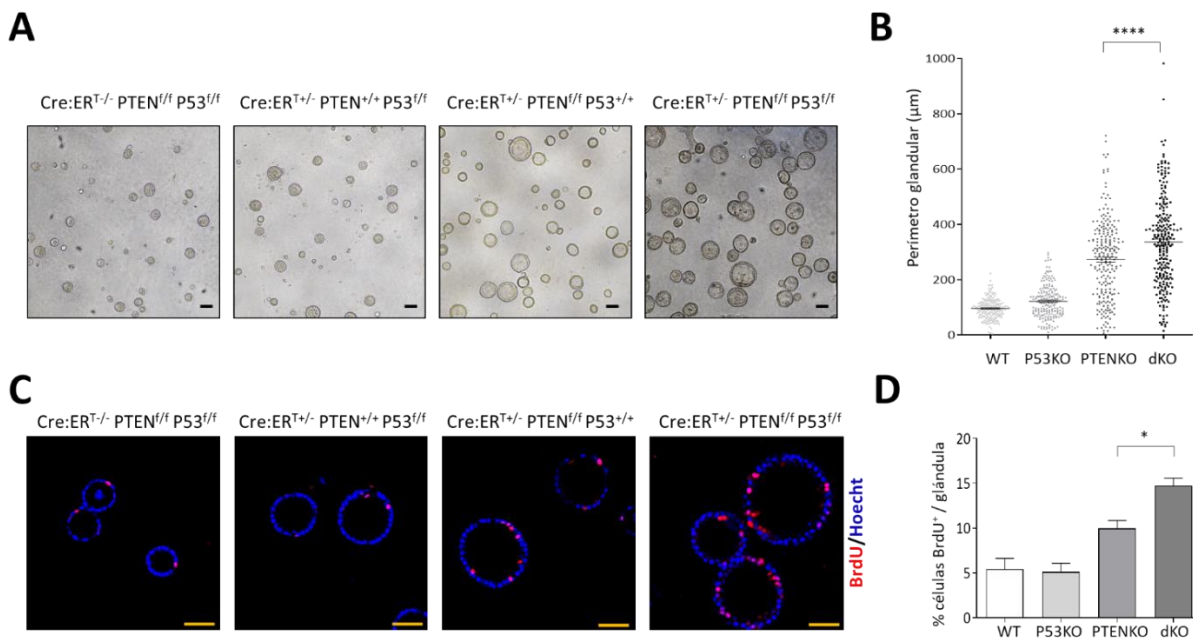
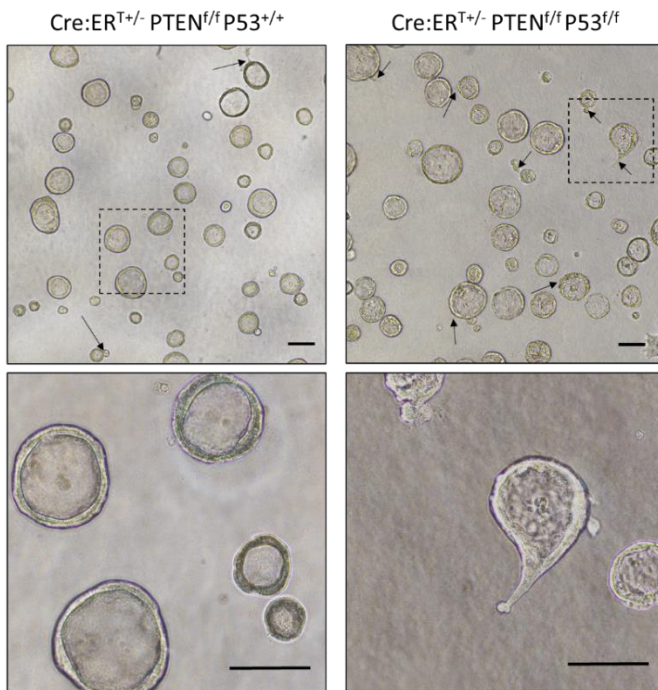
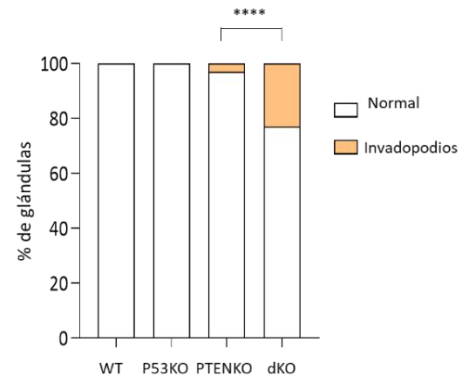


Figura 48. La falta de *Pten* y *p53* induce un aumento en el tamaño glandular y en el número de células que incorporan BrdU en los cultivos tridimensionales. (A) Imágenes representativas de contraste de fase de cultivos 3D de células epiteliales endometriales Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/-}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/-} (PTENKO) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO). Barras: 100μm. (B) Medidas de los perímetros glandulares en μm de los 4 genotipos. Los datos provienen de n=3 experimentos independientes. Las barras de error representan la media ± s.e.m. ****p<0.0001, según el test de comparación múltiple Bonferroni (C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de BrdU en cultivos tridimensionales de células epiteliales de los 4 genotipos (12 horas de incorporación de BrdU) Barras: 50μm. (D) Cuantificación del número de células positivas para la inmunofluorescencia de BrdU por glándula. Los datos provienen de tres experimentos independientes y los valores se expresan como la media ± s.e.m. p*<0.05, análisis one-way ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple Tukey.

A raíz de este descubrimiento, se analizó más en detalle las glándulas obtenidas en cada genotipo y se vio que un 23% de las glándulas de la condición Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} presentaban un fenotipo más invasivo que el resto de condiciones. Así pues, en mayor medida algunas glándulas donde se delecionaba *Pten* y *p53* presentaban glándulas con invadopodios, como se puede ver en la figura 49 donde se muestran algunas de estas glándulas con células con protuberancias asociadas con la degradación de la matriz extracelular en la invasividad del cáncer y la metástasis (Augoff et al., 2020).

A**B****C**

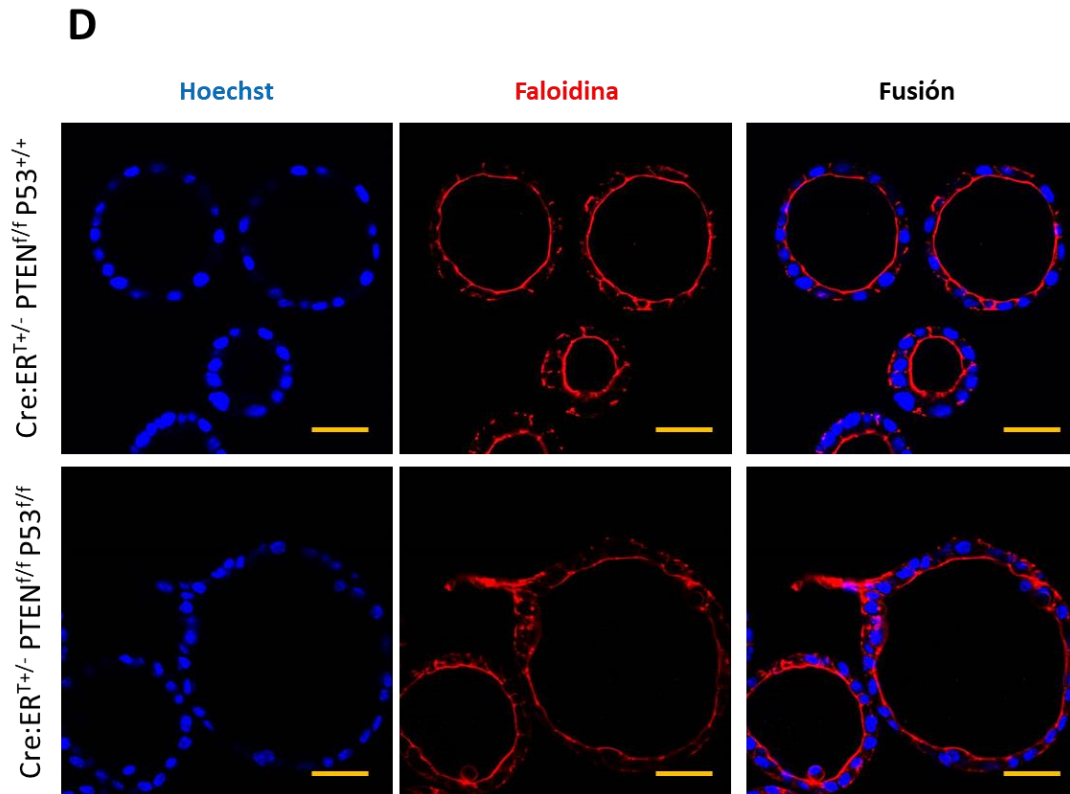


Figura 49. La falta de *Pten* y *p53* induce la formación de invadopodios en los cultivos tridimensionales de células epiteliales endometriales. **(A)** Imágenes representativas de contraste de fase de cultivos 3D de células epiteliales endometriales *knock-out* para *Pten* (izquierda) y *knock-out* para *Pten* y *p53* (derecha) donde se marcan con flechas negras los invadopodios que surgen de las mismas. Abajo, aumento de las glándulas donde se puede apreciar una protuberancia invadiendo la matriz extracelular (Matrigel) en la condición doble *knock-out*. Barras: 100 μ m. **(B)** Cuantificación del número de glándulas que presentan invadopodios en los cultivos 3D de células epiteliales Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO). Los datos provienen de n=3 experimentos independientes donde se contaron alrededor de 100 glándulas por genotipo. ****p<0.0001, según el test exacto de Fisher con estándares corregidos. **(C)** Imágenes representativas de contraste de fase de cultivos 3D de células epiteliales endometriales *knock-out* para *Pten* y *p53* donde se aprecian varios casos de invadopodios. Barras: 100 μ m. **(D)** Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia contra faloidina (rojo) de cultivos 3D PTENKO y dKO. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Barras de 50 μ m.

Para demostrar que estas protuberancias encontradas en los cultivos tridimensionales KO para *Pten* y *p53* eran realmente invadopodios, se llevó a cabo la tinción contra vimentina y citoqueratina de estos cultivos comparándolos con otros PTENKO. Como se observa en la figura 50, a pesar de no observarse una disminución llamativa de la citoqueratina entre genotipos, notablemente los cultivos 3D generados con células dKO presentaban mayor marcaje de Vimentina, destacando en mayor medida en aquellas zonas donde aparecían los invadopodios.

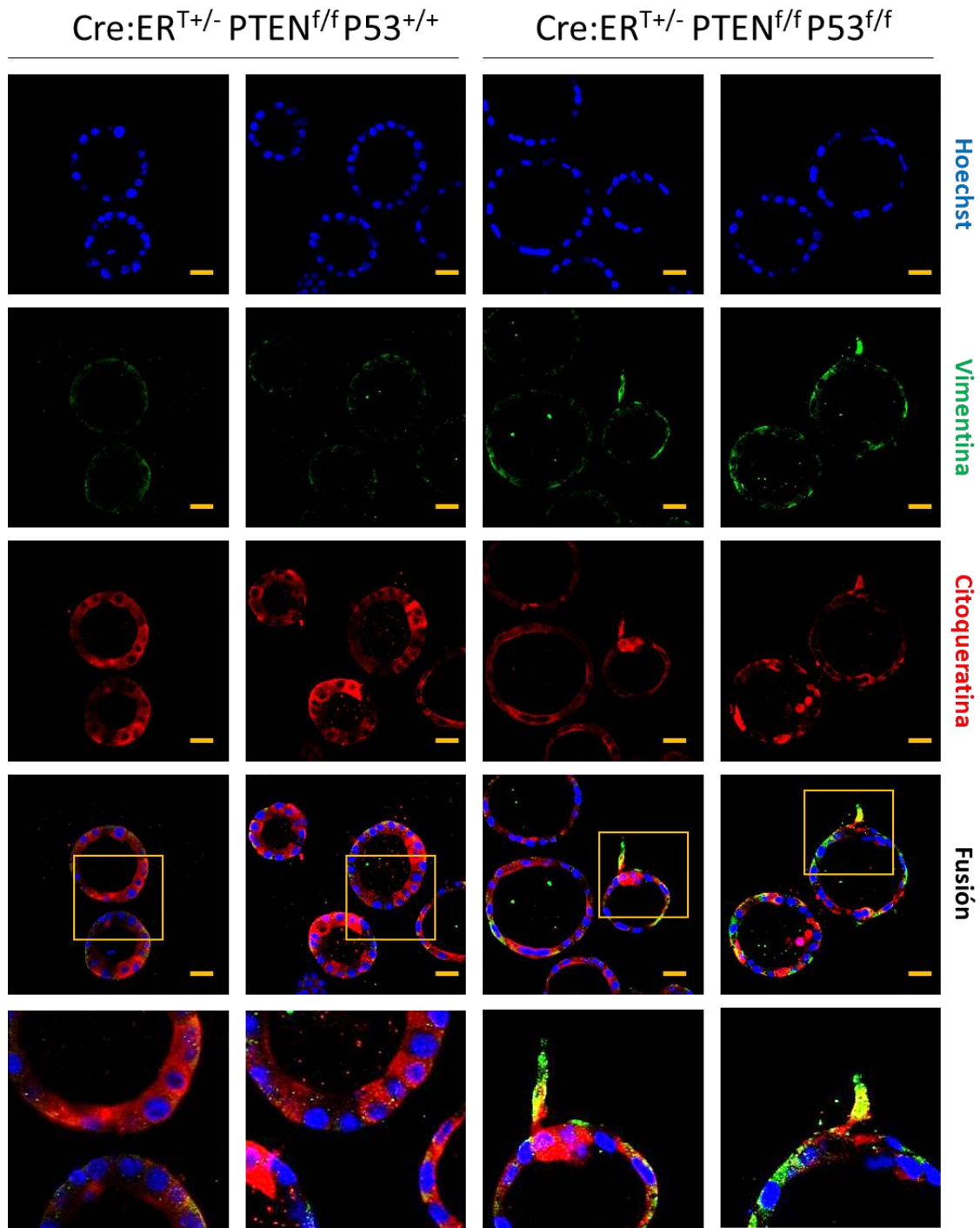
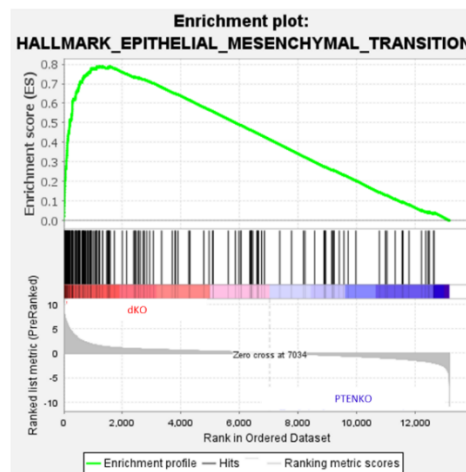


Figura 50. La falta de p53 en cultivos tridimensionales deficientes de PTEN induce la formación de invadopodios que expresan un marcaje positivo para vimentina. (A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra vimentina (verde), citoqueratina (rojo) de cultivos 3D de células epiteliales endometriales provenientes de ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO). Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Barras de 25µm.

Para desentrañar las diferencias a nivel transcriptómico entre los cultivos 3D de células epiteliales PTENKO y dKO, realizamos 3 experimentos independientes y extrajimos RNA total de estos cultivos una vez éstos estaban bien establecidos. Este RNA fue mandado a secuenciar al Centro de

Regulación Genómica (CRG) de Barcelona. Una vez obtenidos los valores de expresión de cada muestra, se introdujeron los datos en la aplicación GSEA, que nos permite realizar un análisis global y preciso a gran escala de los datos recogidos en este tipo de experimentos. De este análisis bioinformático obtuvimos un interesante número de “hallmarks” que se correlacionaban de manera significativa con las dos condiciones introducidas. De manera llamativa, como se muestra en la figura 51, el primero de los marcadores que presentaba una mayor expresión en la condición dKO fue Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT). Para comprobar el resultado del RNA-seq, mediante la técnica de RT-qPCR, analizamos algunos de los marcadores típicos de EMT como son la *vimentina*, la *MMP2*, *Snai1* y *Zeb1* en cultivos tridimensionales WT, PTENKO, P53KO y dKO, de los que concluimos que la pérdida de *p53* era la que de manera significativa hacía que se expresaran marcadores mesenquimales en un *background* tumoral deficiente de *Pten*.

A



B

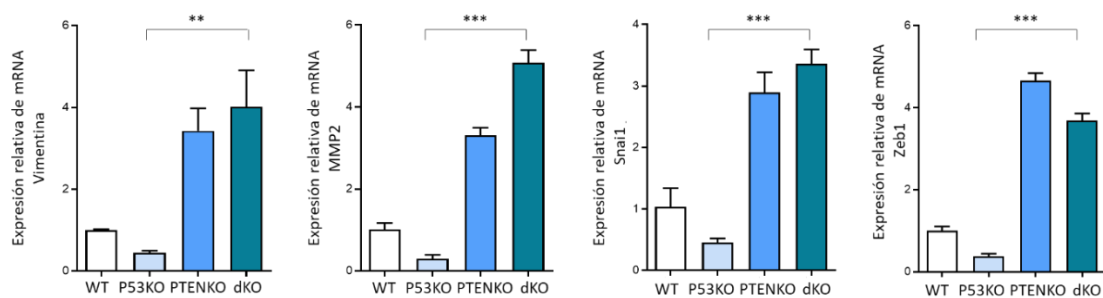


Figura 51. El análisis transcriptómico de los cultivos tridimensionales PTENKO y dKO revela un aumento en la expresión génica de genes relacionados con EMT en los ratones *knock-out* para ambos genes. (A) El análisis transcriptómico fue realizado mediante la introducción de los datos del RNASeq en la aplicación Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) obtenidos mediante la secuenciación de ARN de tres experimentos independientes de muestras de cultivos 3D de células epiteliales *Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}* (PTENKO) y *Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}* (dKO). (B) Análisis por RT-qPCR de la expresión de mRNA de la vimentina, metaloproteinasas de la matriz extracelular 2 (MMP2), *Snai1* y *ZEB1* en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}* (WT), *Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}* (P53KO), *Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}* (PTENKO) y *Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}* (dKO). Los valores se obtienen a partir de una n=2 de un pull de células de 3 ratones por n (preparación de mRNA independiente) y las diferencias estadísticas entre la condición PTENKO y dKO se representan como \pm s.e.m. **p<0.001, ***p<0.0001, según el análisis t-test.

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO *IN VIVO* PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *p53* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO.

Una vez analizado el método clásico de inyección intraperitoneal para realizar la administración del tamoxifeno, y alentados por la aparición de un caso donde la pérdida de *Pten* y *p53* conducía a un fenotipo agresivo. Se procedió a realizar diferentes estrategias para inducir la ablación de los genes de interés de manera específica en las células epiteliales del endometrio, las más significativas de las estrategias empleadas se encuentran recogidas en los siguientes apartados.

LA INOCULACIÓN INTRAVAGINAL DE TAMOXIFENO INDUCE UNA BAJA PENETRANCIA EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA RECOMBINASA EN LAS CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES QUE CONDUCE A LESIONES ENDOMETRIALES

De este modo, primeramente, se procedió con el cambio de táctica de suministración del tamoxifeno. En este sentido, se administraron 0.1 mg de tamoxifeno por animal diluidos en aceite de maíz o en alcohol puro. En todos los casos se siguió la estrategia experimental mostrada en la figura 52 para estudiar la ablación génica tras administrar el tamoxifeno vía inoculación vaginal.

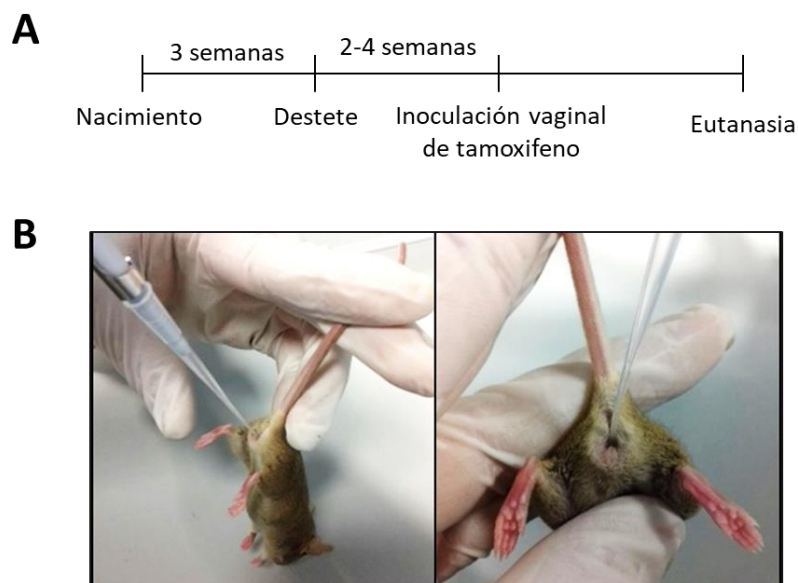


Figura 52. Diseño experimental para el análisis de los animales de la colonia Cre *PTEN* *p53*. (A) De manera resumida, los ratones de todos los genotipos reciben una única dosis de Tamoxifeno vía intravaginal entre las 5-7 semanas de vida. Los animales son sacrificados tras una monitorización exhaustiva hasta que requieren de eutanasia post-tratamiento. (B) Imagen representativa de la inoculación del tamoxifeno vía vaginal.

Seis semanas después, una parte de los ratones fue sacrificada para comprobar el estado histopatológico de los tejidos de dichos animales. Este método de administración del tamoxifeno, reducía notablemente el grado de las lesiones patológicas en los animales Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; *PTEN*^{f/f}; *P53*^{f/f} a nivel de todos los órganos. Como ejemplo, en la figura 53, se puede

apreciar la disminución tanto de tamaño como de gravedad de la lesión en la tiroides de los ratones donde la administración de tamoxifeno se había realizado de manera intravaginal con respecto a los tratados de manera intraperitoneal.

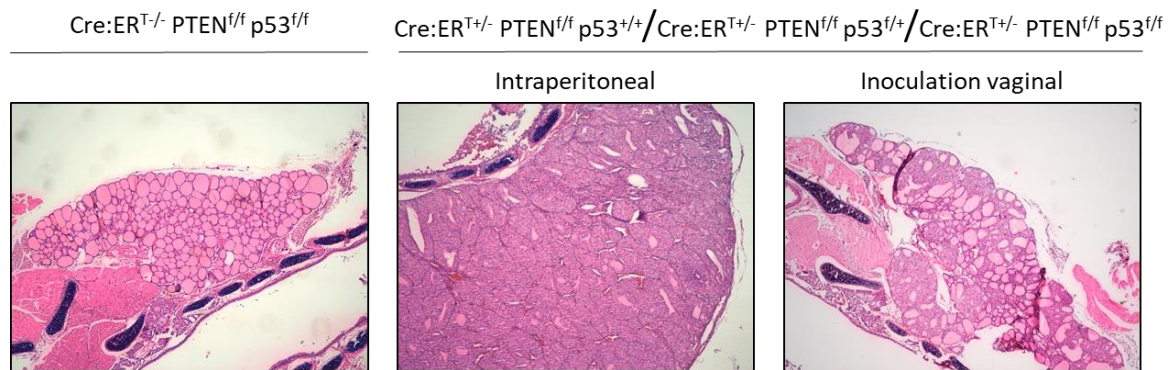


Figura 53. La administración de tamoxifeno por inoculación intravaginal reduce la incidencia de malignidades en los tejidos, como es el caso de la tiroides. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de la tiroides de los ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} con ambos métodos de administración de tamoxifeno. Imágenes a 4x.

Después se realizó una evaluación histopatológica endometrial. En ella, se observó que la penetrancia del fenotipo tumoral a través de esta vía se reducía significativamente, ya que como se muestra la figura 54, solo un grupo reducido de ratones en los tres grupos donde se deleccionaba *Pten* y de manera independiente de la ablación de *p53*, presentaban lesiones en el endometrio de una manera más tardía que en la estrategia de inyección intraperitoneal, ya que estas solo se comprendían de hiperplasias simples. Además, no todos los endometrios presentaban lesiones.

Si bien se trató de extender el estudio en el resto de animales, para tratar de dar tiempo al transcurso del avance tumoral en aquellos animales donde se hubiera producido la ablación génica, no se vieron cambios remarcables en el fenotipo del tumor al dejar envejecer los ratones de todos los grupos hasta las 17 semanas post inyección, ya que apenas unos ratones presentaban neoplasias intraepiteliales endometriales (Figura 54). De este modo, concluimos que, en nuestro modelo, la actividad de la Cre no era del todo efectiva al administrar el tamoxifeno vía vaginal.

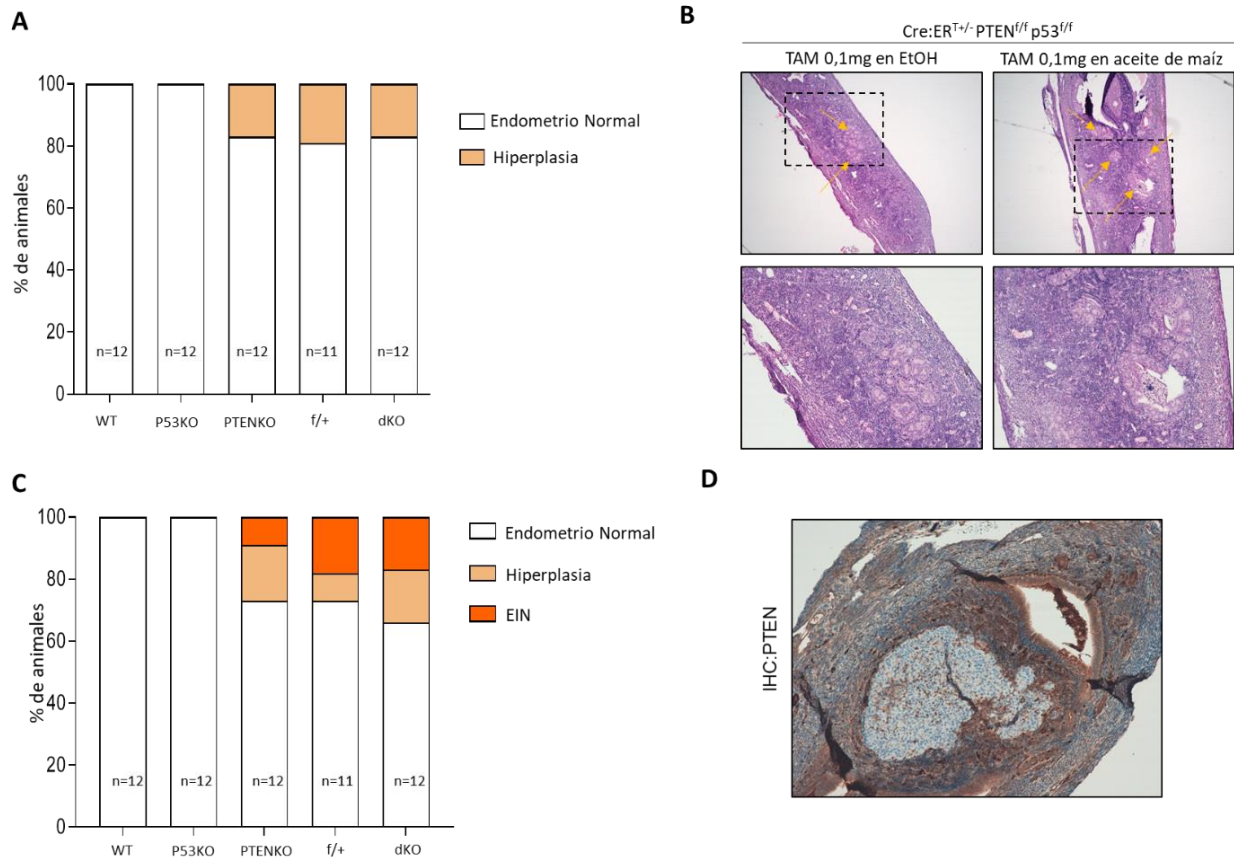


Figura 54. La administración de tamoxifeno por inoculación intravaginal reduce la penetrancia de la ablación génica en el endometrio de ratones Cre:ER^T y la aparición de las lesiones. (A) Cuantificación de la evaluación de las lesiones endometriales diagnosticadas entre los animales Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (WT), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/-}; P53^{f/f} (P53KO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/-} (PTENKO), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/+} (f/+) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO) al inocular el tamoxifeno vía vaginal (sumatorio de los grupos del tamoxifeno diluido en etanol (EtOH) y en aceite de maíz). No se observan diferencias significativas según el análisis de χ^2 . **(B)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los endometrios dKO tratados con tamoxifeno (TAM) diluido en EtOH y aceite de maíz donde se aprecian las hiperplasias endometriales (señaladas con flechas amarillas) a las 6 semanas del tratamiento (4x y 10x). **(C)** Cuantificación de la evaluación de las lesiones endometriales diagnosticadas entre los 5 genotipos a las 12 semanas de la inoculación del TAM (sumatorio de los grupos del tamoxifeno diluido en etanol (EtOH) y en aceite de maíz). No se observan diferencias significativas según el análisis de χ^2 . **(D)** Imágenes representativas de la tinción contra PTEN de los tumores endometriales de ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} a las 12 semanas de la inoculación del TAM donde se aprecia la presencia de neoplasias intraepiteliales endometriales (EIN, del inglés *endometrial intraepithelial neoplasias*) (20x).

Por otra parte, al analizar histológicamente los pulmones de los animales dKO a las 12 semanas de la inoculación del tamoxifeno, mediante un análisis inmunohistoquímico del factor de transcripción 1 de tiroides (TTF1, del inglés thyroid transcription factor-1), un marcador común de los tumores de pulmón, se vio que este método de administración del tamoxifeno resulto efectivo en la generación de neoplasias pulmonares deficientes para *Pten* y *p53* (Figura 55), ya que aunque la actividad Cre presentaba recombinación en el epitelio bronqueolar en el modelo original (Mirantes et al., 2013a) debido al resto de patologías que sufren tras la inyección del tamoxifeno, era imposible alcanzar el tiempo necesario para el surgimiento de nódulos tumorales en el pulmón.

Este tipo de lesiones no se estudiaron en mayor profundidad puesto que no estaban relacionadas con el tema principal que acomete esta tesis.

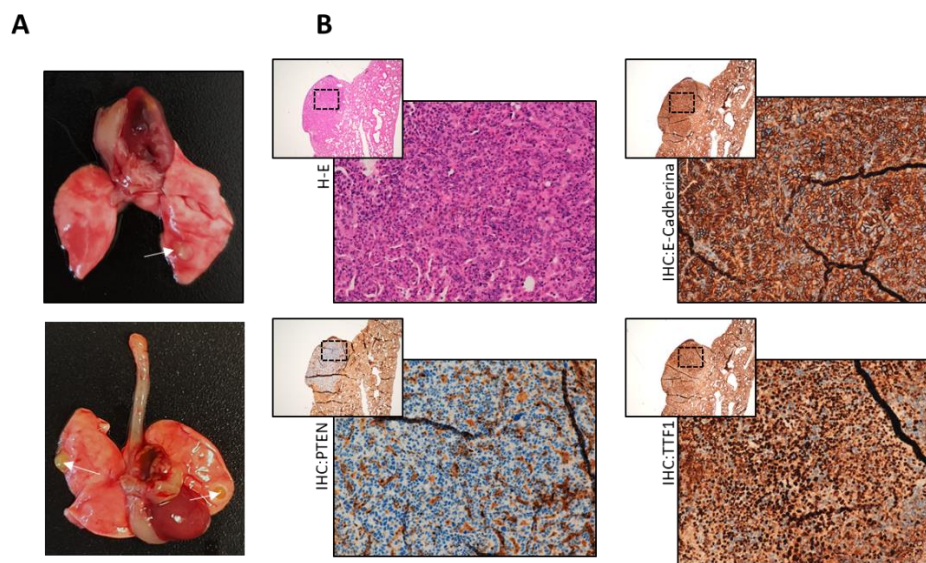


Figura 55. La administración de tamoxifeno por inoculación intravaginal permite la generación de lesiones tumorales en los pulmones deficientes de *Pten* y *p53*. (A) Imágenes macroscópicas de dos de los casos donde los ratones $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ presentaban lesiones tumorales al pulmón. (B) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E), E-Cadherina, PTEN y TTF1 de una de las lesiones al pulmón de los ratones $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ (4x y 20X).

GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO CON DELECCIÓN ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO MEDIANTE EL USO DE UN MODELO HÍBRIDO DE EXPLANTES *EX VIVO*-*IN VIVO* CON FRAGMENTOS DE ÚTEROS
Estudios previos a nuestro trabajo han demostrado la poca viabilidad del uso de explantes *ex vivo* de endometrios (Schäfer et al., 2011; Stavreus-Evers et al., 2003). Aun así, estos modelos han sido utilizado para la valoración farmacológica en tumores endometriales (Dolcet et al., 2006; Sales et al., 2010, 2007).

Por este motivo, el siguiente objetivo del trabajo fue generar un modelo *in vivo* en que se implantaran de manera subcutánea explantes de endometrios sanos y tumorales en ratones inmunodeprimidos para así conseguir la delección específica en el tejido de interés. Así a partir de ratones $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$, $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}$ sin y con administración previa de tamoxifeno se procedió a la extracción de los correspondientes endometrios con y sin modificaciones génicas respectivamente (Figura 29). Una vez seccionados y trasplantados de manera no ortotópica en ratonas inmunodeprimidas SCID (*Severe Combined Immune Deficient*) (Figura 56A), a la semana de la intervención, se procedió a la administración intraperitoneal de tamoxifeno en aquellos animales donde se habían introducido explantes procedentes de ratones donde no se había inducido aun la ablación génica (Figura 29). Tal y como se muestra en la figura 56B, en los ratones $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}$ tras 2-3 semanas de la administración intraperitoneal

de tamoxifeno (a la semana del xenotrasplante del fragmento del endometrio), se inducía de manera correcta la pérdida de *Pten* de manera mosaica en las células epiteliales del endometrio, llegándose a detectar hiperplasias leves en algunos de los endometrios analizados. Asimismo, es importante remarcar que con el transcurso de las semanas, de manera independiente del genotipo y de la estrategia de administración del tamoxifeno, tal y como se puede apreciar en las figuras 56C y 56D, entre la semana 8 y la 12 de la operación, los explantes endometriales injertados comenzaron a degenerar, y aunque tras el análisis histológico de los mismos aun presentaban núcleos tumorales, el grueso de las células tumorales así como de las normales acabaron por degradarse y desaparecer.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que este modelo híbrido *ex vivo-in vivo* con explantes no permite el estudio a largo plazo de la progresión tumoral para el cual había sido generado.

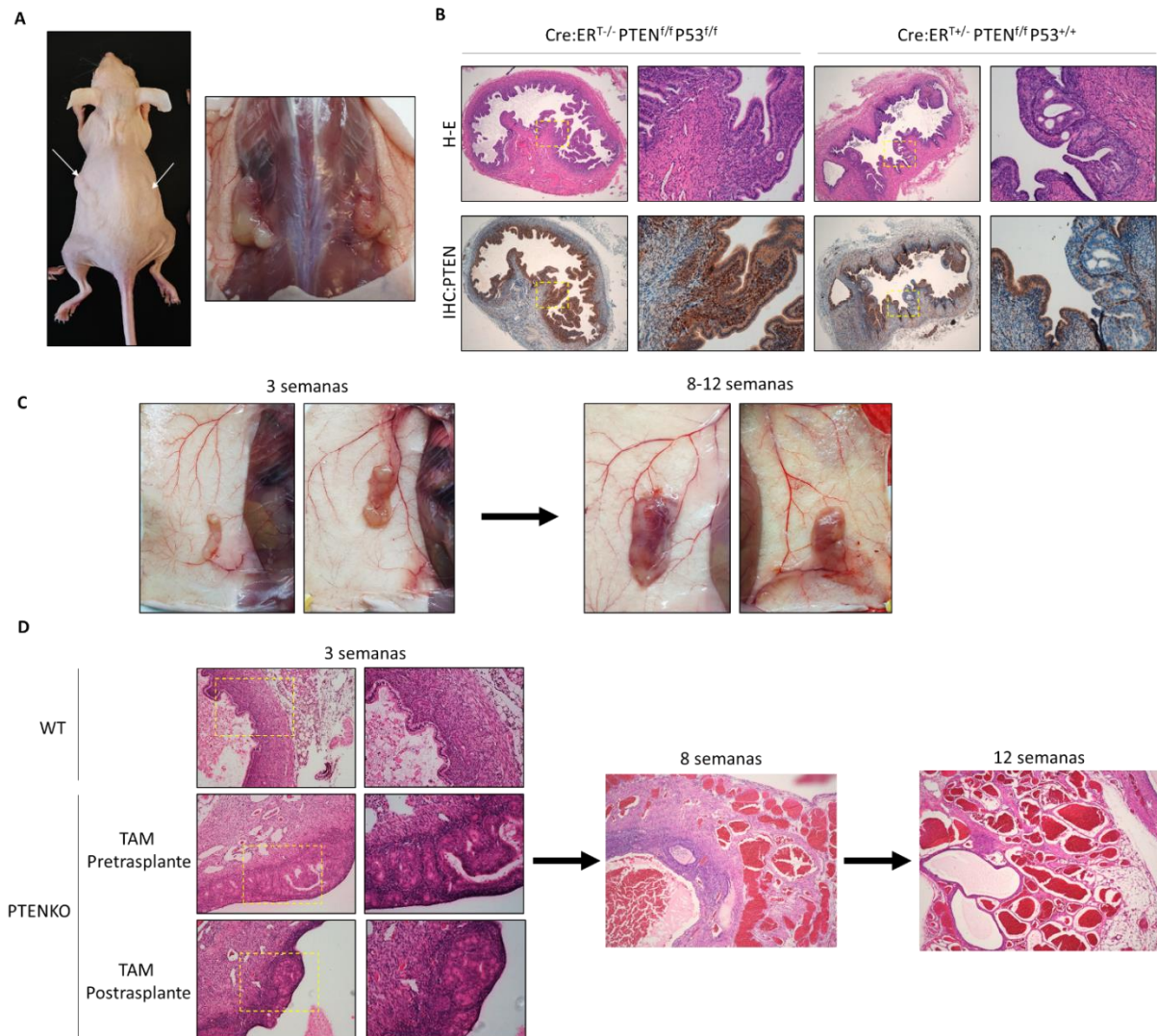


Figura 56. Modelo híbrido *ex vivo-in vivo* para la delección génica específica en el endometrio. (A) Imagen de uno de las ratonas inmunodeprimidas SCID donde se puede apreciar un explante endometrial a cada flanco del ratón de manera subcutánea (señalados con flechas blancas) **(B)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y PTEN de los explantes Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/-} entre las dos y las tres semanas tras la ablación de *Pten* en los ratones SCID. Imágenes a 4x y 20x. **(C)** Imágenes macroscópicas representativas de los explantes endometriales donde se puede apreciar la vascularización de los explantes y la degradación de los mismos a la semana 8-12 tras la operación **(D)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los explantes endometriales a las 3, 8 y 12 semanas de la operación donde se puede apreciar la degradación tisular de los mismos con el transcurso del tiempo tras la operación. Imágenes a 4x y ampliaciones a 10x.

GENERACIÓN DEL MODELO MURINO CON DELECCIÓN ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO MEDIANTE EL USO DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN TAT-CRE

Algunos trabajos en la literatura describen el péptido de penetración celular TAT (del inglés, *Trans-Activator of Transcription*) como un buen modelo para facilitar la introducción de la recombinasa Cre en modelos *in vivo* para la edición génica (Jo et al., 2001; Kang et al., 2018; Ozguldez et al., 2020; Sgolastra et al., 2018; Xu et al., 2008), aunque no existen modelos que empleen esta proteína de fusión para la generación y estudio de la carcinogénesis. Por ello, de manera paralela a los experimentos explicados con anterioridad, con el mismo objetivo de obtener un modelo *in vivo* en el cual la actividad recombinasa solo se diera en el tejido endometrial, decidimos emplear la proteína quimérica recombinante TAT-Cre para editar de manera específica las células epiteliales endometriales.

La TAT-Cre recombinante induce de manera correcta la edición génica *in vivo* e *in vitro*

Así, primeramente, se quiso investigar si el uso de la TAT-Cre era útil para el estudio a posteriori en nuestro modelo de cáncer. Con esta finalidad, se probó *in vitro* e *in vivo* la efectividad de la proteína TAT-Cre comercial (Millipore) en fibroblastos obtenidos a partir de orejas de ratones mT/mG^{f/f} y en endometrios de estos mismos ratones, mediante la administración intravaginal de esta. Como se muestra en la figura 57, tras la administración de la recombinasa, en ambos casos se consiguió obtener células donde se había producido la recombinación y por tanto expresaban la proteína verde GFP.

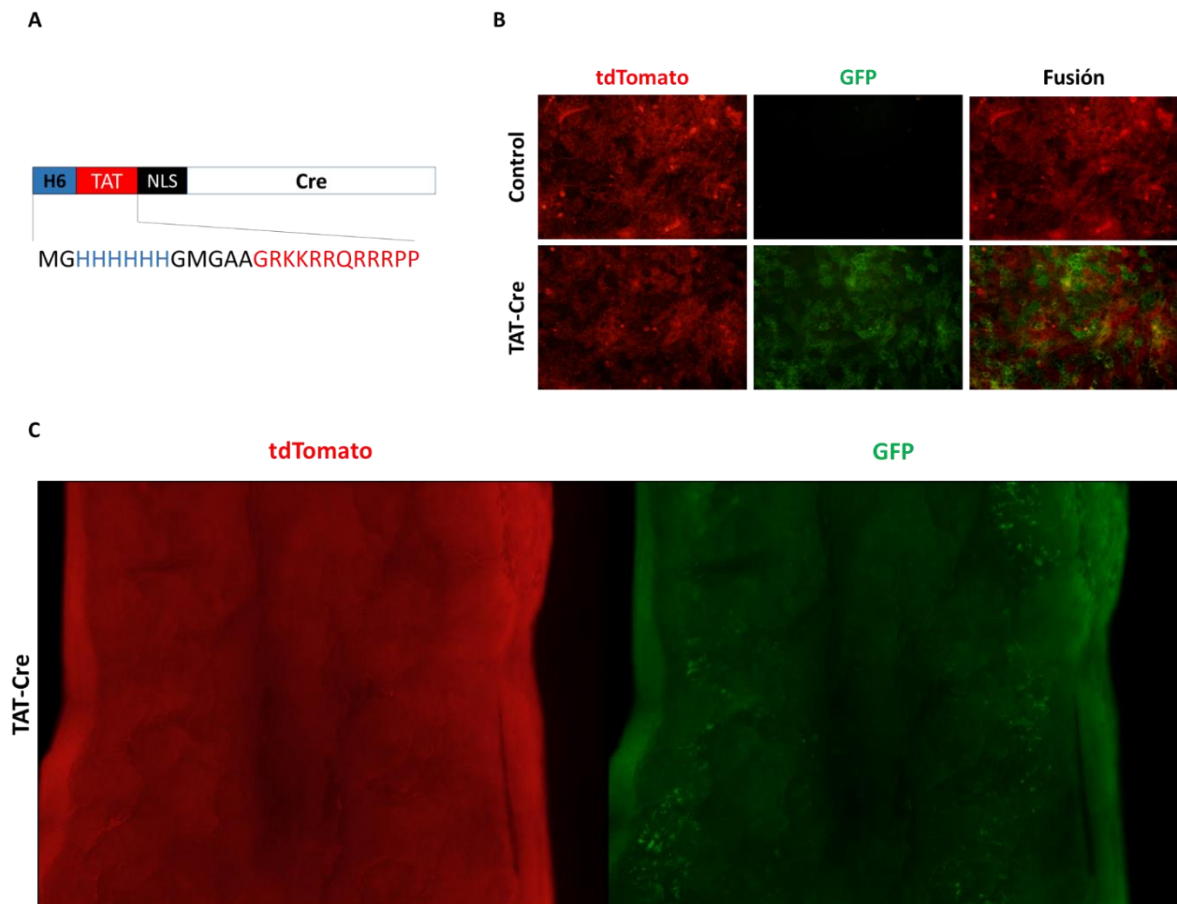


Figura 57. La proteína recombinante comercial TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vitro* e *in vivo*. (A) Esquema de la estructura de la TAT-Cre recombinasa comercial. Donde se muestra la etiqueta de polihistidina (H6) en el dominio N-terminal, el péptido de translocación derivado del HIV_TAT (TAT), la secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization sequence*) y la proteína Cre. (B) Imágenes representativas de fibroblastos extraídos de orejas de ratón mT/mG^{fl/fl} a los 2 días de ser tratados o no con TAT-Cre comercial. Donde se observa la actividad recombinasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato) (10x) (C) Imágenes representativas de un endometrio a los 5 días tras la administración intravaginal con TAT-Cre comercial donde se aprecia un elevado número de células positivas para GFP en el interior del útero de la ratona.

A continuación, valorando los resultados obtenidos con la TAT-Cre comercial, nos incitaron a diseñar y generar un plásmido que expresará el péptido de penetración celular TAT seguido de la recombinasa Cre, para producir de manera casera la recombinasa. Seguidamente, explicación y figuras en mayor detalle en el apartado de Materiales y Métodos, con este plásmido se transformaron bacterias competentes BL21(DE3) a las cuales se indujo la sobreexpresión de la proteína recombinante TAT-Cre. Tras purificar esta proteína quimérica, se testó *in vitro* e *in vivo* mediante el sistema doble reportero mT/mG.

Para ello, en primer lugar, se realizó *in vitro* una prueba de la actividad recombinasa de nuestra proteína quimérica recombinante. Así, se utilizó el plásmido pCA-mT/mG (Addgene #26123), un plásmido que presenta la secuencia tdTomato flanqueada por secuencias loxP, seguido del gene de

la EGFP. Se resolvió el producto de la recombinación en un gel de agarosa y se vio que nuestra proteína presentaba al igual que la TAT-Cre comercial actividad recombinasa puesto que en las condiciones donde se añadieron tanto el plásmido como la proteína, se liberaba un fragmento correspondiente a la secuencia génica que está entre los dos sitios *loxP*.

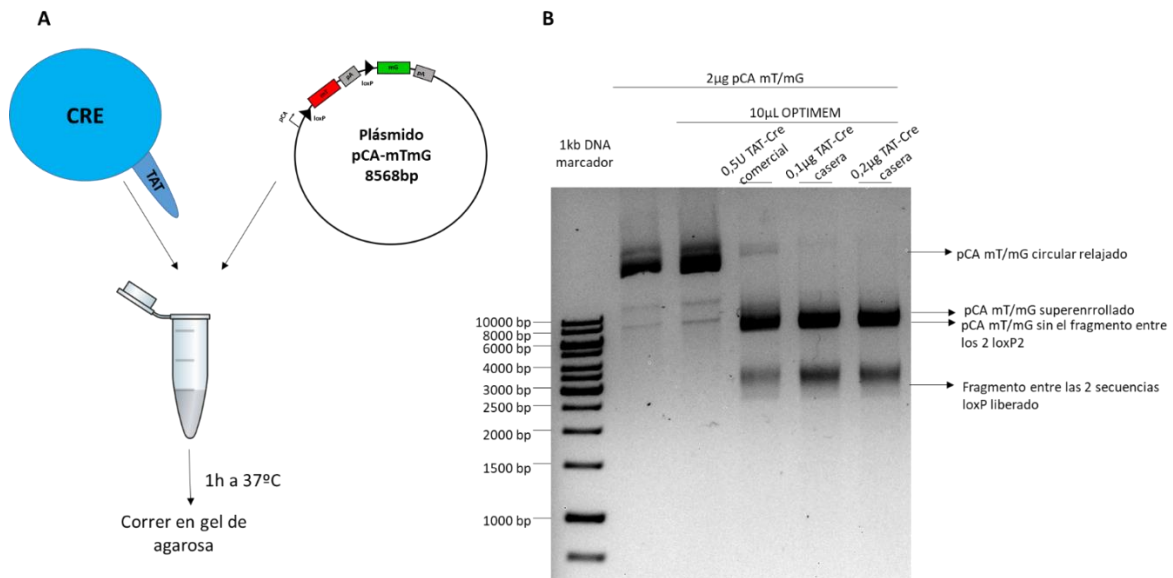


Figura 58. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vitro*. (A) Esquema del ensayo *in vitro* para el análisis de la actividad recombinasa de la TAT-Cre mediante el empleo del plásmido pCA-mTmG. (B) Imagen del gel de agarosa donde se puede observar la correcta actividad de la TAT-Cre comercial y casera.

Por otro lado, después de demostrar *in vitro* que la TAT-Cre presentaba actividad recombinasa, se inoculo la recombinasa TAT-Cre casera vía intrauterina en ratonas mT/mG^{f/f}, como se muestra en la figura 59, a los 7 días de la administración proteica, una gran cantidad de células endometriales presentaban color verde, indicador de la presencia de la actividad recombinasa dentro de la célula.

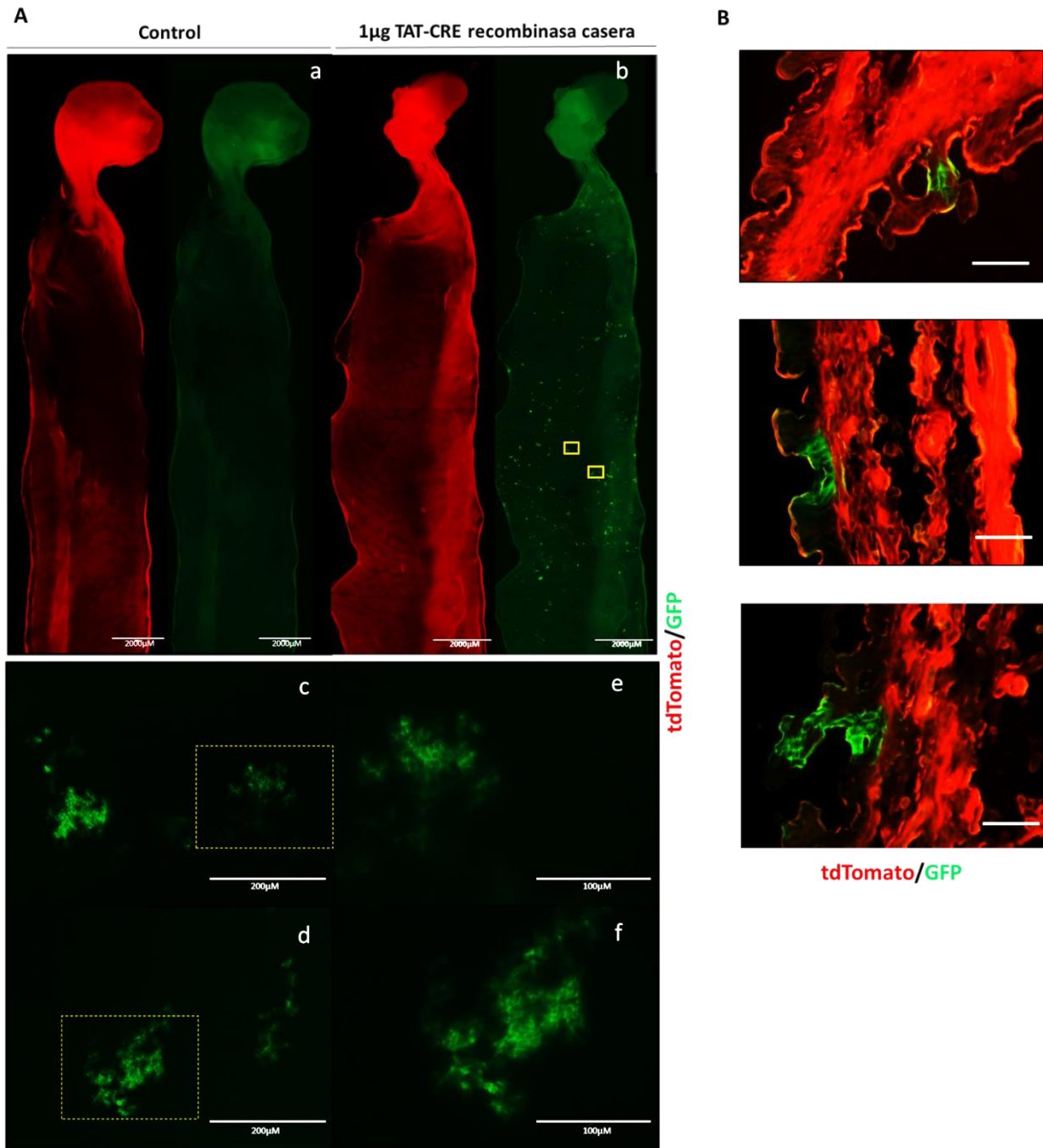


Figura 59. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vivo*. (A) Arriba, composición de imágenes a 4X de endometrios mT/mG^{f/f} tras la administración intravaginal de vehículo (a) o de 1μg de TAT-Cre casera (b) tras 7 días de la inoculación. A la izquierda imágenes obtenidas de la fluorescencia roja (tdTomato) a la derecha imágenes obtenidas de la fluorescencia verde (GFP). Barra a 2mm. Abajo-izquierda, ampliaciones a 20x de la imagen b (zonas ampliadas marcadas por recuadros amarillos) donde se aprecian el marcaje membranoso en las células endometriales que presentan actividad recombinasa. Barra a 200μm. Abajo-derecha, ampliación a 40x de las imágenes c y d. Barra 100μm. (B) Imágenes representativas de cortes histológicos de los endometrios mT/mG^{f/f} a los 7 días de inocular la TAT-Cre casera donde se aprecia la existencia de células epiteliales endometriales que presentan fluorescencia verde. Barra a 50μm.

A raíz de los resultados obtenidos con la TAT-Cre casera, y viendo que su uso iba a ser de gran importancia para el laboratorio, se decidió generar esta proteína a gran escala. Debido al coste de

material y la necesidad de instrumentos con los que no contábamos, este proceso de generación a gran escala fue transferido a un laboratorio alieno especializado en la producción de proteínas recombinantes. Así fue como obtuvimos TAT-Cre casera a una concentración de 17.6mg/mL.

Para comenzar, evaluamos de nuevo la actividad recombinasa de esta proteína recombinante utilizando de nuevo el modelo doble reportero mT/mG. Así, en primer lugar, se estableció un cultivo de fibroblastos, obtenidos a partir de orejas y cola de ratón mT/mG^{ff}. Cuando obtuvimos un número adecuado de células, se trataron a con dosis crecientes de la TAT-Cre con el fin de encontrar una concentración óptima para el uso de la proteína recombinante *in vitro*. Así, tal y como se observa en la figura 60, a los 4 días tras la inducción *in vitro* de la actividad recombinasa, se observó que existía una correlación positiva entre el número de células que presentaban fluorescencia verde y las dosis crecientes de la TAT-Cre administrada. No obstante, la dosis más elevada provoco una alta tasa de mortalidad celular donde las células morían antes siquiera de expresar la GFP, bien debido a la toxicidad del vehículo donde la TAT-Cre se encuentra diluida, o bien a la propia concentración de TAT-Cre. Fue entonces cuando se determinó que la mejor dosis para inducir la ablación génica en este tipo de cultivos era la de 176µg/mL donde cerca del 70% de las células eran verdes, indicador de que habían adquirido la actividad recombinasa.

Seguidamente, como comprobación adicional, se quiso testar la TAT-Cre casera en otros modelos celulares con los que de manera rutinaria se trabaja en el laboratorio como es el caso de los cultivos primarios murinos de células epiteliales de endometrio. Para ello se establecieron cultivos en monocapa y tridimensionales de células epiteliales endometriales provenientes de ratones mT/mG^{ff}.

En el caso de los cultivos en monocapa, a las 24h del establecimiento del cultivo se procedió al tratamiento en dosis crecientes de la TAT-Cre casera. Los resultados obtenidos en este cultivo primario no distaban de los adquiridos en los cultivos de fibroblastos, ya que de igual manera se observó un paralelismo entre la dosis y el número de células verdes. De igual manera, en un primer lugar, la dosis de 176 µg/mL fue la elegida para este tipo de cultivos, ya que se vio que presentaba mejor eficiencia de actividad recombinasa sin mostrar signos de toxicidad. De igual manera a los ocurrido con los fibroblastos, como se muestra en la figura 61, la condición donde las células que fueron tratadas con la mayor dosis de TAT-Cre, a pesar de que esta vez sí que presentaban un alto grado de actividad recombinasa, igualmente, un alto porcentaje de estas células manifestaron un fenotipo senescente y una menor tasa de proliferación debido a la toxicidad del tratamiento.

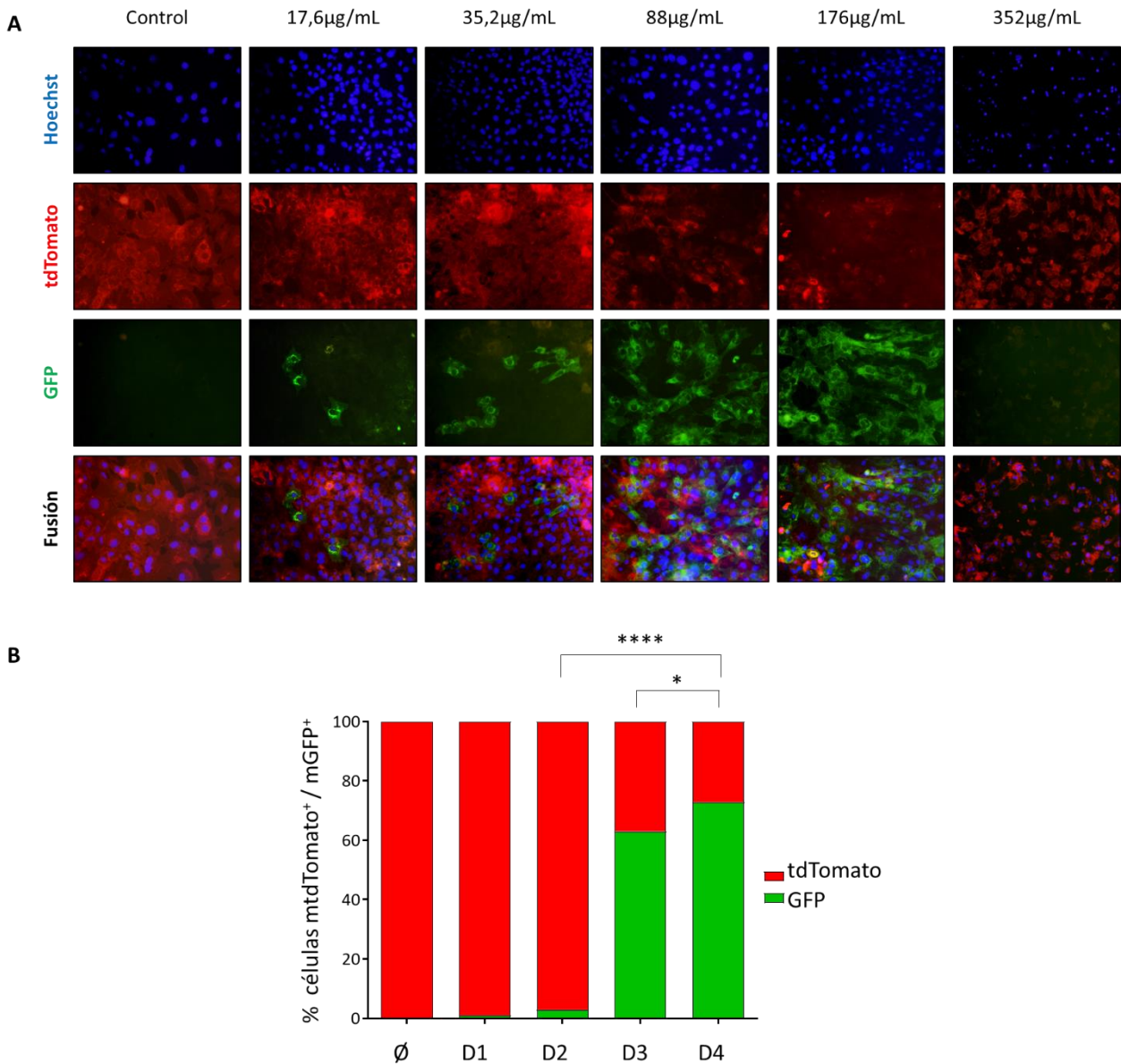


Figura 60. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vitro* en fibroblastos mT/mG^{ff}. (A) Imágenes representativas de fibroblastos extraídos de orejas de ratón mT/mG^{ff} a los 4 días de ser tratados o no (∅) con TAT-Cre casera en dosis crecientes de 17,6µg/mL (D1), 35.2µg/mL (D2), 88µg/mL (D3), 176µg/mL (D4) y 352µg/mL (D5) Donde se observa la actividad recombinasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato) (20x). (B) Cuantificación de las células que presentaban fluorescencia verde o roja a los 4 días de la inducción de la recombinación génica a dosis crecientes (∅, D1, D2, D3 y D4) de TAT-Cre casera. Los datos provienen de n=3 experimentos independientes. *p<0.5 ****p<0.0001, mediante un análisis one-way ANOVA, seguido de un según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

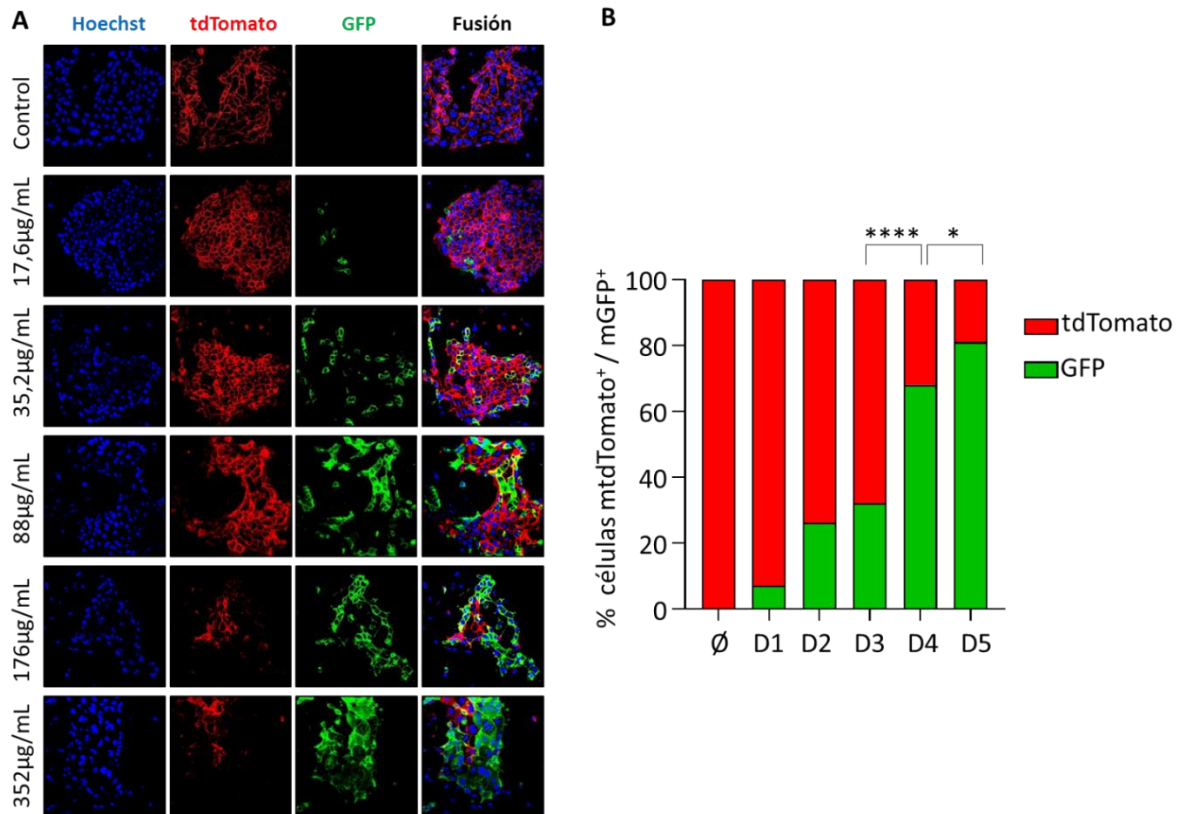


Figura 61. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vitro* en cultivos primarios bidimensionales de células epiteliales de endometrio mT/mG^{fl/fl}. **(A)** Imágenes representativas de cultivos 2D de células epiteliales endometriales de ratón mT/mG^{fl/fl} a los 4 días de ser tratados o no (∅) con TAT-Cre casera en dosis crecientes de 17,6µg/mL (D1), 35,2µg/mL (D2), 88µg/mL (D3), 176µg/mL (D4) y 352µg/mL (D5) donde se observa la actividad recombinasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato) (20x). **(B)** Cuantificación de las células que presentaban fluorescencia verde o roja a los 4 días de la inducción de la recombinación génica a dosis crecientes (∅, D1, D2, D3, D4 y D5) de TAT-Cre casera. Los datos provienen de n=3 experimentos independientes. *p<0.5 ****p<0.0001, mediante un análisis one-way ANOVA, seguido de un según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

En cambio, este problema de la viabilidad de las células a concentraciones altas de TAT-Cre, fue resuelto de manera satisfactoria al cambiar el medio a las 24h tras añadir la proteína recombinante. Como se muestra en la figura 62, a los 4 días tras la inducción de la actividad recombinasa en las células, estas, a una dosis de 352µg/mL, presentaba un alto grado de recombinación celular y, aun así, no mostraban una apariencia senescente ni problemas observables en relación a la proliferación. Por este motivo, a partir de este momento, siguiendo este protocolo, fue esta la dosis que se determinó como óptima para el uso en cultivos primarios de células epiteliales de endometrio.

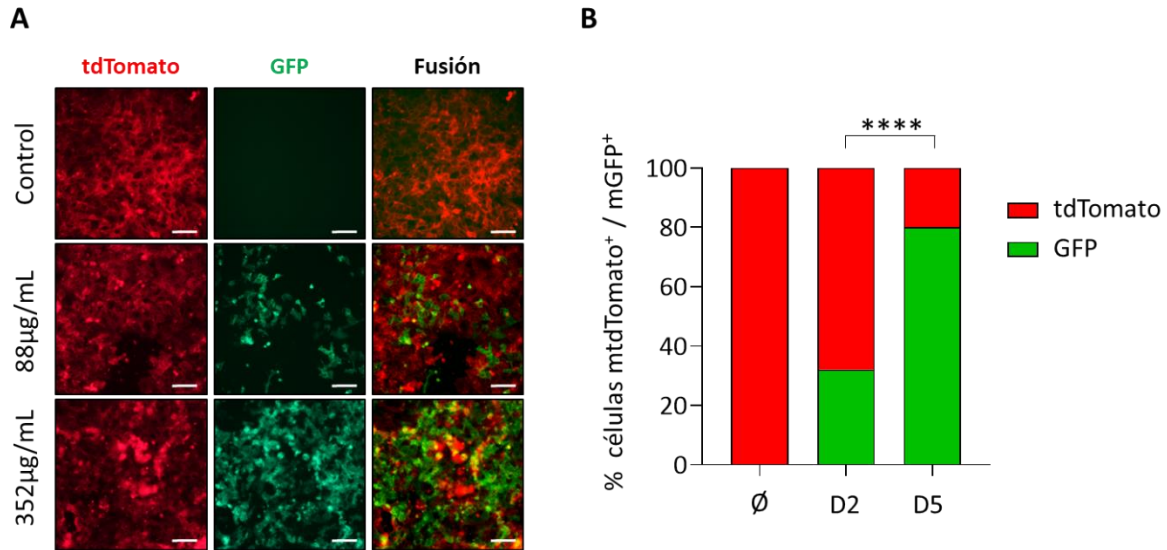


Figura 62. El cambio de medio a las 24h de añadir la proteína recombinante casera TAT-Cre es necesario para mejorar la viabilidad de los cultivos primarios bidimensionales de células epiteliales de endometrio. **(A)** Imágenes representativas de cultivos 2D de células epiteliales endometriales de ratón mT/mG^{f/f} a los 4 días de ser tratados o no (\emptyset) con TAT-Cre casera en dosis de 88µg/mL (D2) y 352µg/mL (D5), realizando lavados con PBS1X y un cambio de medio a las 24h de inducir el cambio génico en las células. Se observa la actividad recombinasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato) Imágenes a 10x. Barras de 100µm. **(B)** Cuantificación de las células que presentaban fluorescencia verde o roja a los 4 días de la inducción de la recombinación génica a dosis crecientes (\emptyset , D2, D5) de TAT-Cre casera. Los datos provienen de n=3 experimentos independientes. ****p<0.0001, mediante un análisis one-way ANOVA, seguido de un según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Por otro lado, en el caso de los cultivos tridimensionales con células epiteliales endometriales de ratón mT/mG^{f/f}, una vez estos adquirieron el tamaño adecuado, fueron tratados de igual manera que el resto de cultivos explicados con anterioridad. Asimismo, a los 4 días de ser tratados, tal y como se muestra en la figura 63, se vio que también había una relación dosis/células verdes. Sorprendentemente, este modelo preciso de una mayor concentración de proteína quimérica para superar el 70% de células donde se había inducido la recombinación. Por consiguiente, se determinó que en este tipo cultivos, la dosis de 352µg/mL era la adecuada para la inducción de la delección génica.

Si bien se trató de aumentar la concentración de proteína administrada para alcanzar un porcentaje mayor de células con actividad recombinasa, esto no fue posible, ya que al probar varias dosis superiores a 352µg/mL, se vio una reducción en el número de células verdes por glándula (Imágenes no mostradas), y además estas presentaron un fenotipo apoptótico (figura 63C).

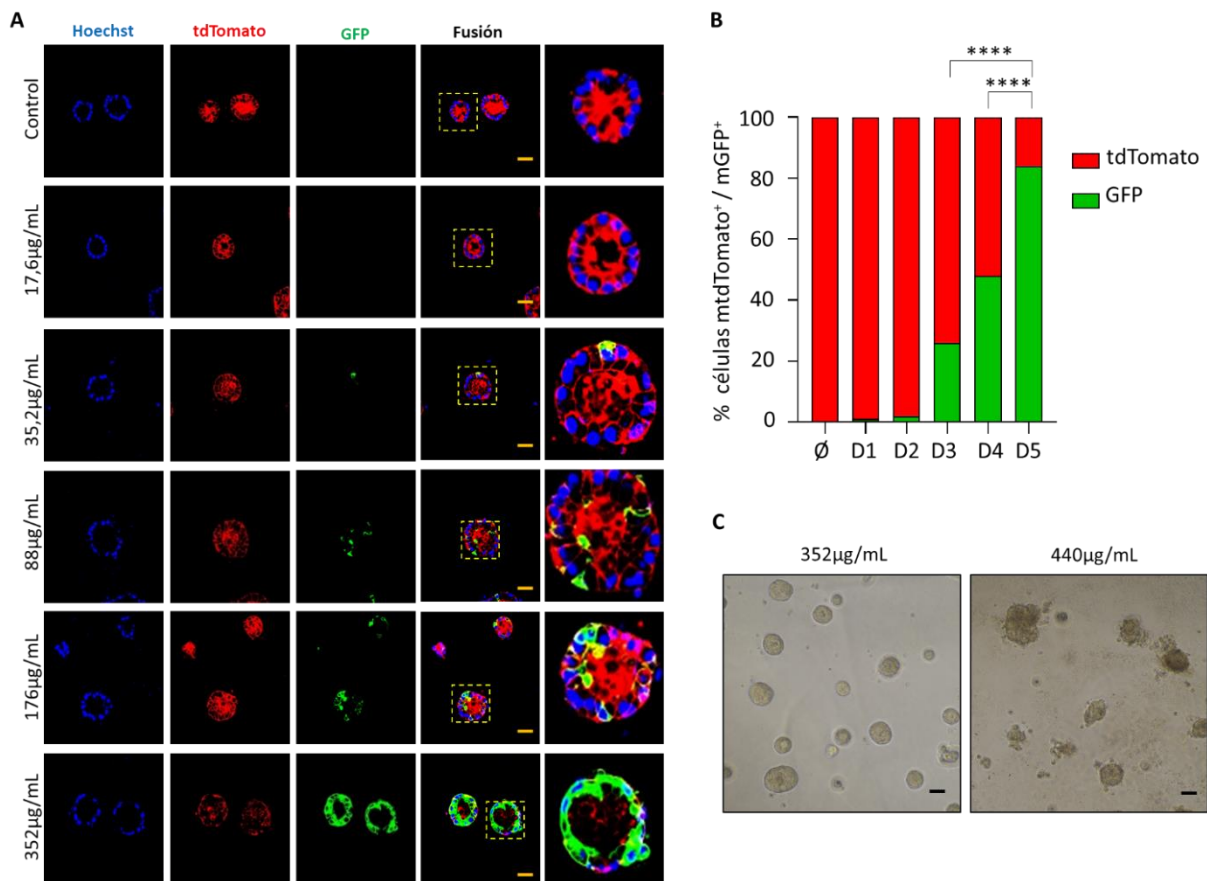


Figura 63. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vitro* en cultivos primarios tridimensionales de células epiteliales de endometrio mT/mG^{f/f}. (A) Imágenes representativas de cultivos 3D de células epiteliales endometriales de ratón mT/mG^{f/f} a los 4 días de ser tratados o no (∅) con TAT-Cre casera en dosis crecientes de 17,6µg/mL (D1), 35,2µg/mL (D2), 88µg/mL (D3), 176µg/mL (D4) y 352µg/mL (D5) Donde se observa la actividad recombinasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato). Barras: 25µm. **(B)** Cuantificación de las células que presentaban fluorescencia verde o roja a los 4 días de la inducción de la recombinación génica a dosis crecientes (∅, D1, D2, D3, D4 y D5) de TAT-Cre casera. Los datos provienen de n=3 experimentos independientes. *p<0.5 ****p<0.0001, mediante un análisis one-way ANOVA, seguido de un según el test de comparación múltiple de Bonferroni. **(C)** Imágenes representativas de contraste de fase de cultivos 3D de células epiteliales endometriales mT/mG^{f/f} tratadas con 352µg/mL y 440µg/mL de TAT-Cre casera, donde se pueden ver las glándulas con fenotipo apoptótico en la condición de mayor concentración. Barras: 100µm.

La TAT-Cre induce la ablación génica en epitelio y estroma endometrial *in vivo*

Dado que la concentración de esta TAT-Cre era diferente a la que obtuvimos a pequeña escala, se quiso volver a comprobar que presentaba actividad *in vivo*.

Por una parte, se volvió a introducir 10µL por rama uterina, vía intrauterina (i.u.), de la proteína recombinante a 8,8µg/µL en ratonas mT/mG^{f/f}. Se sacrificio estas ratonas transcurridos 4 meses desde la operación. Gracias a una evaluación microscópica de los endometrios se vio que estos conservaban a los 4 meses zonas positivas para la fluorescencia verde, que a simple vista parecían seguir un patrón epitelial.

Con el fin de analizar más en detalle estos ratones, se realizó un estudio inmunohistoquímico de los endometrios a los 4 meses de inducirse la ablación génica. De esta manera, se apreció que algo que

pasaba inadvertido la analizar microscópicamente la fluorescencia de los animales se hacía evidente al teñir con GFP cortes histológicos de estos ratones. Esto era que la penetrancia de la proteína dentro del endometrio era tal que no solo las células epiteliales endometriales sufrían la ablación génica, sino que está, también se daba en las células del estroma endometrial y en las células musculares del miometrio próximas a la región donde se realizaba la inyección intrauterina.

La administración de la TAT-Cre no hizo que la expresión de la GFP fuera generalizada en todo el tejido, sino que generó tejidos mosaico, en los cuales, había una mezcla de células epiteliales (en su mayoría), estromales y musculares que habían adquirido en el momento de la administración intrauterina la actividad recombinasa, con otras que no habían sufrido ningún tipo de ablación génica. Este mosaicismo fue observado en todos los animales sacrificados a los 4 meses de la operación.

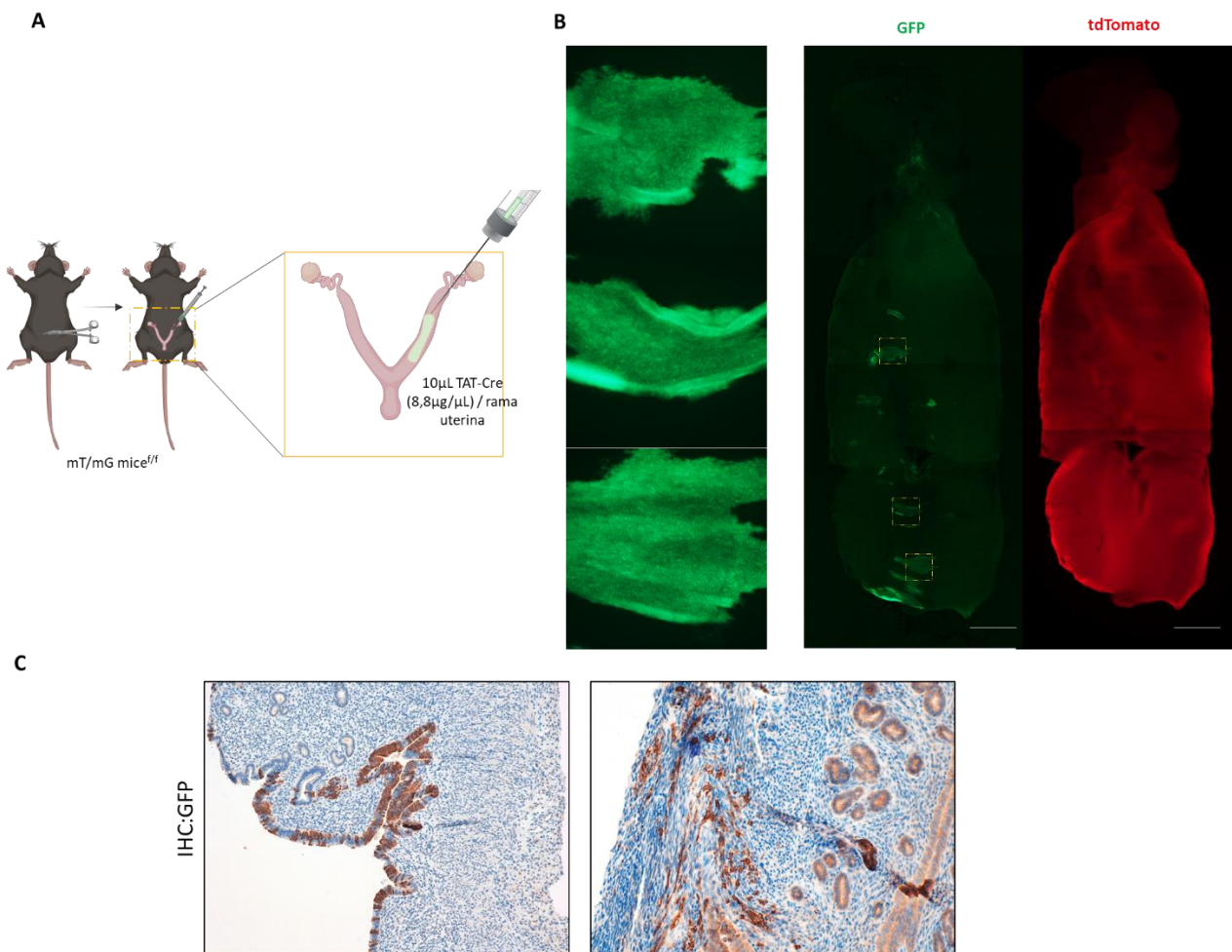


Figura 64. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vivo* en endometrios de ratonas mT/mG^{f/f}. (A) Esquema de la administración intrauterina de 88 µg de TAT-Cre casera por rama uterina en los ratones mT/mG^{f/f}. **(B)** Derecha, composición de imágenes obtenidas de la fluorescencia roja (tdTomato) y verde (GFP) a 4X de endometrios mT/mG^{f/f} tras la administración intravaginal de 88 µg de TAT-Cre casera tras 4 meses de la inoculación. Barra a 2mm. Izquierda, ampliaciones a 20x de las zonas ampliadas marcadas por recuadros amarillos donde se aprecian el marcateje membranoso en las células endometriales que presentan actividad recombinasa. **(C)** Imágenes representativas de la tinción contra GFP

de los cortes histológicos de los endometrios mT/mG^{ff} a los 4 meses de inyectar la TAT-Cre casera, donde se aprecia la existencia de células epiteliales endometriales (izquierda), células estromales endometriales y células miometriales (derecha) que presentan marcaje positivo contra GFP. Imágenes a 10X.

La TAT-Cre induce la ablación de *Pten* y *p53* tanto *in vitro* como *in vivo*

El siguiente paso en nuestro estudio, fue comprobar si este sistema de delección específica en el endometrio tenía validez para la delección de nuestros genes de interés: *Pten* y *p53*. Par ello, de igual manera que en las ratonas mT/mG^{ff}, se realizaron cultivos en monocapa de células epiteliales de endometrio de ratones que presentaban floxeados ambos, únicamente uno, o ninguno de los dos genes. Como se puede comprobar en la figura 65, en los casos donde algunos de los genes estaban flanqueados por secuencia *loxP*, al analizar la expresión proteica de las células epiteliales una vez administradas con TAT-Cre, el nivel de proteína del gen o genes floxeados se veía reducido. No fue así en las células que no presentaban ninguna secuencia génica bajo la influencia de la actividad recombinasa.

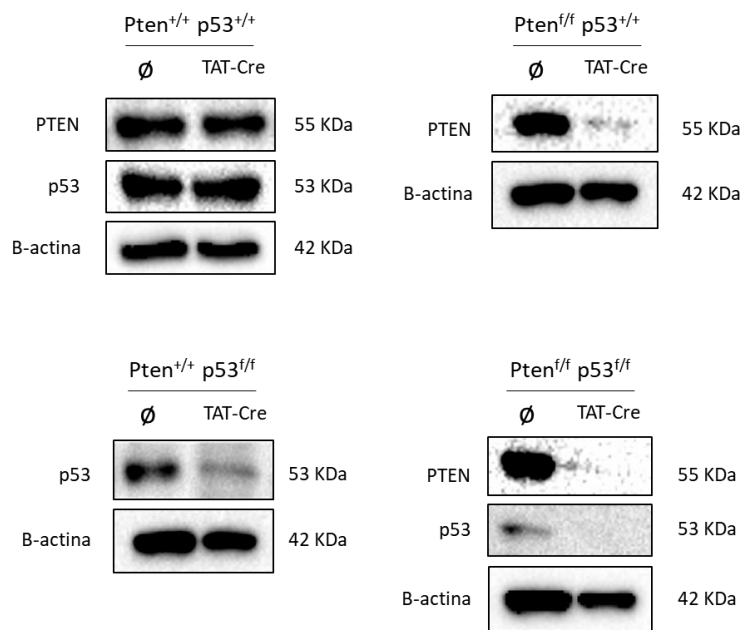


Figura 65. Las células epiteliales endometriales con genes flanqueados por secuencias *loxP* ven reducida la expresión proteica de dichos genes. Evaluación de la expresión de PTEN y p53 a partir de lisados de cultivos de células epiteliales endometriales de ratones (A) Pten^{+/+}; p53^{+/+}, (B) Pten^{ff}; p53^{+/+}, (C) Pten^{+/+}; p53^{ff}, (D) Pten^{ff}; p53^{ff} a las 72 horas de ser tratadas o no con 352µg/mL de TAT-Cre (incubación de 24h). Como control de carga se emplea la β-actina.

Por otro lado, se administró TAT-Cre a hembras Pten^{ff} las cuales fueron sacrificadas a la 1 y a las 3 semanas post-inyección. En todos los casos se realizó un estudio histopatológico de los endometrios empleando tinciones inmunohistoquímicas contra PTEN. Los animales analizados en el primer periodo temporal, mostraron un patrón mosaico de glándulas normales donde algunas de ellas a pesar de haber perdido la expresión de PTEN, no se detectaba ningún tipo de anomalía histológica ni morfológica (Figura 66A).

Durante la segunda etapa, el mosaicismo observado a la semana de la inyección se conservó en todos los animales. De este modo, las glándulas deficientes de PTEN convivían con glándulas que mantenían la expresión de este gen. Además, el 100% de los animales mostraron indicios de patologías endometriales, con hiperplasias epiteliales y adenocarcinomas endometriales *in situ* constituidos por células epiteliales carentes de PTEN. Aún más, al igual que ocurría en el ratón mT/mG^{ff}, estos animales presentaron zonas donde se observaba una disminución de los niveles de PTEN en el estroma endometrial (Figura 66B).

Todos estos resultados obtenidos, nos llevaron a concluir que este modelo de delección génica específica de tejido, mediante el uso de la proteína recombinante TAT-Cre, podría ser útil para el estudio de la progresión tumoral debida a la ablación de los genes de interés, en nuestro caso, *Pten* y/o *p53*.

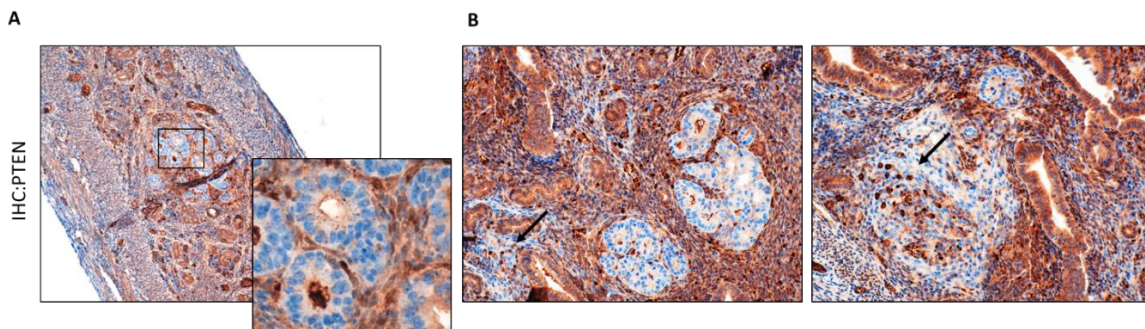


Figura 66. La proteína recombinante casera TAT-Cre presenta actividad recombinasa *in vivo* en endometrios de ratonas *Pten*^{ff}. (A) Imagen representativa de la tinción contra PTEN de los cortes histológicos de los endometrios *Pten*^{ff} a la semana de inyectar la TAT-Cre casera donde se puede apreciar glándulas donde se ha inducido la pérdida de expresión de PTEN. (10x) **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra PTEN de los cortes histológicos de los endometrios *Pten*^{ff}; *p53*^{+/+} a las 3 semanas de inyectar la TAT-Cre casera donde se puede apreciar alguna lesión patológica de células epiteliales endometriales deficientes para PTEN y regiones de estroma epitelial carentes de expresión de PTEN (señaladas con flechas negras) (20x).

La pérdida de p53 potencia la carcinogénesis en el útero de las células deficientes de PTEN en el modelo TAT-Cre

Una vez analizada la eficiencia de la TAT-Cre para inducir la actividad recombinasa en las células epiteliales endometriales, procedimos con la administración de la proteína de fusión en cuatro grupos de ratones: *Pten*^{+/+}; *p53*^{+/+} (sin modificaciones génicas, \emptyset o *wildtype*), *Pten*^{+/+}; *p53*^{ff} (p53KO), *Pten*^{ff}; *p53*^{+/+} (PTENKO), y *Pten*^{ff}; *p53*^{ff} (dKO). El fin de este estudio era poder sobrepasar la vida media de los ratones Cre:ER^T inducidos por tamoxifeno y así poder estudiar en mayor detalle ratones que presentaran únicamente patologías en el útero y no en el resto de tejidos.

Así, cuatro meses tras la inducción de la actividad recombinasa en los úteros de las ratonas de los 4 grupos, se identificaron a simple vista que la totalidad de los ratones pertenecientes al grupo donde se había producido la delección génica de *Pten* y *p53* presentaba abultamiento abdominal y,

al observarlos con mayor detenimiento, entorno al 80% de las ratonas mostraron sangrado vaginal, dos de las patologías comunes de las patologías tumorales en los úteros (La Sociedad Americana Contra El Cancer).

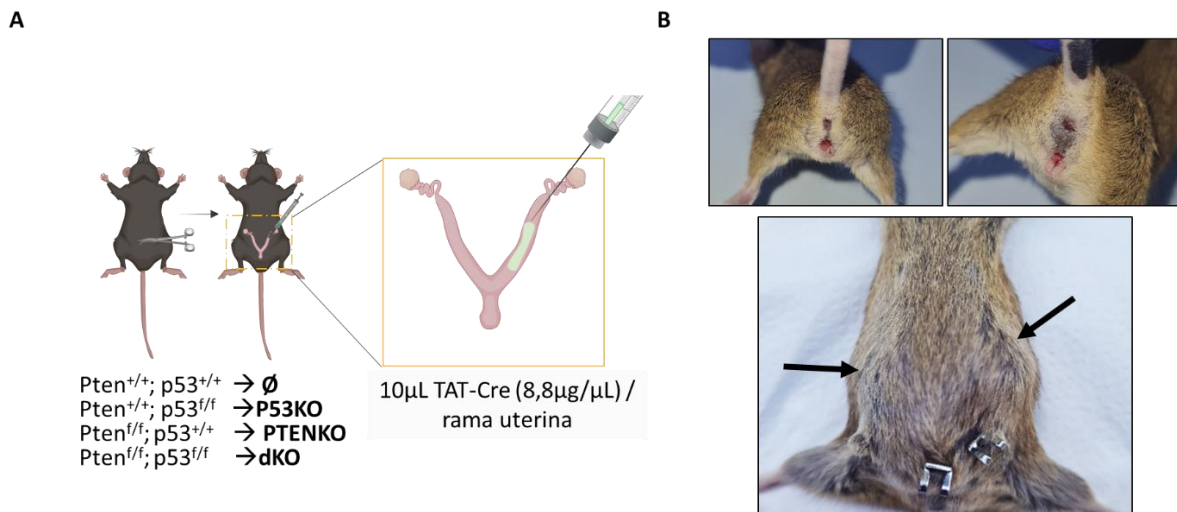


Figura 67. La administración intrauterina de la TAT-Cre desencadena sintomatología de tumores uterinos en los ratones con pérdida bialélica de Pten y p53. (A) Esquema de la administración intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina en los ratones $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$ (sin modificaciones génicas, \emptyset o *wildtype*), $Pten^{+/+}; p53^{f/f}$ (p53KO), $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$ (PTENKO), y $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ (dKO) **(B)** Imágenes ilustrativas representativas del sangrado vaginal y abultamiento abdominal en los ratones dKO a los 4 meses tras la inyección intrauterina de la TAT-Cre.

Seguidamente, se procedió al disecado de estos animales, donde macroscópicamente se identificaron una serie de lesiones fácilmente visibles en la totalidad de los úteros de las ratonas $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$.

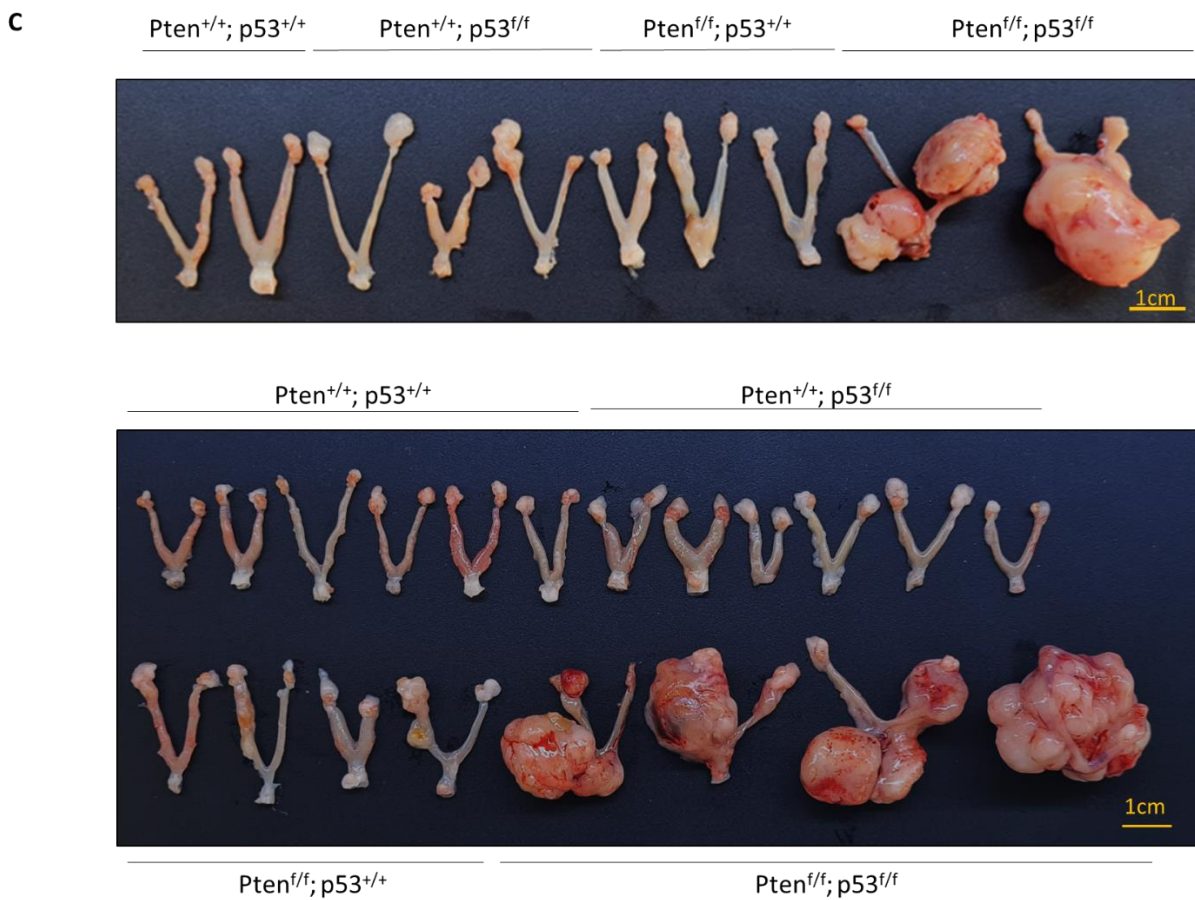
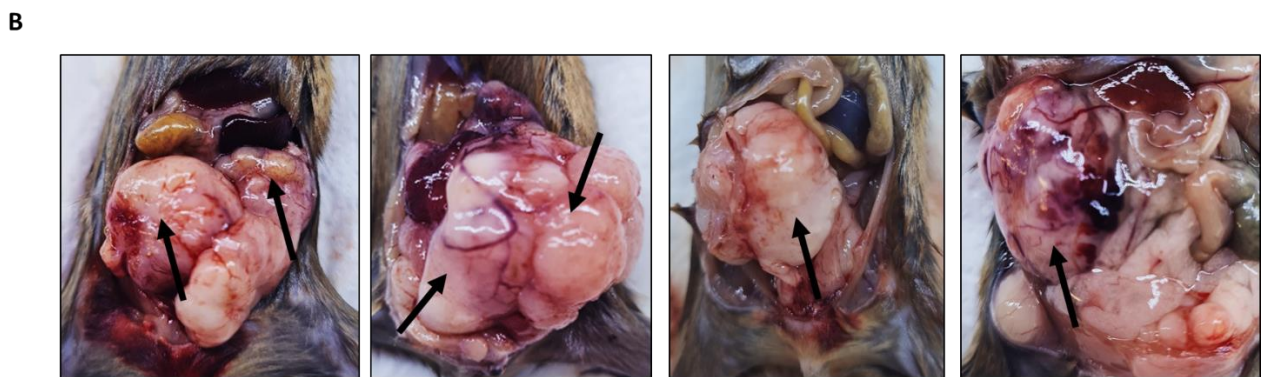
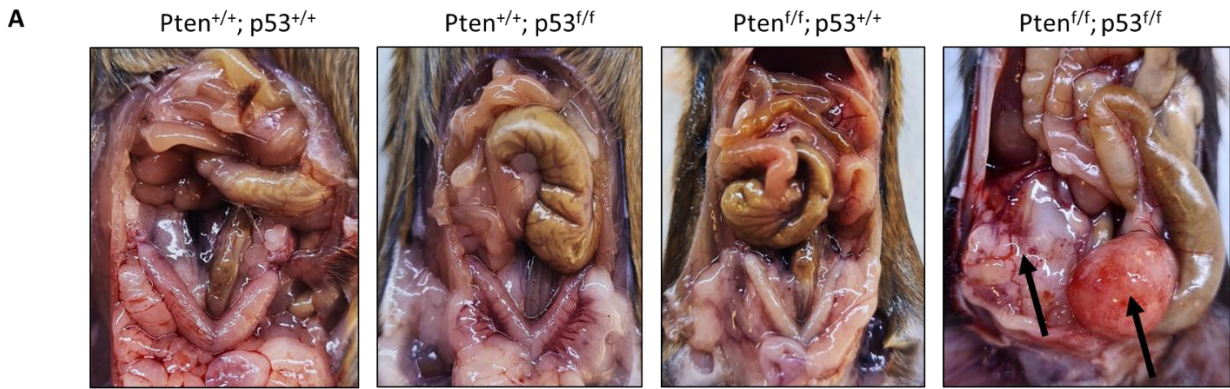


Figura 68. La administración intrauterina de la TAT-Cre induce la aparición de tumores uterinos en los ratones con pérdida bialélica de *Pten* y *p53* en comparación con el resto de ratones. **(A)** Imágenes representativas de las vísceras de la región peritoneal en los ratones $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$, $Pten^{+/+}; p53^{f/f}$, $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$ y $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina. Se puede observar los tumores uterinos en los ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$. Las flechas remarcan las lesiones observadas. **(B)** Imágenes de la región peritoneal de algunos de los ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina donde se señalan con flechas las regiones tumorales abdominales. **(C)** Imágenes macroscópicas de los úteros de ratones $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$, $Pten^{+/+}; p53^{f/f}$, $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$ y $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina.

Además, se observó que este nuevo modelo condicional de delección génica inducible y específica de tejido, solo generaba la ablación génica de manera localizada en el útero. Así, en todos los ratones que tenían los genes de interés flanqueados por secuencias loxP, ningún ratón presento macroscópicamente ningún tipo de alteración en ningún otro tejido. De tal forma, como se muestra a modo de ejemplificación en la figura 69, se puede apreciar la disminución del tamaño de la lesión en la tiroides en los ratones dKO.

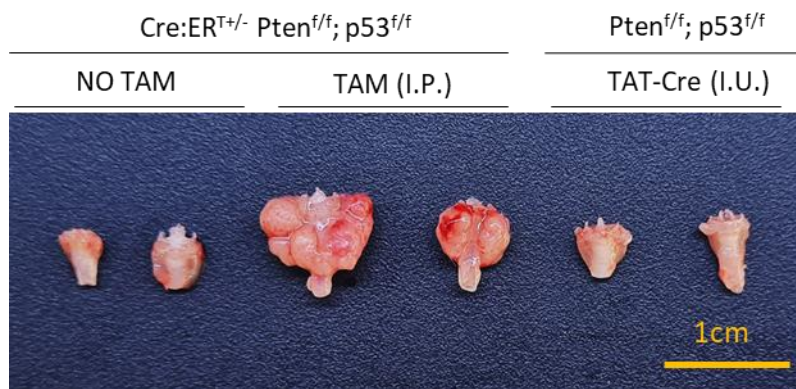


Figura 69. La administración intrauterina de la TAT-Cre reduce la incidencia de malignidades en los tejidos, como es el caso de la tiroides. Imagen representativa de la comparación de las tiroides de ratonas Cre:ER^T Pten^{f/f}; p53^{f/f} tratadas intraperitonealmente (I.P.) (5 semanas) o no con 0,5mg de tamoxifeno (TAM), y de ratonas Pten^{f/f}; p53^{f/f} a los 4 meses tras la inyección intrauterina (I.U.) de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina.

A continuación, después de la evaluación macroscópica, se incluyeron en parafina los úteros de los ratones para su posterior análisis. Tal como se muestra en la figura 70, el 100% de las ratonas $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ fueron diagnosticados de adenocarcinomas endometriales endometrioides, siendo un 93% de alto grado. No obstante, en los ratones $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$, a pesar de presentar un fenotipo con una mayor progresión tumoral del alcanzado al generar la ablación génica con tamoxifeno, la gran mayoría de animales de este genotipo, concretamente un 69%, presentaron una histología de adenocarcinoma endometrial endometriode de bajo grado, el 23%, de neoplasia intraepitelial endometrial, y un 8%, de hiperplasia simple. Por el contrario, en los casos de los ratones $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$ y $Pten^{+/+}; p53^{f/f}$, transcurridos los 4 meses de la administración con la TAT-Cre ninguno de los animales de estos dos grupos presentó una histología patológica en las células epiteliales del endometrio.

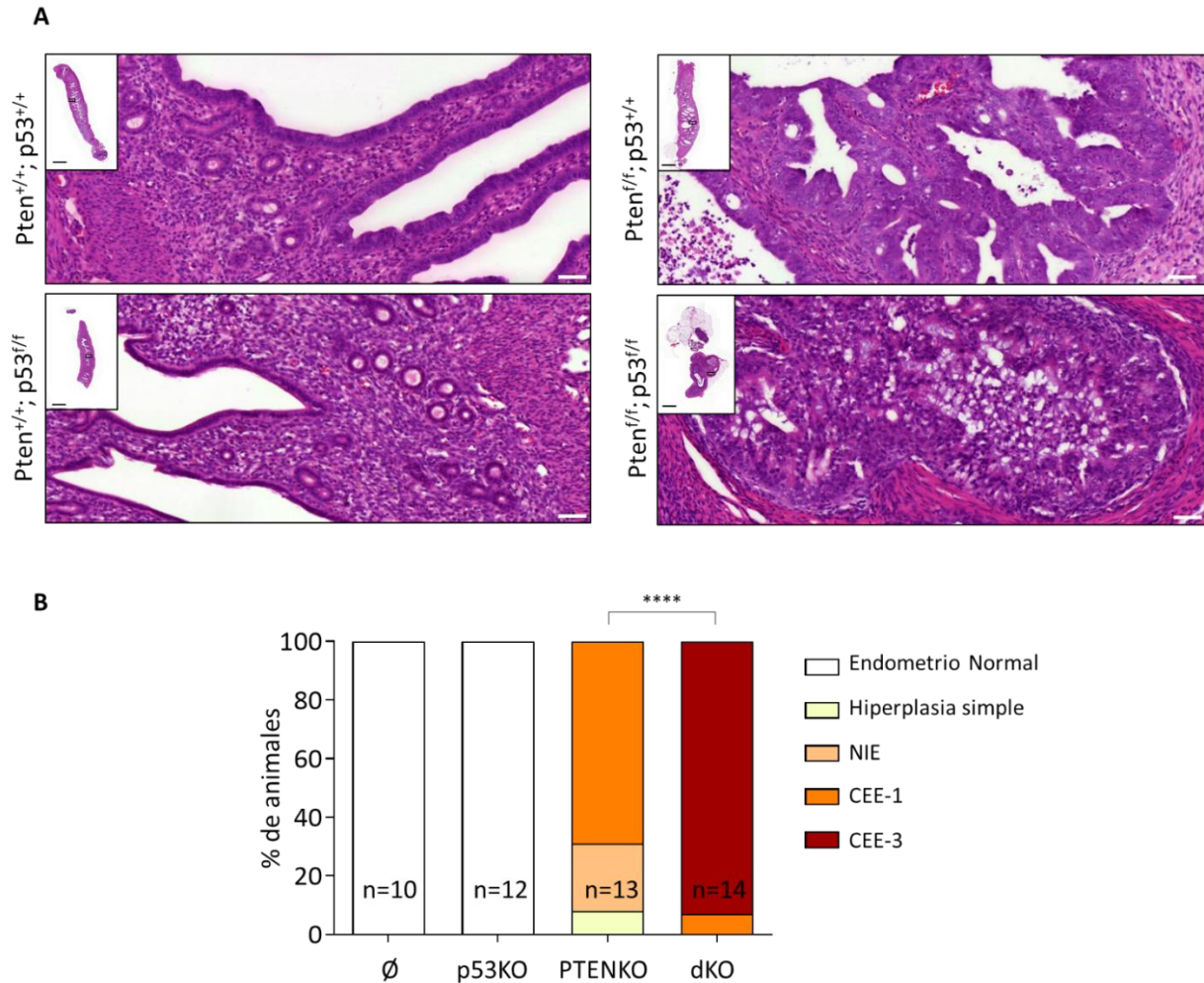
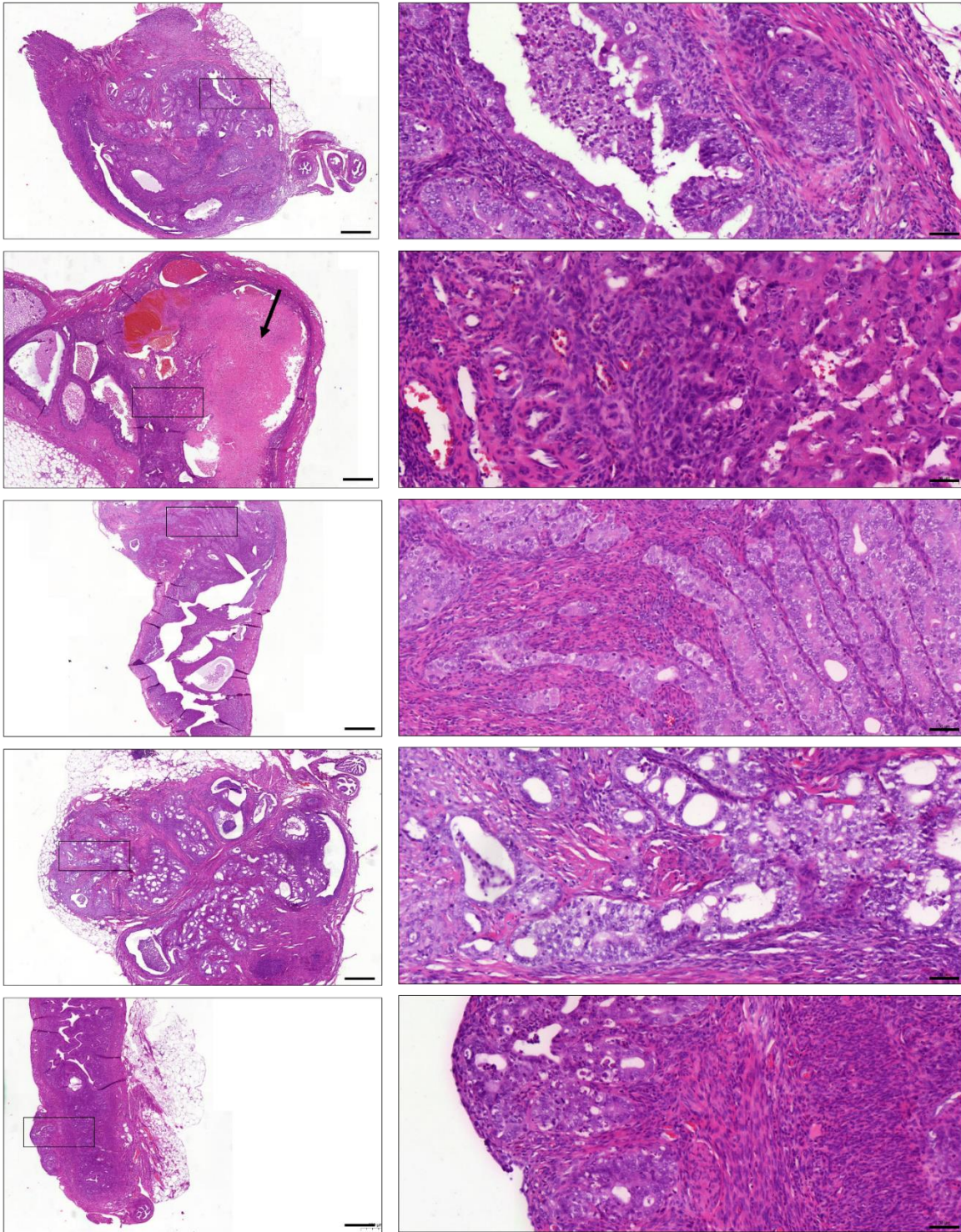


Figura 70. La pérdida bialélica de *p53* incrementa la incidencia y la agresividad de los tumores epiteliales inducidos por la pérdida de *Pten*. (A) Imágenes representativas de la tinción con H-E de endometrio de ratones *Pten*^{+/+}; *p53*^{+/+} (Ø), *Pten*^{+/+}; *p53*^{f/f} (*p53*KO), *Pten*^{f/f}; *p53*^{+/+} (PTENKO), y *Pten*^{f/f}; *p53*^{f/f} (dKO) a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 0.5x y a 20X. Barras de 2mm y 50µm respectivamente. (B) Cuantificación de las lesiones diagnosticadas en el endometrio para cada grupo de animales. *****p*<0.0001, según el test de χ^2 , seguido de un test exacto de Fisher. NIE (Neoplasia Intraepitelial Endometrial), CEE-1 (Carcinoma Endometrial Endometriode de grado 1), CEE-3 (Carcinoma Endometrial Endometriode de grado 3).

Además, un 64% de los animales *Pten*^{f/f}; *p53*^{f/f}, no solo presentaban un mayor grado de carcinoma endometrial, sino que este presentaba invasión miometrial. En algunos de los casos, estos endometrios incluso presentaban necrosis tumoral, una de las características distintivas de los tumores agresivos en cáncer de endometrio (Bredholt et al., 2015). A la figura 71, se muestran H-E de algunos de los CEE de grado 3 en las regiones donde las células epiteliales se encuentran invadiendo el miometrio.

A

Pten^{f/f}; p53^{f/f}



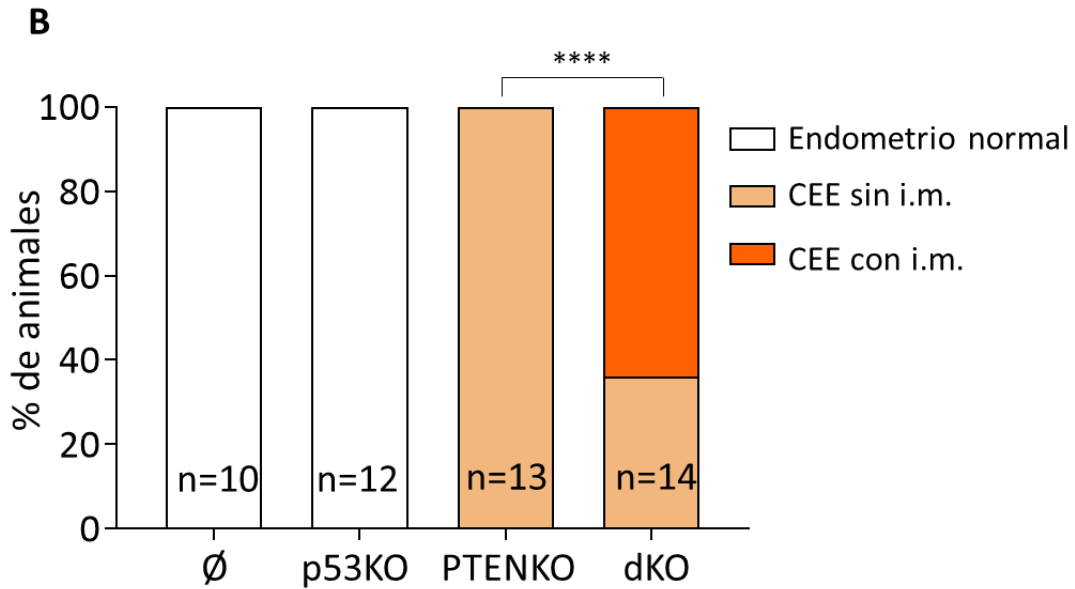


Figura 71. La pérdida de *Pten* y *p53* en las células endometriales desencadena en lesiones tumorales que presentan un fenotipo de invasión miometrial. (A) Ejemplificación de la tinción con H-E de endometrios diagnosticados de invasión miometrial en los ratones *Pten^{f/f}*; *p53^{f/f}* tras 4 meses de la administración intrauterina de la TAT-Cre. Imágenes a 2x y amplificación a 20x, barras de 500µm y 50µm respectivamente. La flecha negra señala la zona necrótica en uno de los casos. **(B)** Cuantificación de los endometrios que fueron diagnosticados de invasión miometrial en ratonas *Pten^{+/+}*; *p53^{+/+}* (Ø), *Pten^{+/+}*; *p53^{f/f}* (*p53KO*), *Pten^{f/f}*; *p53^{+/+}* (*PTENKO*), y *Pten^{f/f}*; *p53^{f/f}* (*dKO*) a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. *****p*<0.0001, mediante un test exacto de Fisher. CEE, Carcinoma endometrial endometriode; i.m., invasión miometrial.

Para corroborar que estas células que invadían el miometrio eran epiteliales, gracias a la inmunohistoquímica contra PTEN y citoqueratina 8 (KRT8 o CK8), una queratina presente en el endometrio sano y tumoral (*Kabukcuoglu et al., 2010; Wonodirekso et al., 1993*), se comprobó que estas células que traspasaban los límites del miometrio, eran epiteliales.

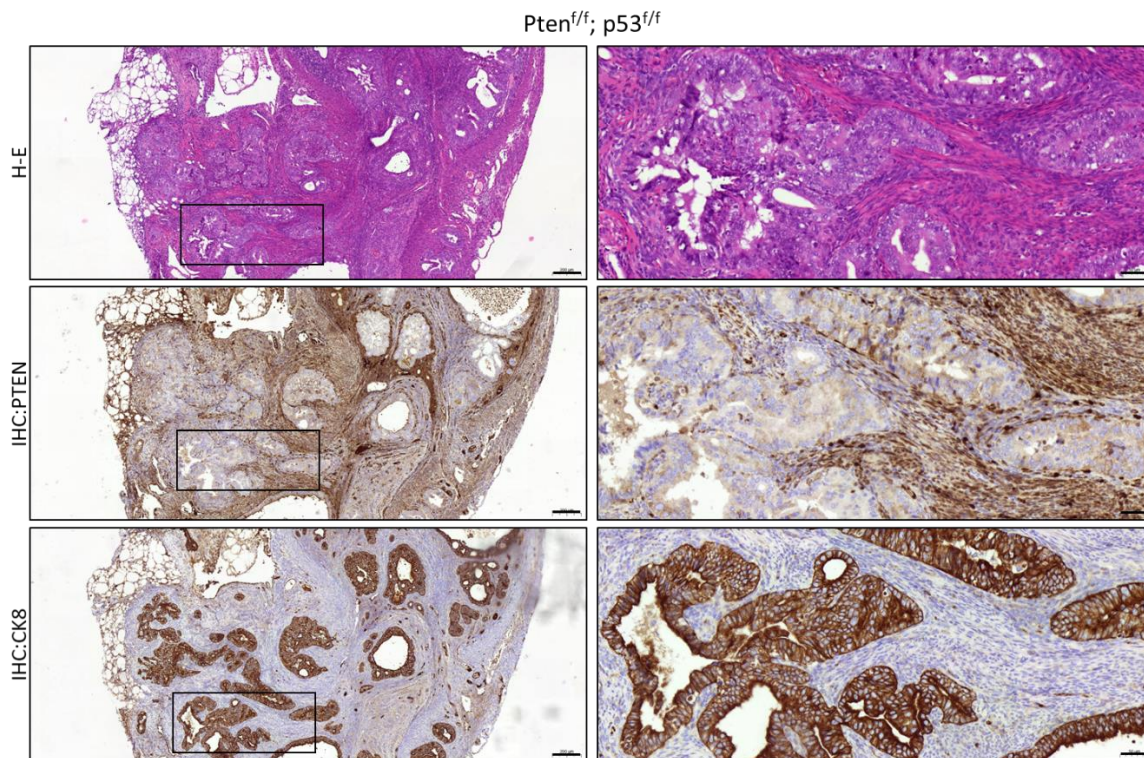


Figura 72. Las células endometriales que presentan un fenotipo de invasión miometrial son epiteliales. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica (IHC) contra hematoxilina-eosina (H-E), PTEN y citoqueratina 8 (CK8) de los cortes histológicos de los endometrios Pten^{f/f}; p53^{f/f} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina, en las regiones del tejido donde se observó componente celular invadiendo el miometrio uterino a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 5x y a 20x. Barras de 200µm y 50µm respectivamente.

Aunque los tejidos fueron analizados mediante técnicas histológicas de inmunodetección para CD31 y D2-40, marcadores de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, no fuimos capaces de detectar ninguna célula tumoral en proceso de invasión linfovascular. (Imágenes de inmunohistoquímica no mostradas)

El modelo TAT-Cre permite la generación de sarcomas uterinos deficientes para PTEN y p53.

Como se ha comentado con anterioridad, la TAT-Cre introducida de manera intrauterina no inducía la actividad recombinasa de manera específica en las células epiteliales del endometrio, sino que también desencadenaba la modificación génica en el resto de componentes tisulares del útero, tanto en el miometrio como en el estroma endometrial (Figura 66).

Por este motivo, al analizar las protuberancias observadas macroscópicamente en los animales Pten^{f/f}; p53^{f/f} en la figura 68C, al examinar histológicamente estos bultos, se determinó que estos animales, además de los adenocarcinomas de alto grado, presentaban lesiones uterinas derivadas de componentes no epiteliales, es decir, sarcomas uterinos. Estos tumores, tal y como se puede observar en las imágenes de la figura 73, seguían un patrón celular heterogéneo.

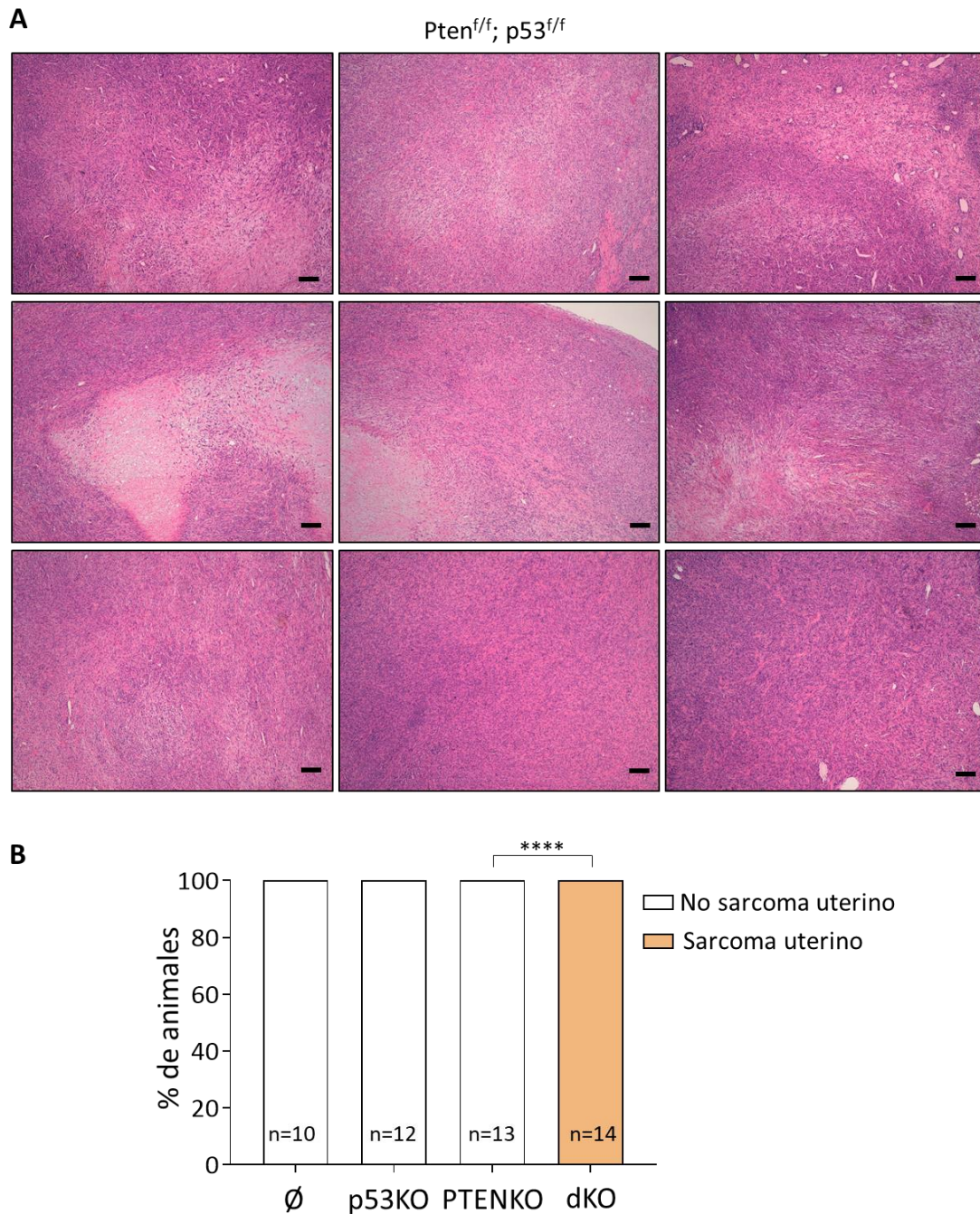


Figura 73. La delección de *Pten* y *p53* en células estromales y miometriales desencadenan la aparición de sarcomas uterinos. (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de algunas de las protuberancias uterinas de los ratones $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$ a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 4x. Barra de 200 μ m. **(B)** Cuantificación del número de ratones que presentaron lesiones tumorales de tipo sarcoma uterino en ratonas $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$ (\emptyset), $Pten^{+/+}; p53^{f/f}$ (p53KO), $Pten^{f/f}; p53^{+/+}$ (PTENKO), y $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ (dKO) a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina. **** $p < 0.0001$, mediante un test exacto de Fisher.

Tanto es así, que como se muestra en las figuras 74 y 75, al realizar un análisis inmunohistoquímico de estos tejidos se evidenció que estos tumores estaban conformados por una variada mezcla de diversos tipos de sarcomas, lo que complicó su diagnóstico final, puesto que resultó imposible la determinación de un único tipo de sarcoma uterino (leiomiomas uterinos, sarcoma de estroma

endometrial,...) De esta forma, estos tumores presentaron zonas con diversos grados de positividad en el marcaje así como regiones negativas para los distintos marcadores que se estudiaron: α -actina de musculo liso, h-caldesmon, calretinina, CD10 y desmina.

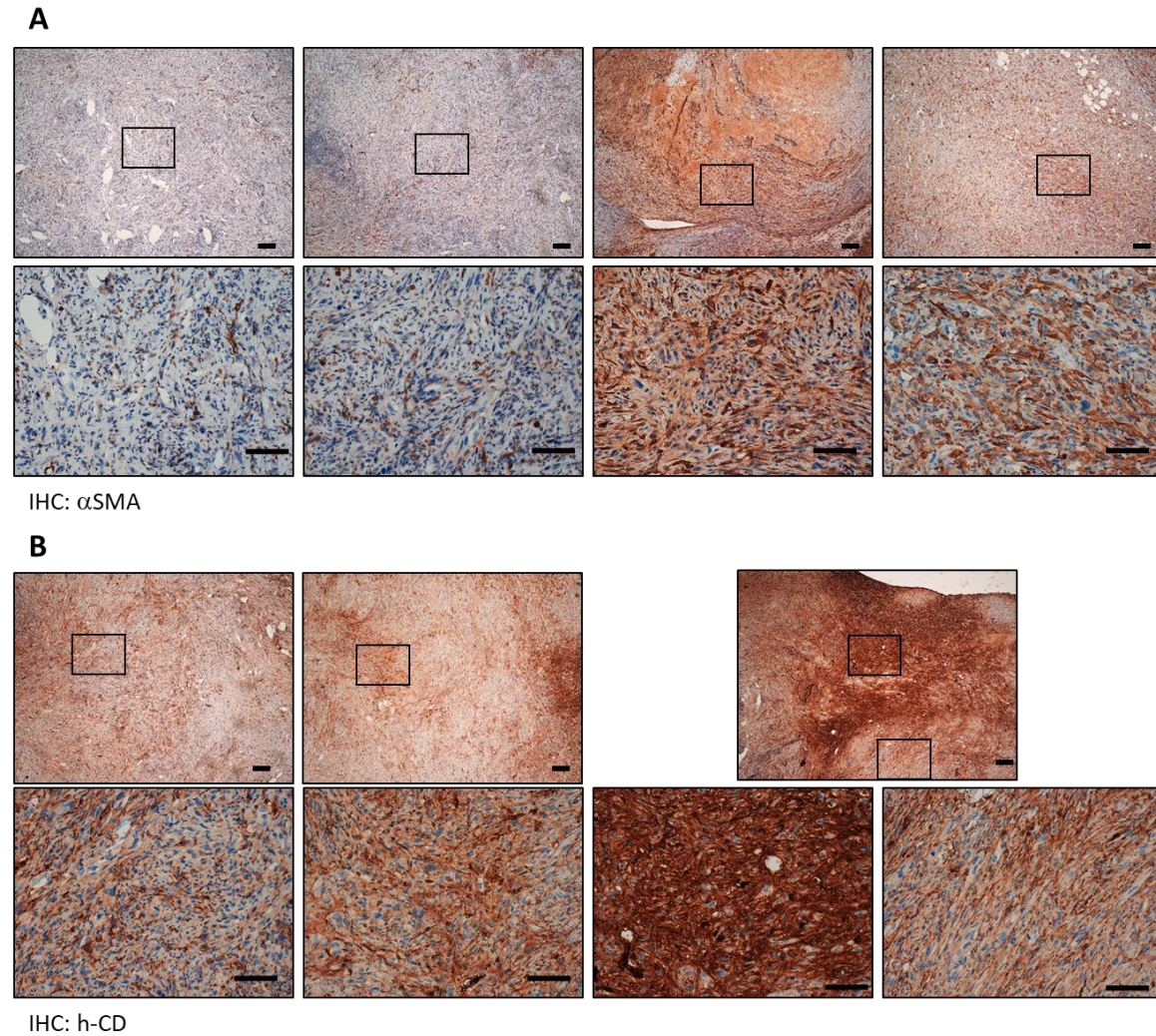
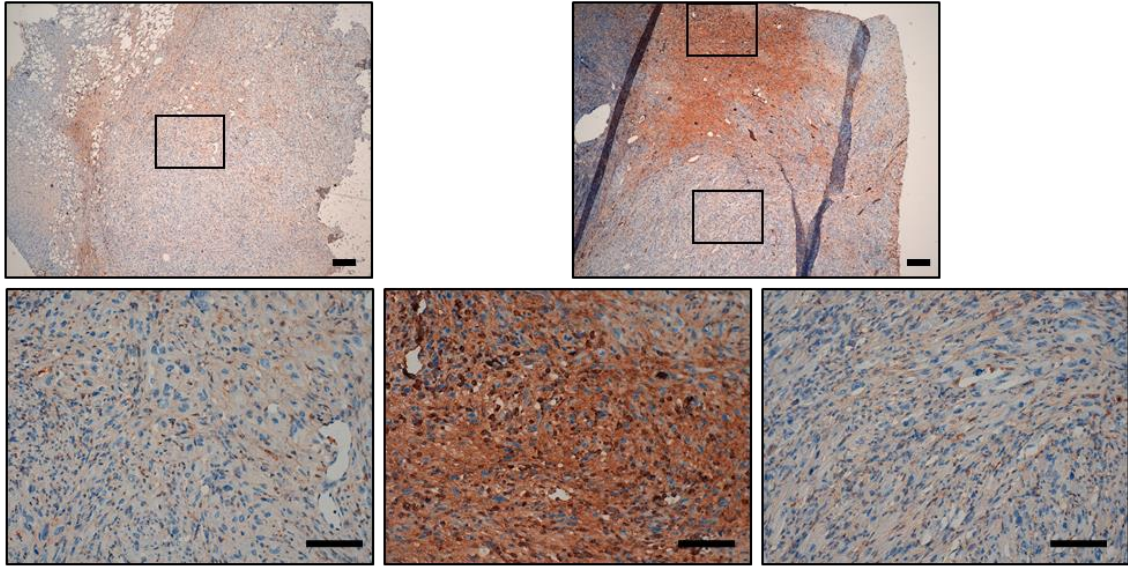
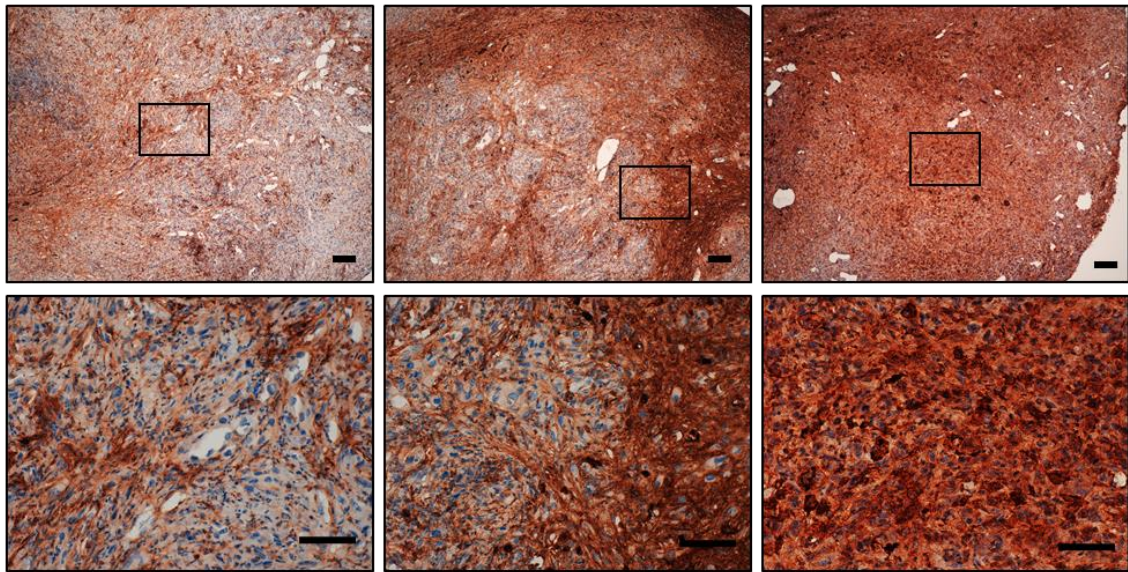


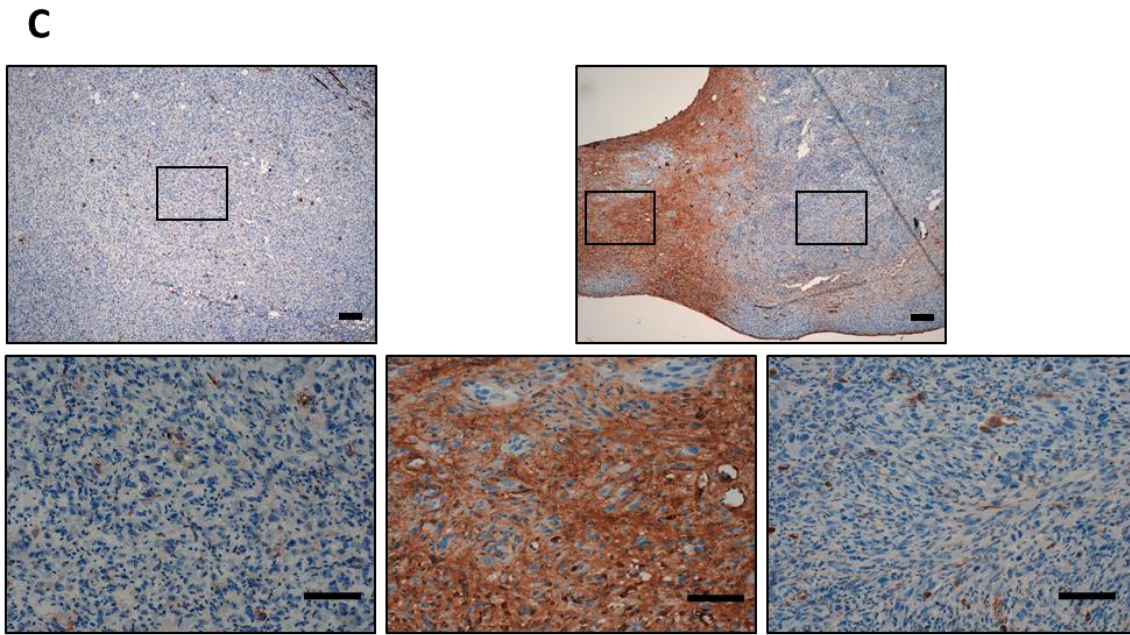
Figura 74. Los sarcomas uterinos desarrollados por la delección de *Pten* y *p53* en células estromales y miometriales presentan un patrón heterogéneo para marcadores diferenciales entre los sarcomas. (A) Imágenes representativas de la tinción contra α SMA (α -actina de musculo liso, del inglés *Smooth muscle α -actin*) en los sarcomas uterinos de los ratones *Pten*^{ff}; *p53*^{+/+} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina, Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra h-CD (h-caldesmon) en los sarcomas uterinos de los ratones *Pten*^{ff}; *p53*^{+/+} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina, Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente.

A

IHC: CRT

B

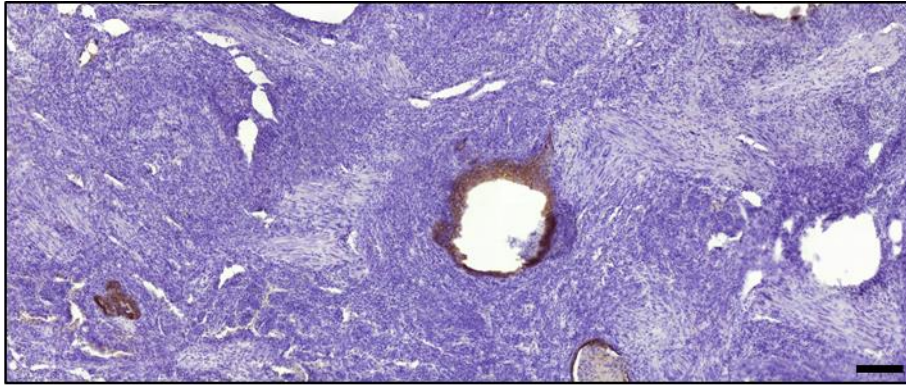
IHC: CD10



IHC: desmina

Figura 75. Los sarcomas uterinos desarrollados por la delección de *Pten* y *p53* en células estromales y miometriales presentan un patrón heterogéneo para marcadores diferenciales entre los sarcomas. (A) Imágenes representativas de la tinción contra calretinina (CRT) en los sarcomas uterinos de los ratones *Pten*^{f/f}; *p53*^{+/+} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88μg de TAT-Cre casera por rama uterina, Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200μm y 100μm, respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra CD10 en los sarcomas uterinos de los ratones *Pten*^{f/f}; *p53*^{+/+} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88μg de TAT-Cre casera por rama uterina, Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200μm y 100μm, respectivamente. **(C)** Imágenes representativas de la tinción contra desmina en los sarcomas uterinos de los ratones *Pten*^{f/f}; *p53*^{+/+} a los 4 meses tras la inyección intrauterina de 88μg de TAT-Cre casera por rama uterina, Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200μm y 100μm, respectivamente.

Vale la pena destacar que, en algunas zonas de estos denominados sarcomas uterinos, se podían encontrar zonas que presentaban marcaje positivo para CK8 (epiteliales). Esto podía deberse a que en alguno de estos denominados sarcomas algunas de sus regiones sarcomatosas fueran parte del componente sarcomatoso de carcinosarcomas derivados de las células epiteliales de adenocarcinomas de alto grado.



IHC: CK8

Figura 76. Las protuberancias tumorales uterinas presentaban regiones positivas para citoqueratina 8, un marcaje epitelial. Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica contra citoqueratina 8 (CK8). Imagen a 5x. Barra de 200 μ m.

Entonces, nuestros resultados sugieren que este nuevo modelo generado a partir de la inducción de la delección génica de manera condicional a través de la TAT-Cre administrada de manera intrauterina permite a la larga el estudio de sarcomas uterinos.

La administración de la proteína TAT-Cre de manera intravaginal conduce a la generación de carcinosarcomas uterinos deficientes para PTEN y p53.

Con el objetivo de eliminar la variante donde se produce la delección génica en las células musculares del miometrio, se suministró la proteína TAT-Cre de manera intravaginal. Para ello, de nuevo se introdujo en ratones $Pten^{+/+}$; $p53^{+/+}$, $Pten^{+/+}$; $p53^{f/f}$, $Pten^{f/f}$; $p53^{+/+}$, y $Pten^{f/f}$; $p53^{f/f}$ 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina mediante esta nueva vía de administración.

Así, tal y como se muestra en la figura 77, una vez transcurridos 3 semanas desde el día de la administración de la TAT-Cre, mediante un análisis inmunohistoquímico de uno de los ratones $Pten^{f/f}$; $p53^{+/+}$, se evidenció que la pérdida de PTEN, en este modelo solo se daba siguiendo un patrón de mosaico, en el estroma y en las células epiteliales del endometrio.

De forma análoga a lo ocurrido tras la inyección intrauterina, transcurridos 4 meses desde el día de la inducción de la ablación génica se procedió al sacrificio de los animales de los distintos grupos génicos. El análisis macroscópico de los úteros de estos roedores reveló que ninguno de los animales que habían sufrido delección en ambos genes presentó abultamientos uterinos tan significativos como lo hacían cuando la proteína recombinante era introducida mediante la otra vía de administración. No obstante, como se muestra en la figura 78, ciertas zonas de los úteros dKO presentaron ensanchamientos llamativos a lo largo de sus ramas uterinas.

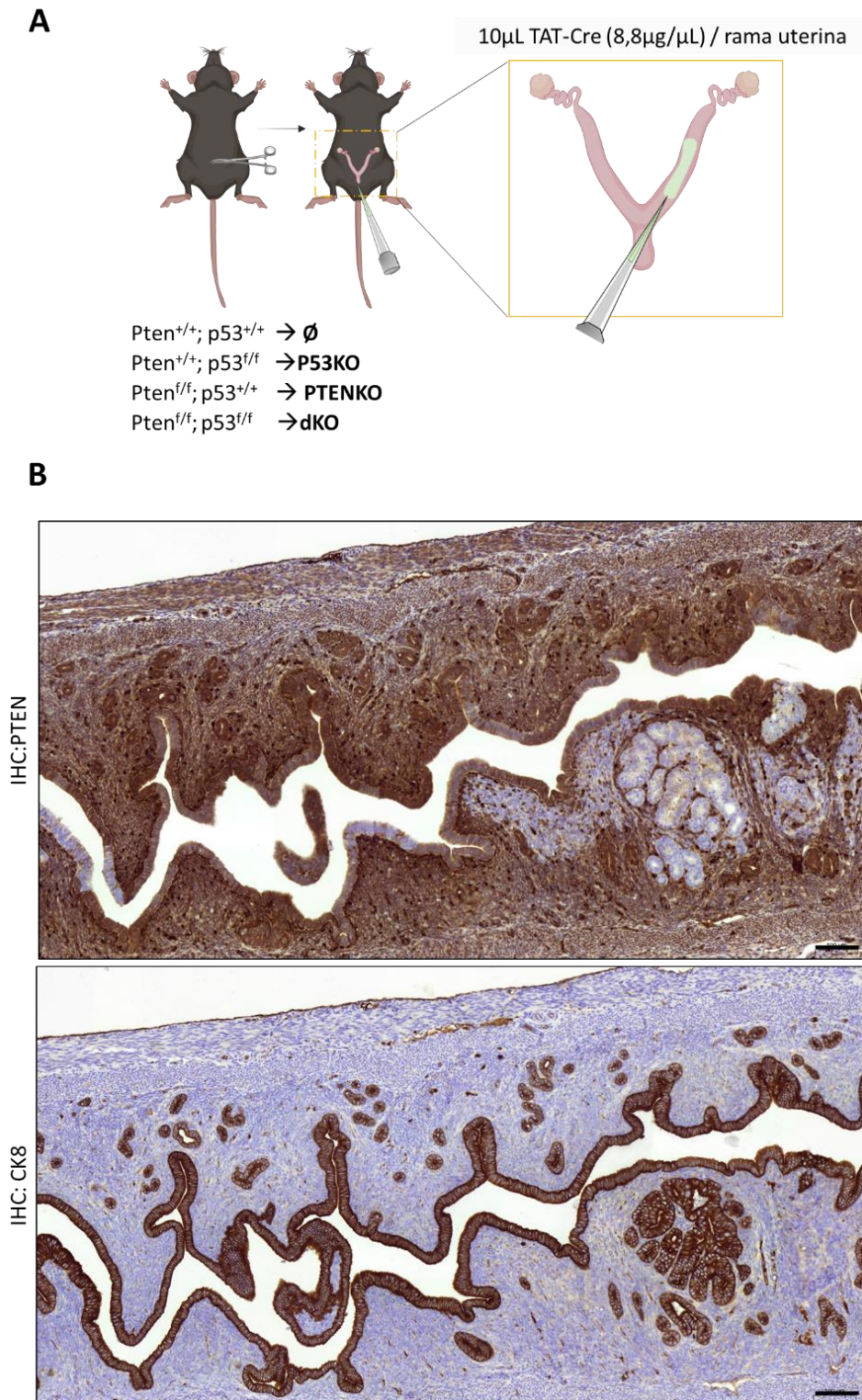


Figura 77. La administración intravaginal de la TAT-Cre desencadena la recombinación génica en estroma y epitelio endometrial. (A) Esquema de la administración intrauterina de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina en los ratones $Pten^{+/+}; p53^{+/+}$ (sin modificaciones génicas, \emptyset o *wildtype*), $Pten^{+/+}; p53^{ff}$ (p53KO), $Pten^{ff}; p53^{+/+}$ (PTENKO), y $Pten^{ff}; p53^{ff}$ (dKO). **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra PTEN y citoqueratina 8 (CK8) de los cortes histológicos de los endometrios $Pten^{ff}; p53^{+/+}$ a las 3 semanas de administrar intravaginalmente la TAT-Cre casera donde se puede células epiteliales endometriales deficientes para PTEN (positivas para CK8) y regiones de estroma epitelial carentes de expresión de PTEN (negativas para CK8). Imágenes a 10x. Barra de 100µm.

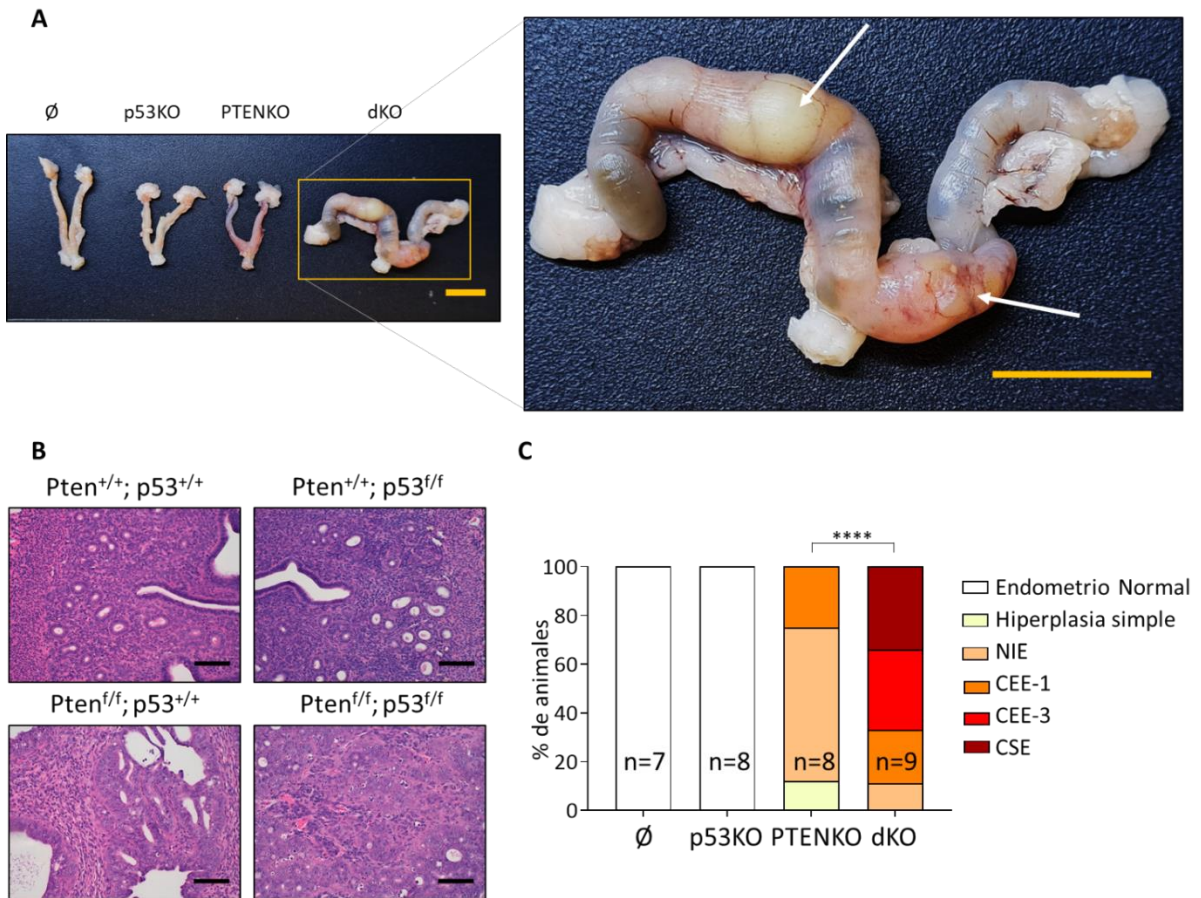


Figura 78. La pérdida de PTEN y p53 inducida por la administración intravaginal de la TAT-Cre desencadena la aparición de carcinomas endometriales de alto grado y carcinosarcomas. (A) Imágenes macroscópicas representativas de los úteros de ratones Pten^{+/+}; p53^{+/+} (∅), Pten^{+/+}; p53^{f/f} (p53KO), Pten^{f/f}; p53^{+/+} (PTENKO), y Pten^{f/f}; p53^{f/f} (dKO) a los 4 meses tras la administración intravaginal de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. Ampliación del uteo perteneciente a uno de los ratones dKo, donde se señalan con flechas blancas abultamientos uterinos observados de manera macroscópica. Barras de 1cm. **(B)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los endometrios de ratones ∅ (normal), P53KO (normal), PTENKO (NIE), dKO (carcinoma de alto grado). Imágenes a 20x. Barra de 100µm. **(C)** Cuantificación de las lesiones diagnosticadas en el endometrio para cada grupo de animales. ****p<0.0001, según el test de χ^2 , seguido de un test exacto de Fisher. NIE (Neoplasia Intraepitelial Endometrial), CEE-1 (Carcinoma Endometrial Endometriode de grado 1/de bajo grado), CEE-3 (Carcinoma Endometrial Endometriode de grado 3/de alto grado), CSE (Carcinosarcoma Endometrial).

El análisis histológico de estos úteros reveló la presencia de lesiones endometriales en todos los ratones de los grupos Pten^{f/f}; p53^{+/+} y Pten^{f/f}; p53^{f/f}. De nuevo, ninguno de los animales pertenecientes a los grupos control ni P53KO mostró ningún signo de patología tumoral. En relación a las lesiones encontradas en los animales del grupo PTENKO, estas fueron diagnosticadas en su mayoría como neoplasias intraepiteliales endometriales y como carcinomas endometriales de bajo grado, donde las zonas tumorales aun presentaban un patrón cribiforme marcado. Por otro lado, los ratones Pten^{f/f}; p53^{f/f} un 66% de los ratones presentaron regiones tumorales donde este patrón epitelial cribiforme había reducido hasta casi desaparecer (tumor sólido), de ahí que el componente

tumoral fuera finalmente diagnosticado como carcinoma endometrial endometriode de alto grado. Sorprendentemente, un 50% de estos animales, no solo presentaban regiones tumorales epiteliales, sino que además presentaron zonas un componente mixto de células mesenquimales tumorales y células epiteliales tumorales. Este hecho, hizo que algunos de los casos fuesen finalmente diagnosticados como carcinosarcoma endometrial.

En la figura 79, se muestra uno de estos casos de carcinosarcomas endometriales donde se puede apreciar el patrón bifásico del tumor endometrial. Al analizar en mayor detalle el componente sarcomatoide de estos tumores se pudo observar que presentaban una elevada tasa mitótica (alguna de ellas mitosis explosivas), así como un marcado pleomorfismo nuclear.

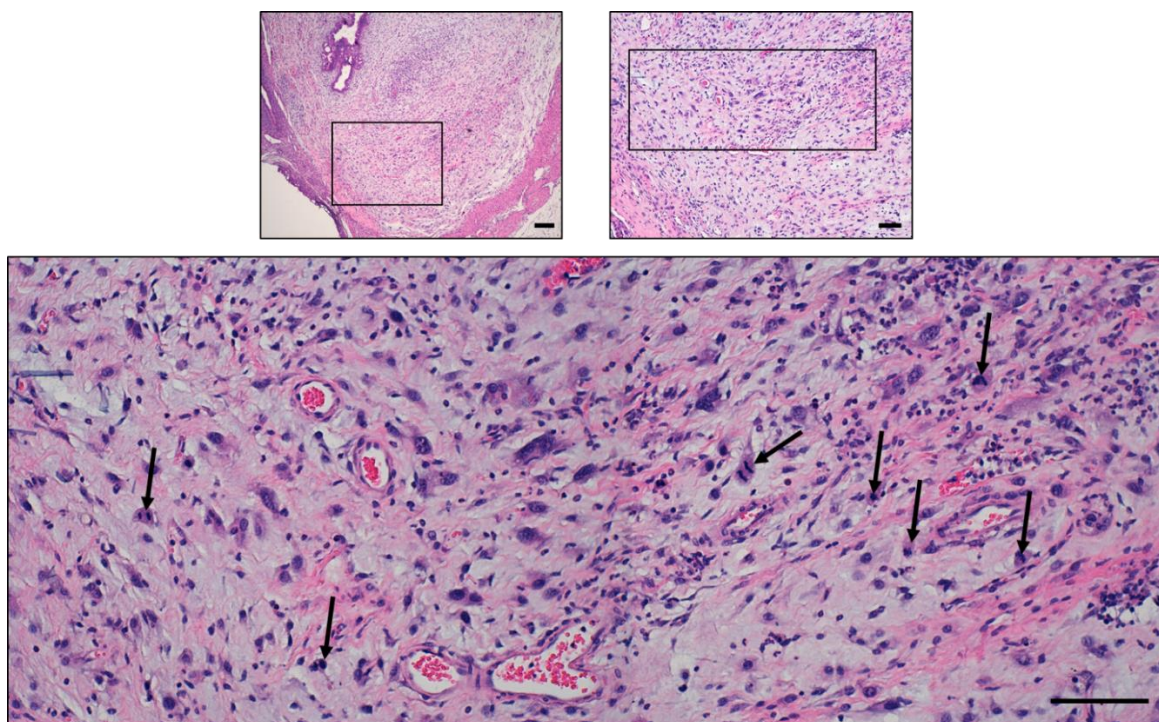


Figura 79. Los carcinosarcomas generados a partir de células endometriales deficientes para PTEN y p53 presentan una alta tasa mitótica y una marcada pleomorfía nuclear. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de uno de los carcinosarcomas generados a los 4 meses a partir de la delección génica inducida por la administración intravaginal en ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ (dKO) de 88 μ g de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 4x, 10x y 20x. Barra de 200 μ m, 100 μ m y 100 μ m, respectivamente. Se señalan con flechas negras algunas de las mitosis encontradas en el componente sarcomatoide del carcinosarcoma endometrial.

Tras observar los efectos de la actividad recombinasa en los úteros de los animales, se procedió al análisis patológico del resto de tejidos, de esta forma, se observó que 3 de los 9 ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ a los que se les había administrado la TAT-Cre de manera intravaginal presentaban microlesiones de apariencia epitelial. Como se muestra en la figura 80, la determinación del tipo celular estos focos metastásicos fue determinado mediante inmunohistoquímica contra citoqueratina 8, de esta forma se confirmó que estas células eran de origen epitelial.

Posteriormente, con el fin de definir si el origen de estos nódulos pulmonares era el endometrio, se realizó una serie de tinciones contra α ER y PAX8. La literatura existente, describe que en las metástasis endometriales el marcador del receptor de estrógenos puede perderse a pesar de que los tumores primarios sean positivos (nuclear) para este marcador (*Bartosch et al., 2015*). La inmunohistoquímica contra este receptor mostró un patrón heterogéneo, pero con presencia principal en las membranas plasmáticas. No obstante, estas lesiones presentaban un claro marcaje nuclear para PAX8, lo que finalmente nos hizo sugerir que estas micrometástasis pulmonares eran de origen endometrial (*Tong et al., 2011*).

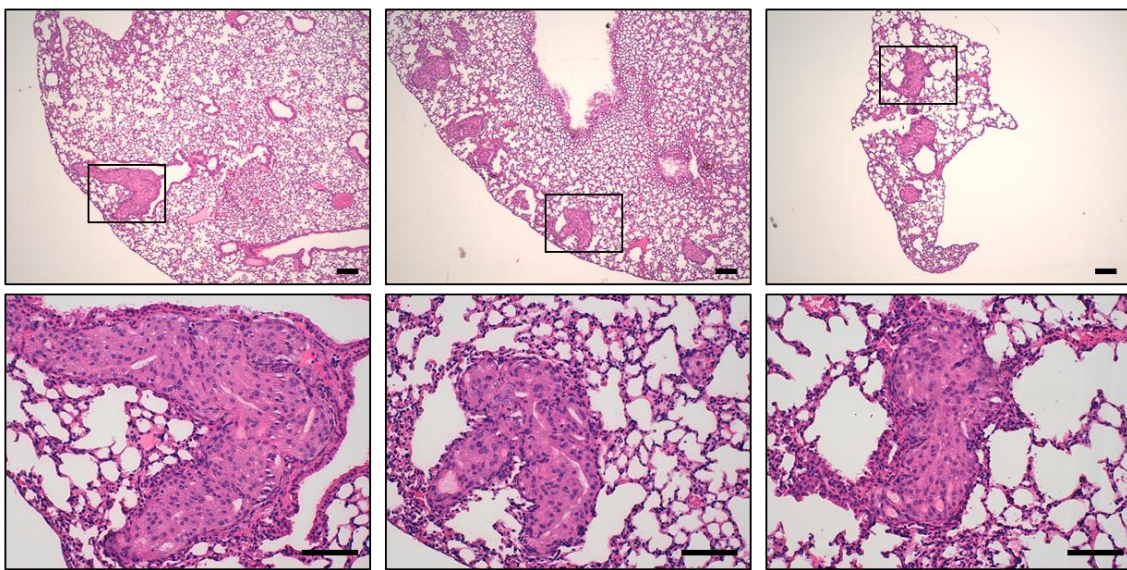
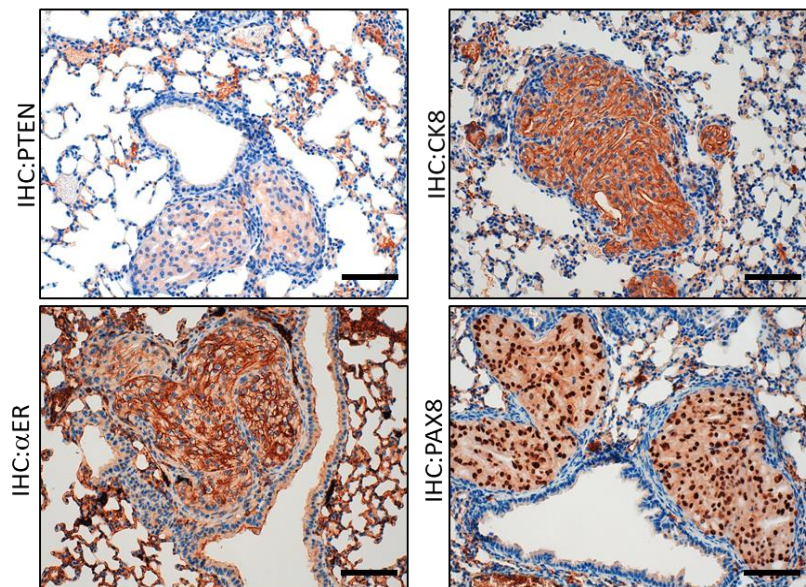
A $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ **B**

Figura 80. La pérdida de PTEN y p53 inducida por la administración intravaginal de la TAT-Cre desencadena la aparición de micrometástasis pulmonar. (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de tres regiones pulmonares donde se pueden apreciar las micrometástasis generadas a los 4 meses a partir de la delección génica inducida por la administración intravaginal en ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ (dKO) de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 4x y 20x. Barra de 200µm y 100µm, respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra PTEN, citoqueratina 8 (CK8), receptor alfa de estrógenos (α ER) y la proteína 8 de la caja emparejada (PAX8, del inglés *Paired Box 8 protein*) de las micrometástasis pulmonares generadas a los 4 meses a partir de la delección génica inducida por la administración intravaginal en ratones $Pten^{f/f}; p53^{f/f}$ (dKO) de 88µg de TAT-Cre casera por rama uterina. Imágenes a 20x. Barras de 100µm.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la pérdida bialélica de *p53* en tumores deficientes para *Pten* potencia el desarrollo de carcinomas endometrioides endometriales de mayor grado, y que el modelo inducible TAT-Cre administrado de manera intravaginal permite generar un nuevo modelo de carcinosarcomas endometriales, así como un modelo de metástasis endometriales.

GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO CON DELECCIÓN ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO MEDIANTE EL USO DE UN MODELO HÍBRIDO *EX VIVO-IN VIVO* CON CÉLULAS AISLADAS DE ENDOMETRIO

A pesar de los resultados obtenidos con los explantes *ex vivo-in vivo* con fragmentos de endometrio, los resultados obtenidos en el ratón $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ que presento angiоinvasión de las células epiteliales endometriales y en los ratones $PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ tratados con la TAT-Cre que desarrollaron carcinomas endometriales de alto grado y carcinosarcomas, nos incitaron a continuar probando los modelos híbridos *ex vivo-in vivo* de xenógrafos mediante la introducción de manera subcutánea de co-cultivos de células estromales y miometriales *wild-type* con células endometriales epiteliales que presentaran o no alteraciones en la expresión de *Pten* y/o *p53*. De esta manera, con este nuevo objetivo, se pretendía demostrar que el componente sarcomatoso de los carcinosarcomas encontrados los ratones $PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ en nuestro modelo TAT-Cre, se originaban a partir de la transdiferenciación epitelio-mesénquima de las células epiteliales de los carcinomas epiteliales endometriales, teoría actualmente aceptada en la mayoría de los casos, y no a partir del estroma que había sufrido también mutaciones en ambos genes.

Para comenzar, siguiendo el esquema que se presenta en la figura 81 (explicado en mayor detalle en el apartado Materiales y Métodos), se extrajo por un lado, células estromales y miometriales de ratones C57BLACK/6J y por otro células epiteliales endometriales de ratones $Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$, $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}$, $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+}$ y $Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}$ a las cuales se les indujo *in vivo* la ablación génica mediante la administración con tamoxifeno. Así, una vez transcurridas 24h desde la ablación génica, se establecieron los cultivos bidimensionales de los diferentes tipos celulares uterinos de ratón. El día siguiente, como se muestra en la figura 81, se

procedió a la inyección subcutánea de los 4 tipos de células endometriales junto con células estromales y miometriales *wild-type*.

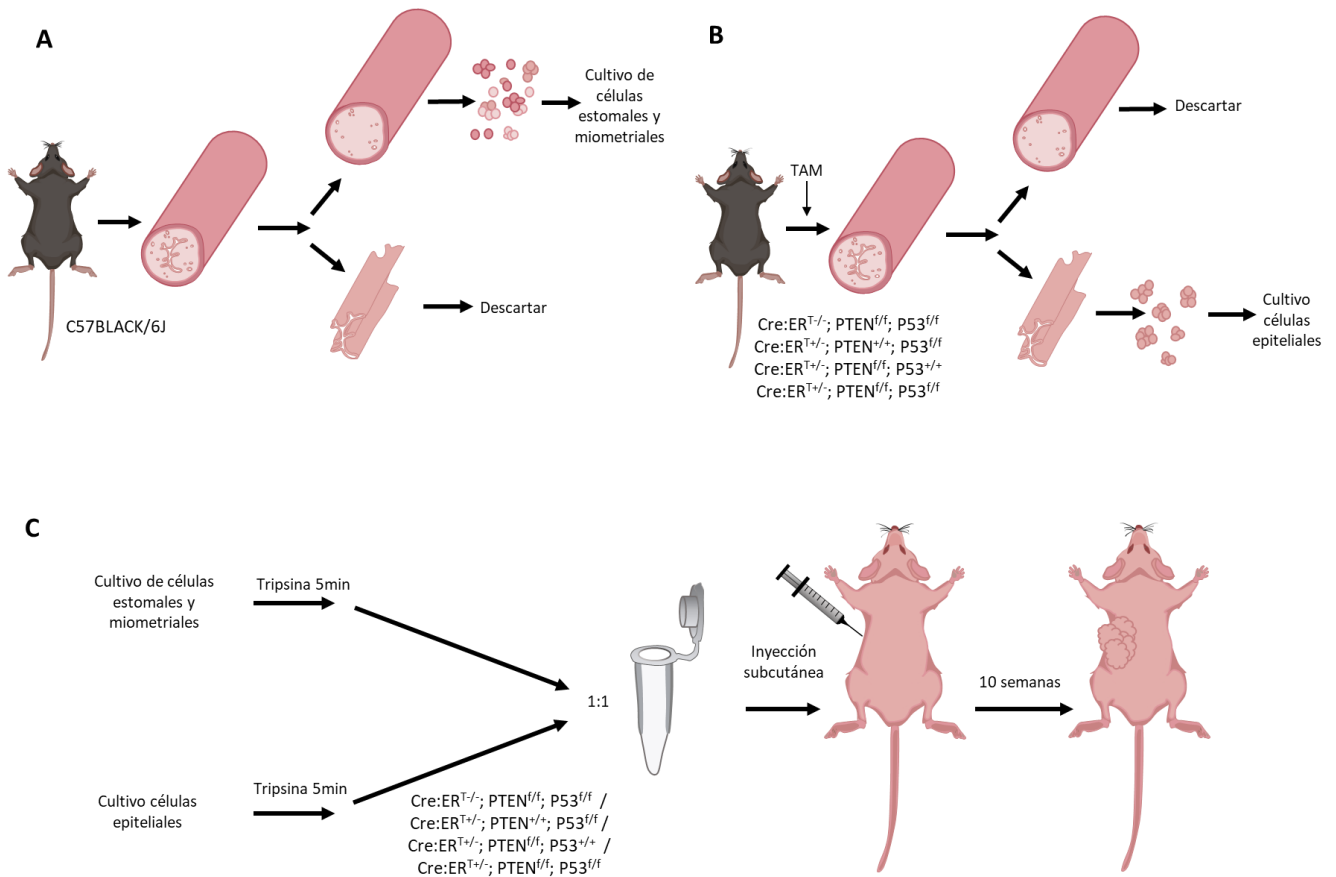


Figura 81. Diseño experimental del modelo híbrido *ex vivo-in vivo* de xenógrafos de células uterinas con delección específica en las células epiteliales endometriales. (A) Esquema resumen para la extracción y realización de cultivos de células estromales y miometriales de ratones C57BLACK/6J. **(B)** Esquema resumen para la extracción y realización de cultivos de células epiteliales endometriales Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/-}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/-} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} y la delección génica *in vivo* en las mismas con tamoxifeno (TAM). **(C)** Esquema resumen para la inyección subcutánea de las distintas combinaciones celulares en ratonas inmunodeprimidas SCID y el sacrificio de las mismas a las 10 semanas tras la implantación celular.

La delección *in vivo* de los genes de interés nos permitió desencadenar la delección génica únicamente en las células epiteliales del endometrio (Mirantes et al., 2013a). Aun así, para corroborar la actividad recombinasa en las células epiteliales se realizó un Western blot de lisados de una fracción de las células endometrial que fueron inyectadas, lo que permitió ver, como se muestra en la figura 82, que se había producido la correcta ablación génica en las mismas.

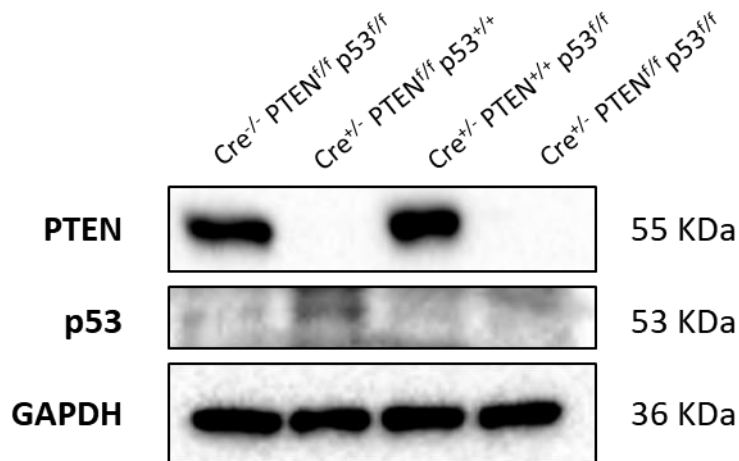
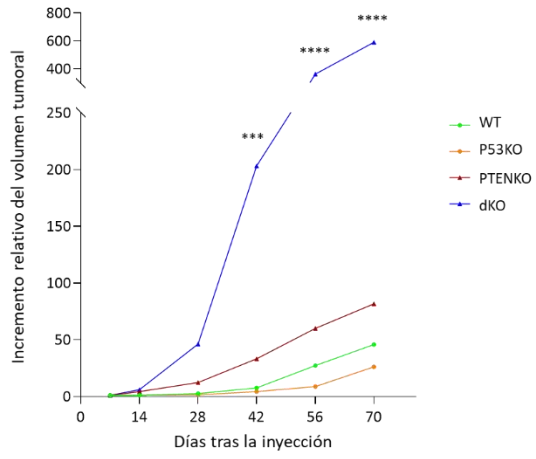


Figura 82. Las células epiteliales endometriales a partir de las cuales se realizaron xenógrafos de células uterinas habían sufrido la correcta ablación génica. Evaluación de la expresión de PTEN y p53 a partir de lisados de parte de las células epiteliales utilizadas para la generación de xenógrafos de células uterinas murinas. Como control de carga se emplea la GAPDH.

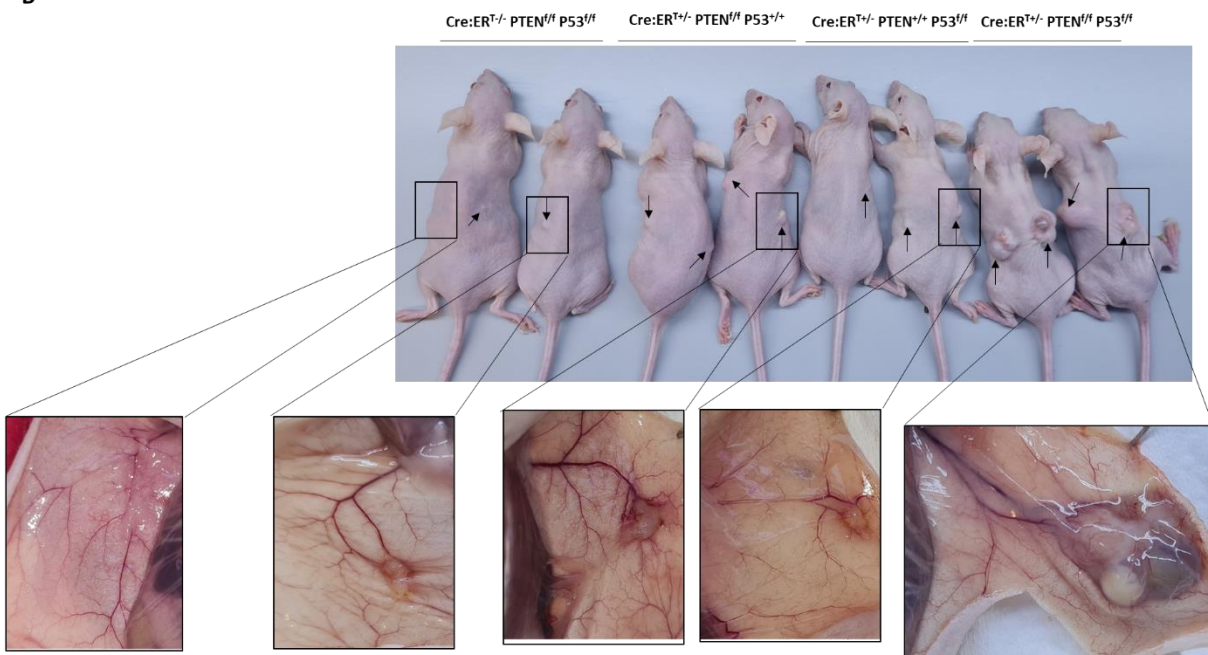
Así, tras la inyección de manera subcutánea a la espalda de los ratones SCID, se monitorizó el crecimiento tumoral semanalmente (Figura 83A), hasta que los xenógrafos en el grupo Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} alcanzaron un tamaño superior a 1 cm³ habiendo transcurrido 10 semanas desde la inyección.

Como se puede ver en la figura 83, todos los tumores establecidos con las diversas combinaciones de células uterinas, se implantaron de manera correcta y en todos ellos se produjo angiogénesis hacia los tumores celulares. Además, los tumores con células epiteliales endometriales deficientes de PTEN y p53 presentaban un mayor crecimiento tumoral y un volumen significativamente mayor en comparación con el resto de xenógrafos donde se habían empleado células epiteliales del resto de genotipos.

A



B



C



Figura 83. Imágenes de los modelos híbrido *ex vivo-in vivo* de xenógrafos de células uterinas con delección específica en las células epiteliales endometriales de células uterinas. (A) Gráfica de crecimiento tumoral en el tiempo de las distintas condiciones de los xenógrafos. ***p-value<0.001 y ****p-value<0.0001, mediante un análisis two-way ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple Tukey. **(B)** Imagen representativa de los ratones SCIDs tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} con células estromales y miometriales en uno o dos flancos (tumores señalados mediante flechas negras). Abajo, ampliaciones de algunos de los tumores donde se puede ver la angiogénesis hacia los xenógrafos en los cuatro genotipos con respecto al flanco donde no se había implantado nada (imagen de la izquierda). **(C)** Comparación representativa de los tumores obtenidos con las 4 combinaciones de células epiteliales endometriales con células estromales y miometriales. Estos datos provienen del sumatorio de dos experimentos independientes con un total de n=9 animales por condición y entre 14 y 18 flancos por condición.

Después del análisis macroscópico, los tumores se incluyeron en parafina para su posterior evaluación histopatológica. Así se vio que estos presentaban una arquitectura que mimetizaba en cierta manera la morfología de los endometrios normales o tumorales despendiendo del genotipo de las células epiteliales de las cuales partía el tumor. Tal y como se observa en la figura 84, los xenógrafos no ortotópicos originados a partir de células epiteliales de ratonas Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}, Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} presentaron un patrón glandular sano, que al estar localizados de manera extrauterina, mimetizan lo que ocurre en un tipo de patología ginecológica conocida como endometriosis (Burney and Giudice, 2012).

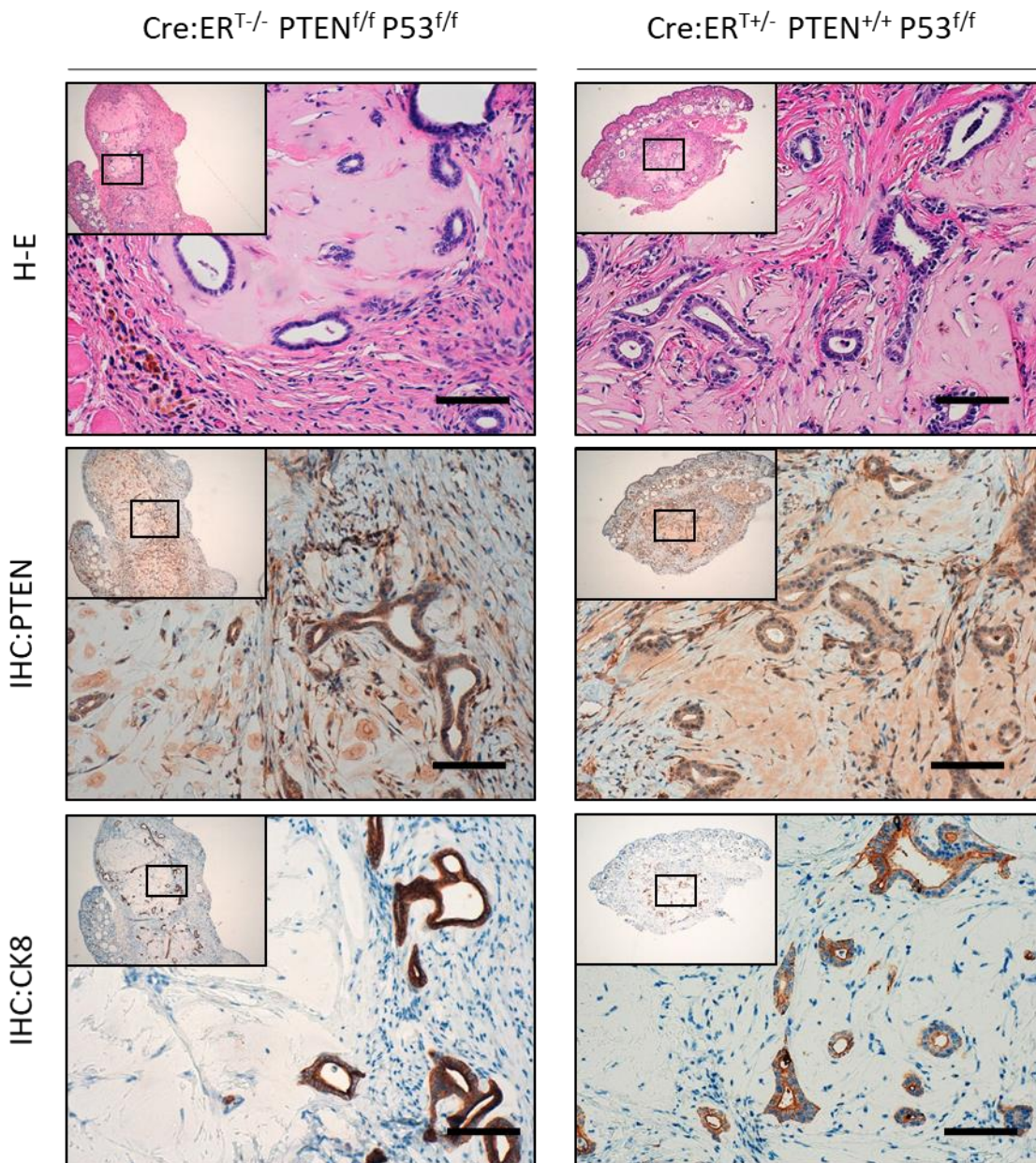


Figura 84. Los xenógrafos no ortotópicos generados a partir de células epiteliales endometriales *wild-type* y deficientes para p53 desencadenan glándulas endometriales no tumorales. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E), citoqueratina 8 (CK8) y PTEN de los xenógrafos no ortotópicos tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (Izquierda), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} (derecha). Imágenes a 4 y 20x. Barras de 100 μ m.

Por otro lado, como se observa en la figura 85, todos los xenógrafos generados a partir de células epiteliales con ablación de *Pten*, a las 10 semanas fueron diagnosticados como adenocarcinomas endometriales de bajo grado, con un patrón glandular cribiforme y fusionado, con un cierto grado de complejidad celular, donde además se podían encontrar también glándulas hiperplásicas complejas similares a las que se observan en los endometrios de los ratones que presentan delección de *Pten* en sus células epiteliales mediante la inducción *in vivo* con tamoxifeno. Además, algunos de estos xenógrafos, presentaban zonas con diferenciación escamosa de estas células epiteliales.

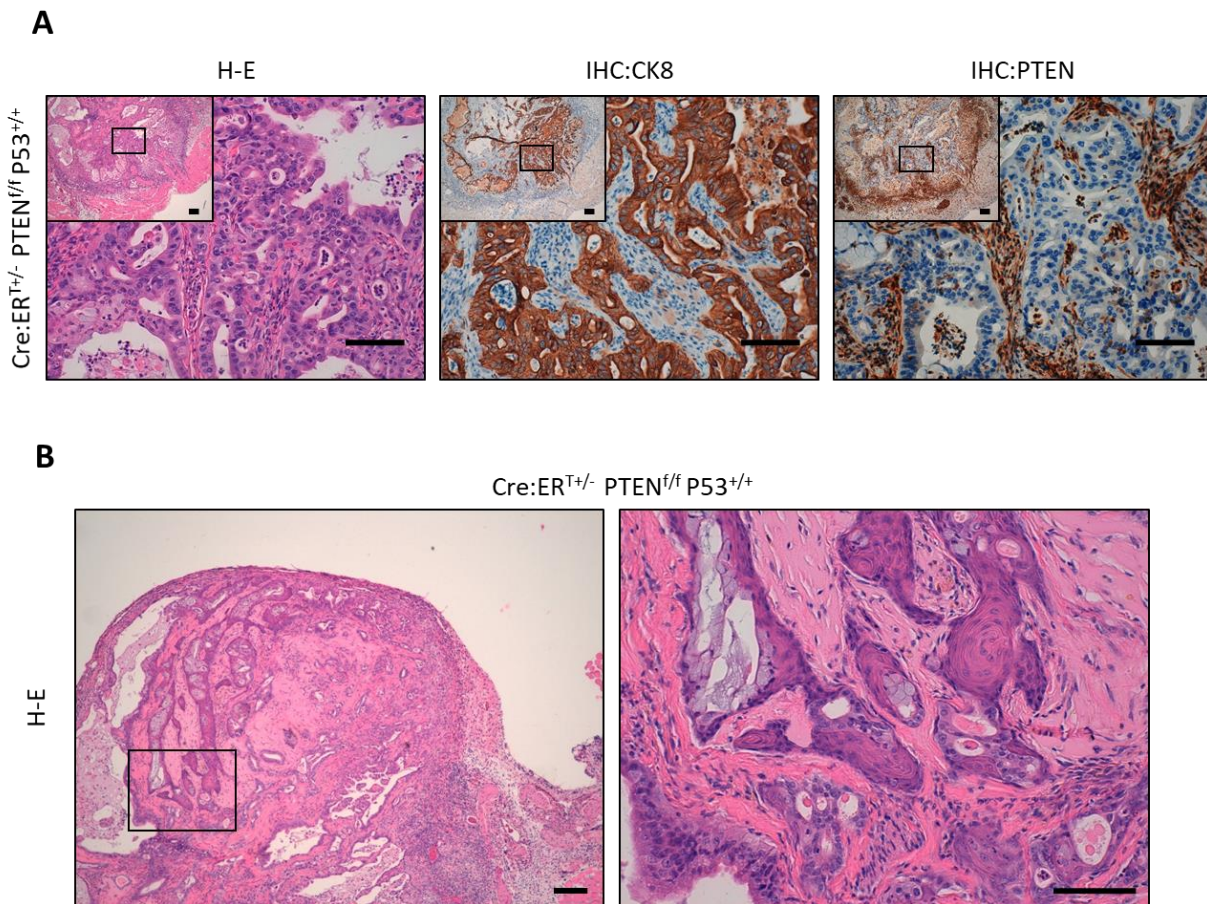


Figura 85. Los xenógrafos no ortotópicos generados a partir de células epiteliales endometriales deficientes para PTEN desencadenan adenocarcinomas endometriales de bajo grado. (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E), la tinción inmunohistoquímica (IHC) contra citoqueratina 8 (CK8) y PTEN de los xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten*. Imágenes a 4x y a 20x. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente. **(B)** Ejemplificación de las regiones de los xenógrafos donde las células epiteliales endometriales han sufrido diferenciación escamosa. Imágenes a 4x y a 20x. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente.

Para cerciorarnos que estas glándulas tumorales y no tumorales encontradas dentro de los xenógrafos eran de origen endometrial, se realizó una inmunohistoquímica contra el marcador por excelencia de las células epiteliales de endometrio, el receptor de estrógenos alfa. Así pudimos comprobar que efectivamente estas glándulas eran de origen endometrial.

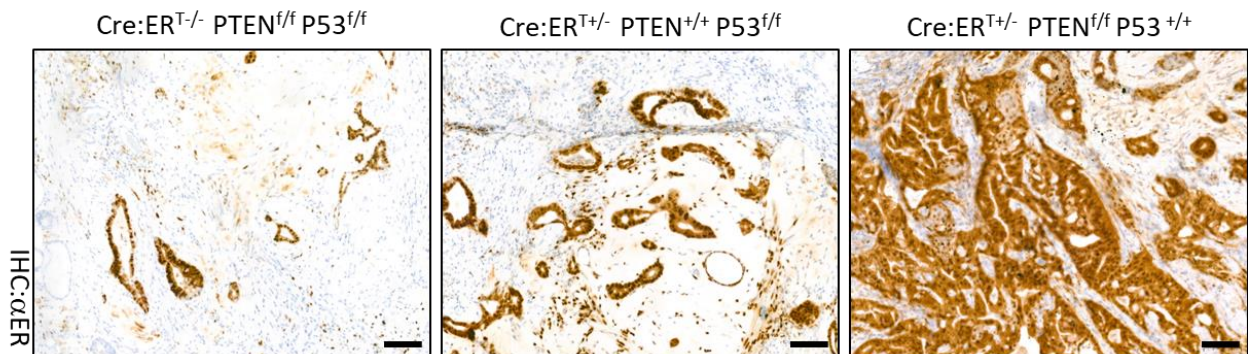


Figura 86. Las glándulas epiteliales de los xenógrafos Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (Izquierda), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} (medio) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (derecha) presentan marcaje positivo para αER. Imágenes respresentativas de la tinción contra receptor de estrógenos alfa (αER) de los xenógrafos no ortotopicos tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones Cre:ER^{T-/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (izquierda), Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{+/+}; P53^{f/f} (medio) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (derecha). Imágenes a 10x. Barras de 100 μm.

No obstante, todos los tumores generados a partir de células Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} fueron diagnosticados como carcinosarcomas de origen no seroso, ya que en todos, se observaron zonas donde estas células epiteliales se habían sufrido el proceso morfogénico de transición epitelio-mesénquima, donde el componente carcinomatosos (epitelial) estaba formado por una mezcla de adenocarcinoma endometriode de alto grado (sólido) y adenocarcinomas endometrioides de bajo grado (con patrón cribiforme).

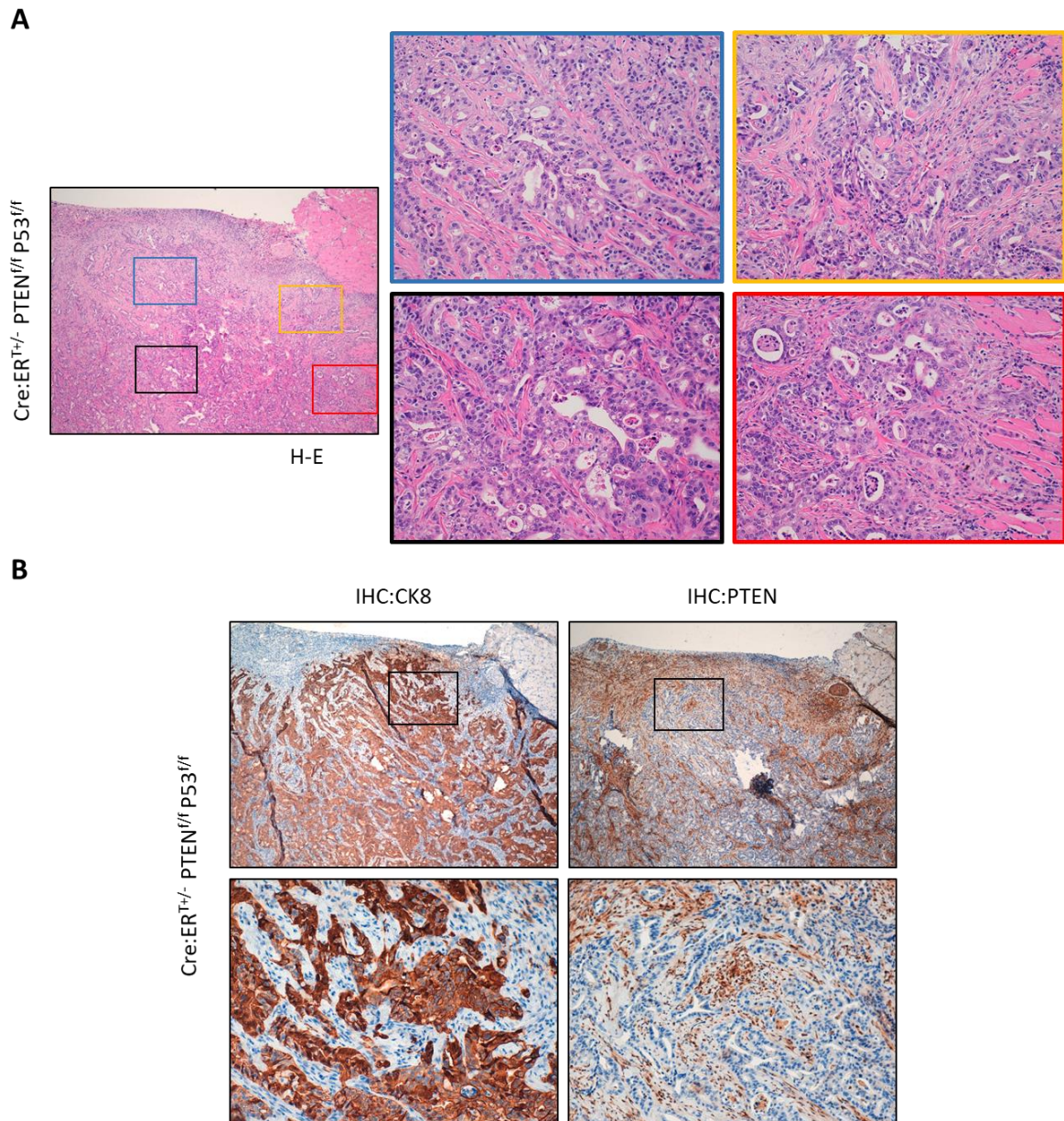


Figura 87. Los xenógrafos no ortotópicos generados a partir de células epiteliales endometriales deficientes para PTEN y p53 desencadenan adenocarcinomas endometriales. (A) Imágenes representativas de tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de las regiones de los xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53* donde se amplían zonas donde se observan los carcinomas endometrioides de bajo grado con patrón cribiforme. (4x y 20x). **(B)** Imágenes representativas de la tinción contra PTEN, CK8 y p53 de los xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53*. (4x y 20x).

Al analizar en mayor detalle las inmunohistoquímicas contra citoqueratina 8 (CK8), donde las células del componente epitelial del carcinosarcoma quedaban marcadas, se observó que la pérdida de PTEN y p53 en las células epiteliales endometriales, al igual que ocurría en los cultivos primarios generados a partir de las mismas, inducía, como se comentaba anteriormente, el proceso biológico de transición epitelio-mesénquima, y por tanto la formación de invadopodios en un número elevado de regiones del tumor, tal y como se puede observar en la figura 88.

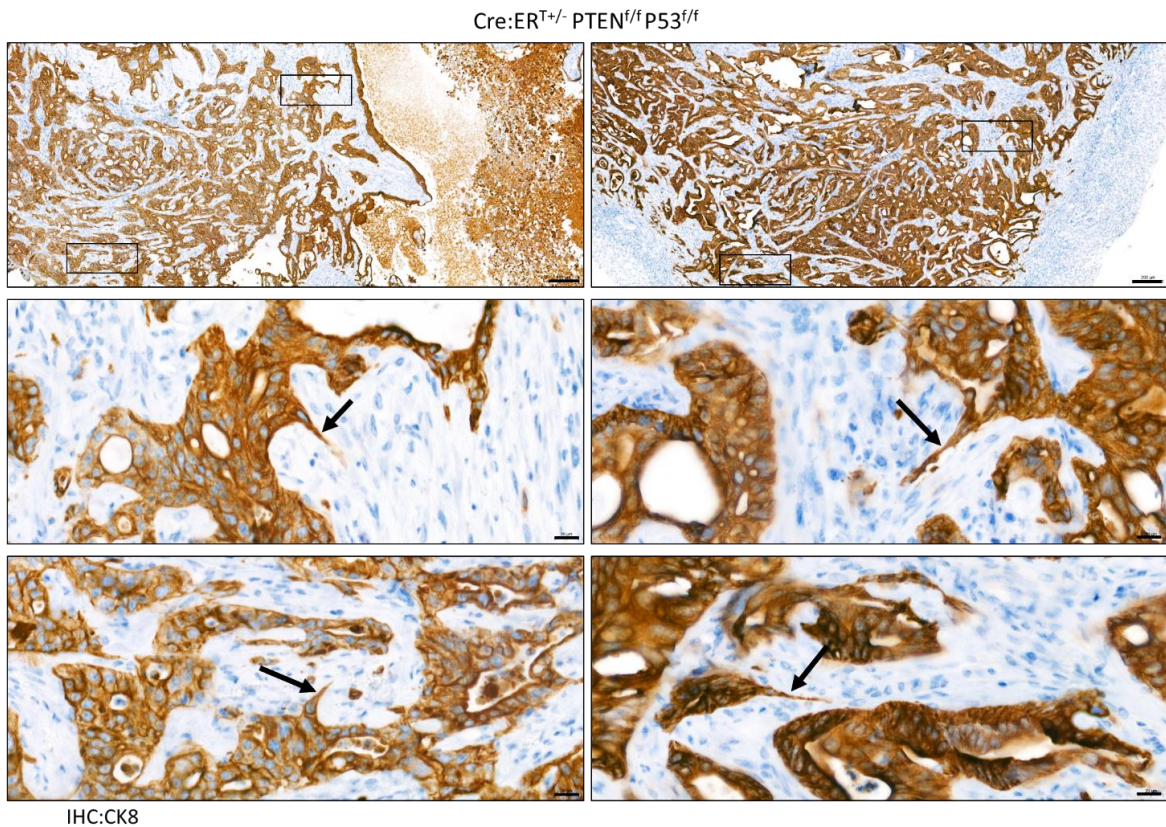
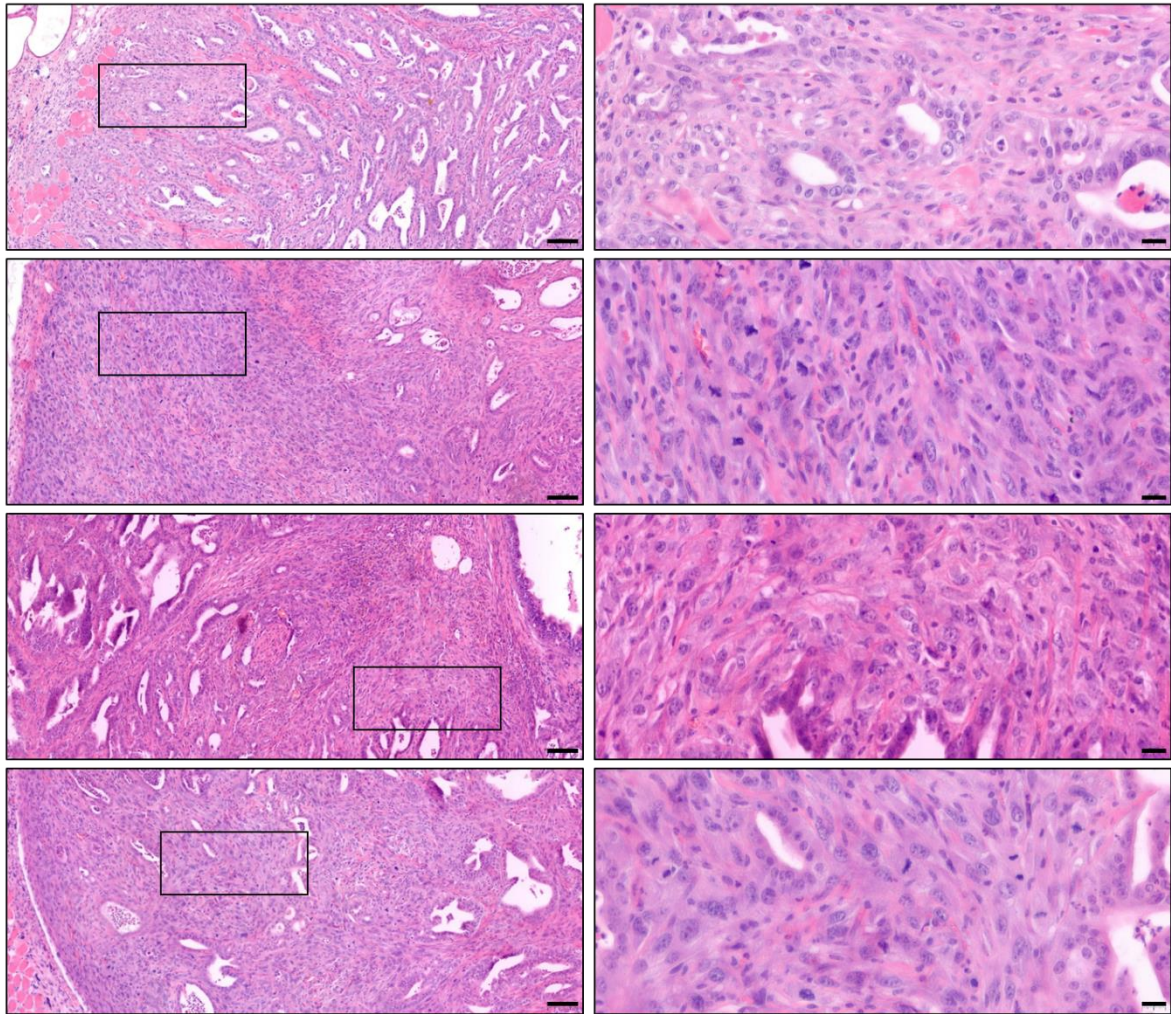


Figura 88. La pérdida de la expresión de *Pten* y *p53* favorece el proceso de transición epitelio-mesénquima de las células epiteliales endometriales desencadenando en la aparición de invadopodios en las mismas. Imágenes representativas de la tinción contra citoqueratina 8 (CK8) de xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53* donde se amplían algunos de los invadopodios presentes en ellos (señalados con flechas negras). Imágenes a 5x y a 40x. Barras de 200 μ m y 20 μ m.

El análisis histológico del componente epitelioide de alto grado, como se muestra en la figura 89, mostro un alto grado de atipia celular, pleomorfismos nucleares y una elevada tasa mitótica. De la misma manera, el componente sarcomatoso de estos carcinosarcomas también presentaba una alta tasa mitótica, así como una atipia nuclear marcada, característica de tumores agresivos.

A

Cre:ERT^{+/+} PTEN^{f/f} P53^{f/f}

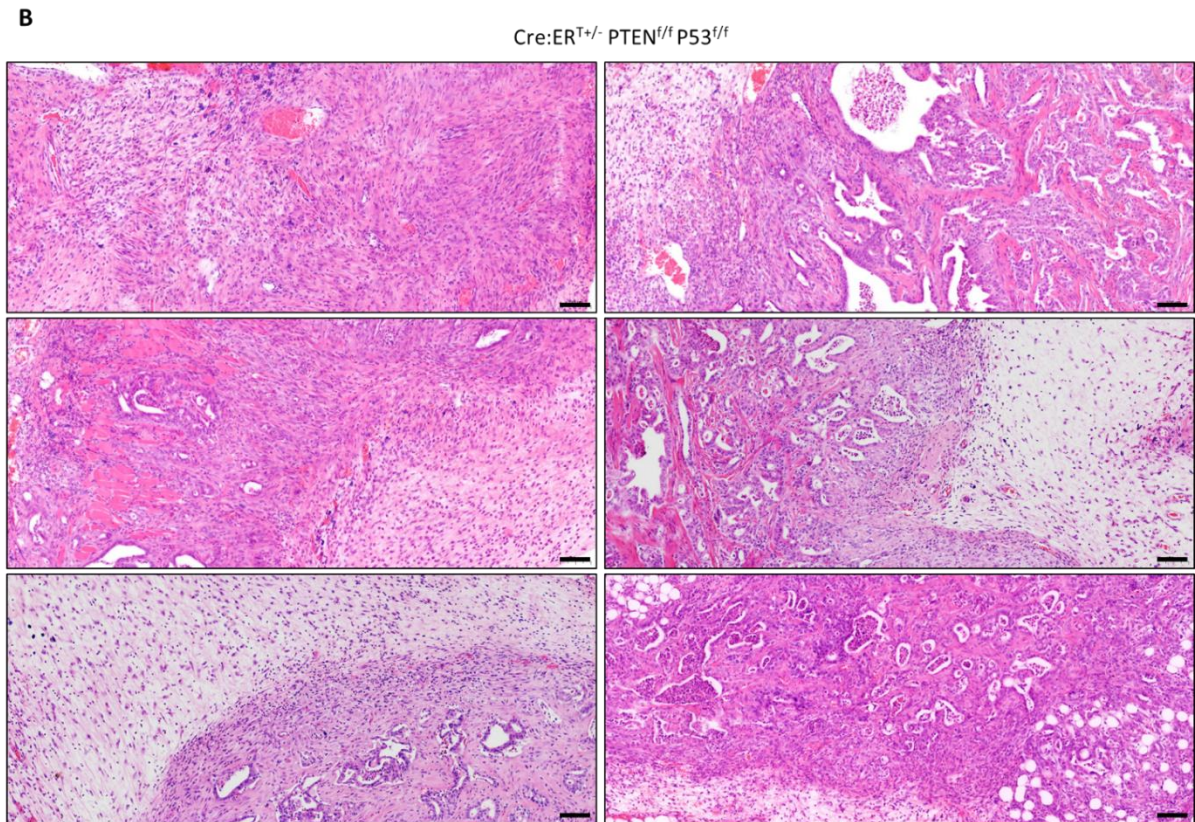


Figura 89. Los xenógrafos no ortotópicos generados a partir de células epiteliales endometriales deficientes para *PTEN* y *p53* desencadenan carcinosarcomas derivados de carcinomas endometriales de alto grado. **(A)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53* donde se amplían zonas donde se observan el componente carcinomatoso de alto grado de los carcinosarcomas endometriales. Imágenes a 10x y ampliaciones 40x, barras de 100 μ m y 20 μ m respectivamente. **(B)** Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los xenógrafos subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53* donde se aprecian la estructura bifásica de los carcinosarcomas generados a partir de estas células.

Además, como se muestra en la figura 90, algunos de los tumores generados con células dKO presentaron diferenciación escamosa, así como regiones tumorales formadas por elementos heterólogos cartilagosos.

Cre:ER^{T+/-} PTEN^{f/f} P53^{f/f}

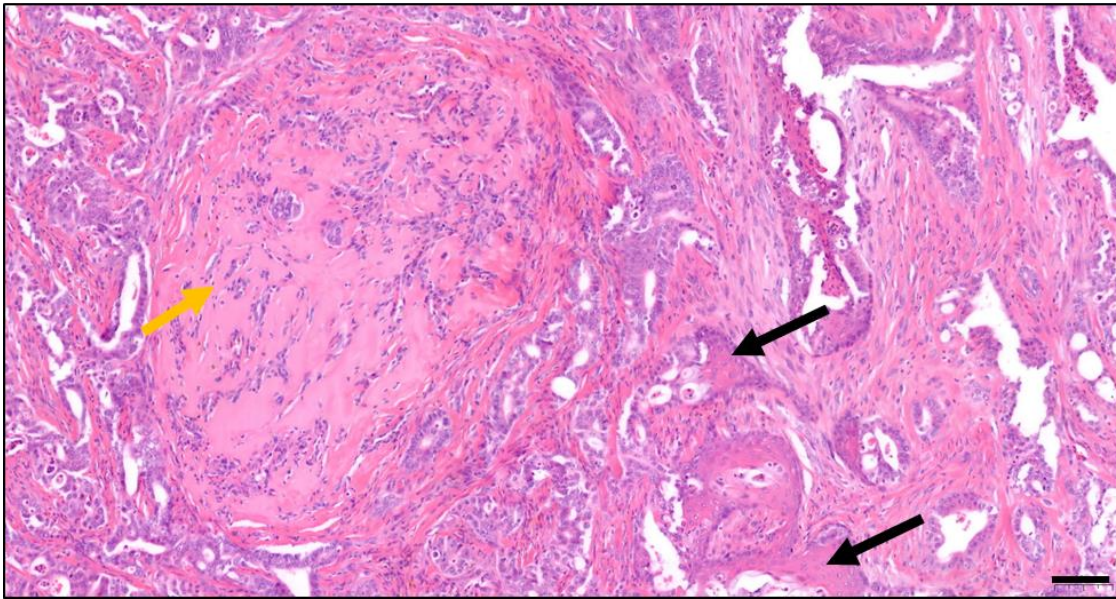


Figura 90. Los xenógrafos deficientes para PTEN y p53 presentan regiones con diferenciación escamosa y elementos heterólogos. Ejemplificación de las regiones de los xenógrafos donde las células epiteliales endometriales han sufrido diferenciación escamosa (flechas negras) y las regiones con elementos heterólogos (flecha amarilla). Imágenes a 10x. Barras de 100 μ m.

Como se muestra en la figura 91, mediante un análisis inmunohistoquímico contra PTEN, se vio que estas células sarcomatoides al contrario que las células mesenquimales introducidas eran deficientes para PTEN, por lo que solo podían derivar de las células epiteliales a partir de las cuales se generaron los tumores.

Cre:ER^{T+/-} PTEN^{f/f} P53^{f/f}

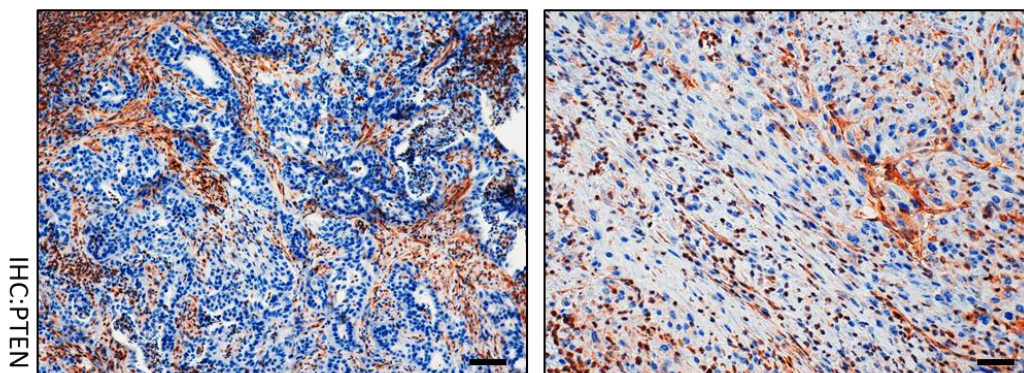


Figura 91. La pérdida de PTEN se da tanto en el componente sarcomatoide como en el componente carcinomatoso de los carcinosarcomas. Imágenes representativas de la tinción contra PTEN de componente sarcomatoide (derecha) como en el componente carcinomatoso (izquierda) de los tumores generados a partir células epiteliales endometrial *knock-out* para *Pten* y *p53*. Se pueden apreciar el marcaje positivo de las células mesenquimales *wild-type* que se introdujeron mezcladas con las epiteliales al generar los subcutáneos. Imágenes a 10x. Barras de 100 μ m.

A continuación, quisimos corroborar la aparente variabilidad del tamaño de los núcleos neoplásicos del componente carcinomatoso en los distintos tumores. Para ello, empleando la plataforma de software de acceso libre QuPath, se llevó a cabo el análisis del área nuclear entre los carcinomas endometriales generados a partir de células *knock-out* para *Pten* y los carcinomas deficientes tanto para *Pten* como para *p53*. Como se puede observar en la figura 92, los tumores de alto grado (dKO) mostraron de manera significativa un aumento en el número de núcleos de mayor tamaño.

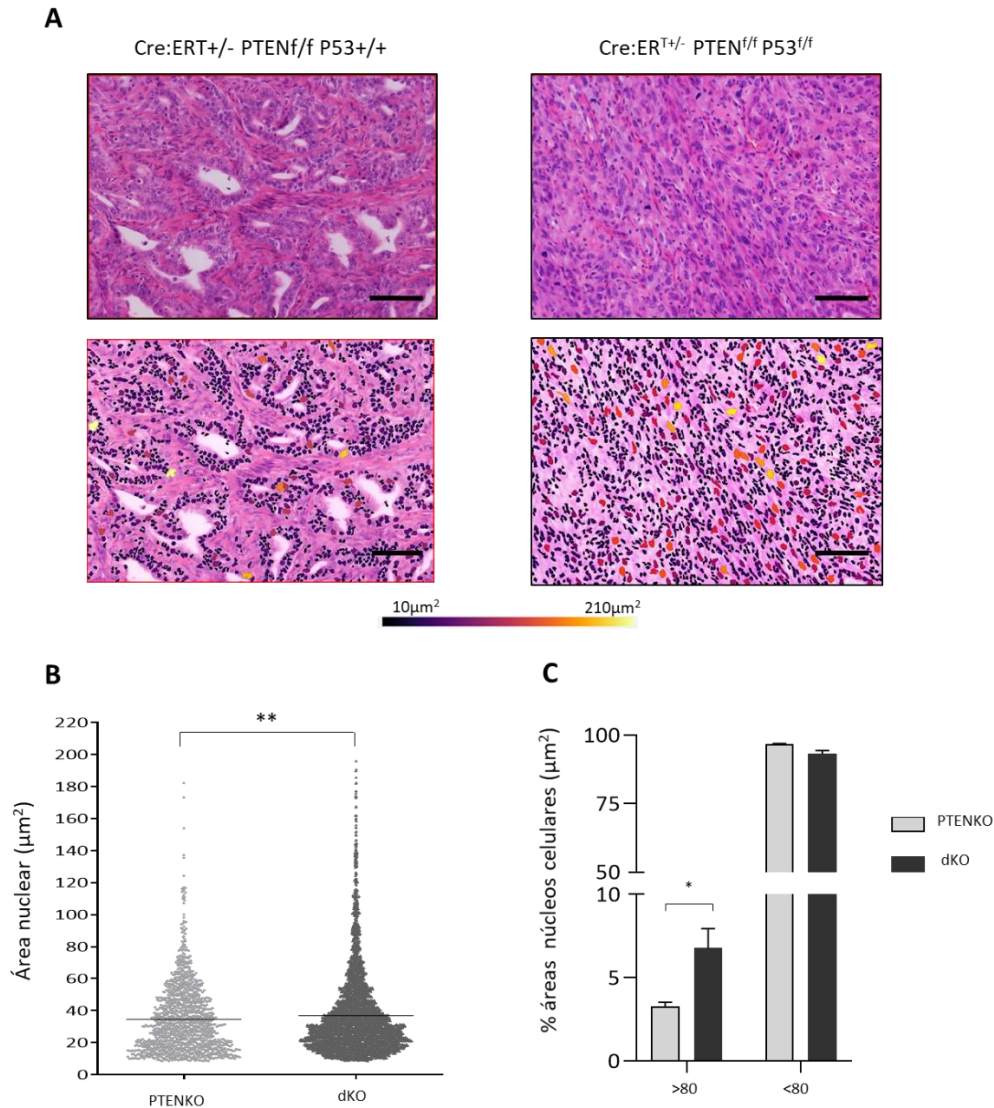


Figura 92. Los tumores deficientes para PTEN y p53 presentan un mayor pleomorfismo nuclear que los tumores que presentan únicamente alteración en PTEN. (A) Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los tumores subcutáneos generados a partir de células epiteliales endometriales Cre:ERT^{+/+}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO)(Izquierda) y Cre:ERT^{+/+}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO)(derecha). Abajo, imágenes analizadas con el software QuPath, donde se marcan los núcleos con un gradiente de coloración de mayor (210 μm^2) a menor (10 μm^2) tamaño de área nuclear. Barras de 100 μm **(B)** Medidas de las áreas nucleares en μm^2 de los tumores endometriales subcutaneos. Los datos provienen del conteo de 3 regiones diferentes en tumores independientes empleando el software QuPath. Las barras de error representan la media \pm s.e.m. ** $p < 0.01$, mediante un t-test no apareado seguido de una comparación múltiple Bonferroni. **(C)** Cuantificación del porcentaje de áreas nucleares mayores y menores a 80 μm^2 en los tumores PTENKO y dKO. Las barras de error representan la media \pm s.e.m * $p < 0.05$, según el two-way ANOVA seguido de una comparación múltiple Sidak.

Seguidamente del diagnóstico, para verificar que las células a partir de las cuales se estaba realizando el diagnóstico eran de origen endometrial, al igual que se hizo con el resto de genotipos, se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica de los tumores dKO con el marcador de células epiteliales de endometrio; el receptor de estrógenos (ER). Así, tras el análisis inmunohistoquímico, tal y como se muestra en la figura 93, tanto las células de los adenocarcinomas PTENKO, como los componentes carcinomatosos de los carcinosarcomas generados a partir de células $Cre:ER^{T+/-}$; $PTEN^{f/f}$; $P53^{f/f}$ presentaban un marcaje positivo para ER. Cabe resaltar que las regiones que fueron diagnosticadas como carcinomas endometriales endometrioides de alto grado mostraron un patrón nuclear difuso para el marcaje de $ER\alpha$, síntoma de la dediferenciación que sufren estas células. Así, pudimos concluir que al igual que en el resto de grupos, los tumores habían sido generados a partir de las células endometriales inyectadas.

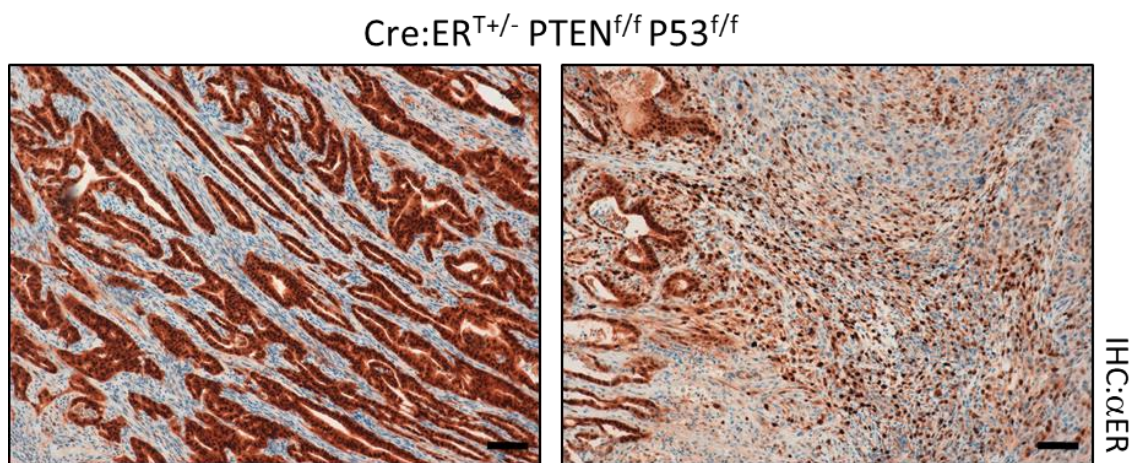


Figura 93. Los carcinomas endometrioides endometriales de alto y bajo grado originados con células epiteliales $Cre:ER^{T+/-}$; $PTEN^{f/f}$; $P53^{f/f}$ presentan marcaje positivo para αER . Imágenes representativas de la tinción contra receptor de estrógenos alfa (αER) de los xenógrafos no ortotópicos tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones $Cre:ER^{T+/-}$; $PTEN^{f/f}$; $P53^{f/f}$. Se puede apreciar el marcaje nuclear. Imágenes a 10x. Barras de 100 μm .

En el caso del componente sarcomatoso de los carcinosarcomas diagnosticados, al realizar todos los análisis inmunohistoquímico, se observó que a pesar de provenir de células epiteliales habían perdido tanto la expresión para $ER\alpha$ como de CK8. Adicionalmente, se probó un marcador de células epiteliales de endometrio, PAX8, de igual manera, el componente mesenquimal de los carcinosarcomas presentó un marcaje negativo con respecto al componente carcinomatoso.

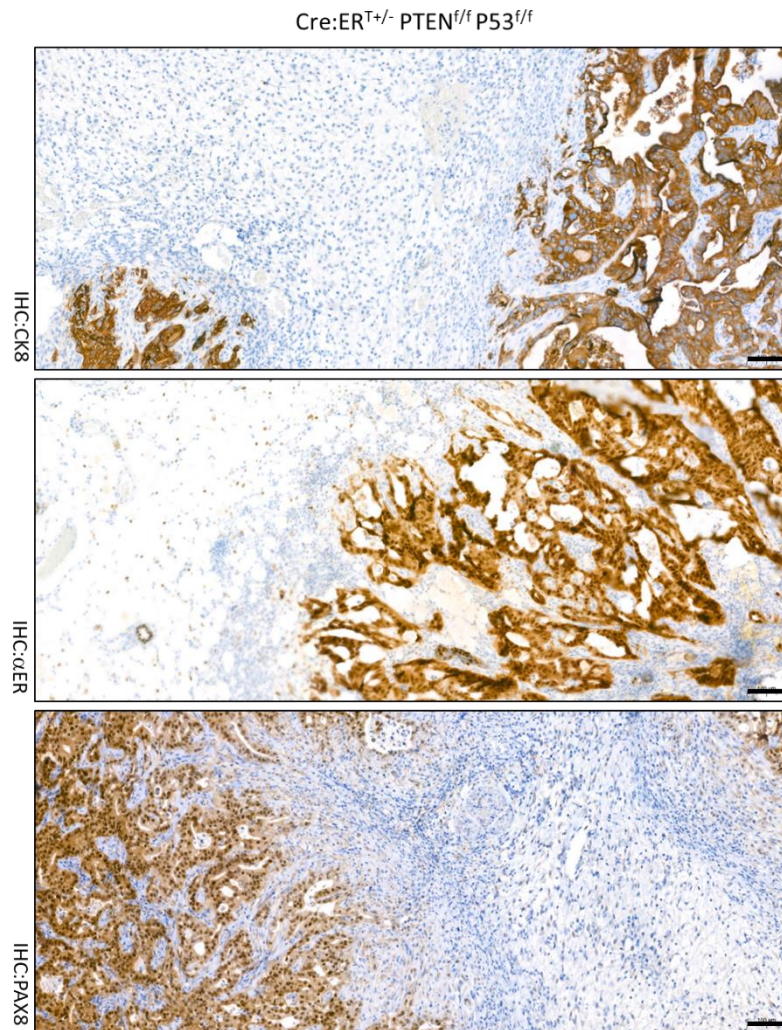


Figura 94. El componente sarcomatoso de los carcinosarcomas presenta marcaje negativo para CK8, ER α y PAX8. Imágenes ilustrativas de la tinción contra citoqueratina 8 (CK8), receptor de estrógenos alfa (ER α) y la proteína 8 de la caja emparejada (PAX8, del inglés *Paired Box 8 protein*) de regiones bifásicas de los carcinosarcomas desarrollados en los xenógrafos no ortotópicos tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f}. Imágenes a 10x. Barras de 100 μ m.

Seguidamente, en primer lugar se quiso comparar la tasa de proliferación entre los dos tipos de adenocarcinoma, de bajo y alto grado, generados mediante células epiteliales Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} respectivamente. Así, gracias a una tinción de Ki-67, se determinó que la pérdida de *p53* en las células epiteliales deficientes para PTEN aumentaba significativamente la tasa de proliferación en las células tumorales epiteliales con respecto a aquellas que solo presentaban alteraciones en *Pten*.

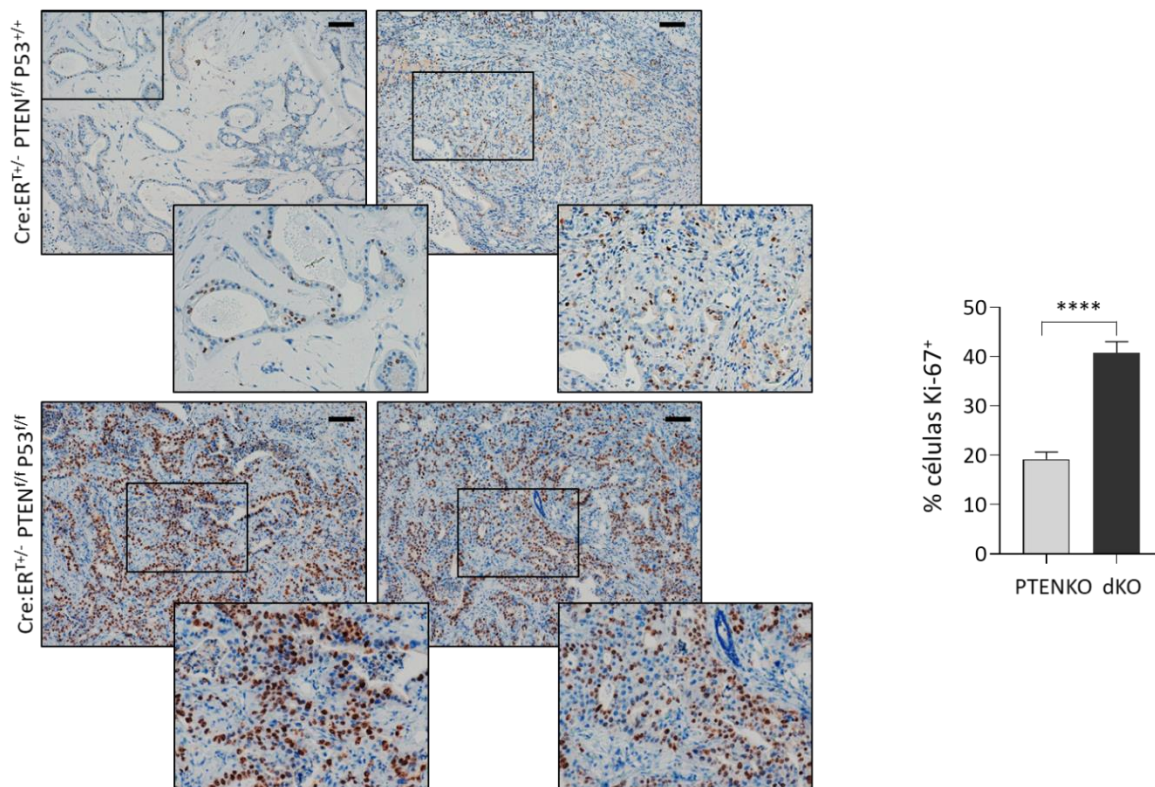


Figura 95. La falta de p53 induce un efecto pro-proliferativo en los tumores endometriales deficientes de PTEN a las 10 semanas de la generación de los xenógrafos. (A) Imágenes representativas de la tinción con Ki-67 de los xenógrafos no ortotópicos tras 10 semanas de la inyección subcutánea de células epiteliales endometriales de ratones Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{+/+} (PTENKO) y Cre:ER^{T+/-}; PTEN^{f/f}; P53^{f/f} (dKO). Imágenes a 10x. Barras de 100 μ m. **(B)** Cuantificación de la tinción de Ki-67. Los datos provienen de n=3 xenógrafos por cada grupo (dos fotos por tumor) y los valores se expresan como la media \pm s.e.m. ****p<0.0001, según el análisis de t-test.

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento dejan entrever que este modelo de delección específica en células epiteliales permite el estudio de la progresión tumoral de los carcinosarcomas que provienen de adenocarcinomas de bajo grado con mutaciones en *PTEN* y que tras la alteración de *p53* desembocan en adenocarcinomas de alto grado seguidos de carcinosarcomas.

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS ENDOMETRIALES CON MUTACIONES A LA CARTA GENERADAS *IN VIVO* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO CON EL SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/Cas9

En la última década, la edición mediada por CRISPR/Cas9 de células madre embrionarias u ovocitos ha surgido como un método eficiente y técnicamente mejorado para generar modelos de ratones genéticamente modificados de línea germinal (RMG o GEMM del inglés *Genetically engineered mouse models*) (Katti et al., 2022). En este contexto, el uso de la herramienta CRISPR/Cas9 para la generación de ratones *knock-out* o *knock-in* en la línea germinal, la generación de GEMM somáticos (SEMM, *Somatically Engineered Mouse Models*) mediada por CRISPR/Cas9 ha surgido como una nueva herramienta en la investigación básica y traslacional para la modelización *in vivo* del cáncer (Lima and Maddalo, 2021).

Así pues, para estudiar los factores genéticos que influyen en la progresión y las respuestas terapéuticas del cáncer de endometrio, desarrollamos un sistema rápido y flexible que introduce alteraciones genéticas relevantes para la enfermedad humana directamente en las células epiteliales de los ratones utilizando la electroporación de tejidos. Así, nos planteamos el uso del sistema de edición génica CRISPR/Cas9 para el desarrollo de un procedimiento para la generación de SEMM de CE mediante la entrega *in vivo* de electroporación de Cas9 RNP en la cavidad uterina. En la literatura estos modelos de ratones modificados genéticamente mediante electroporación (EPO-GEMM, del inglés *electroporation-based genetically engineered mouse models*) que recapitulan las características de los modelos tradicionales de línea germinal y, a modelar factores genéticos vinculados a la enfermedad humana en los diversos tipos de carcinomas endometriales.

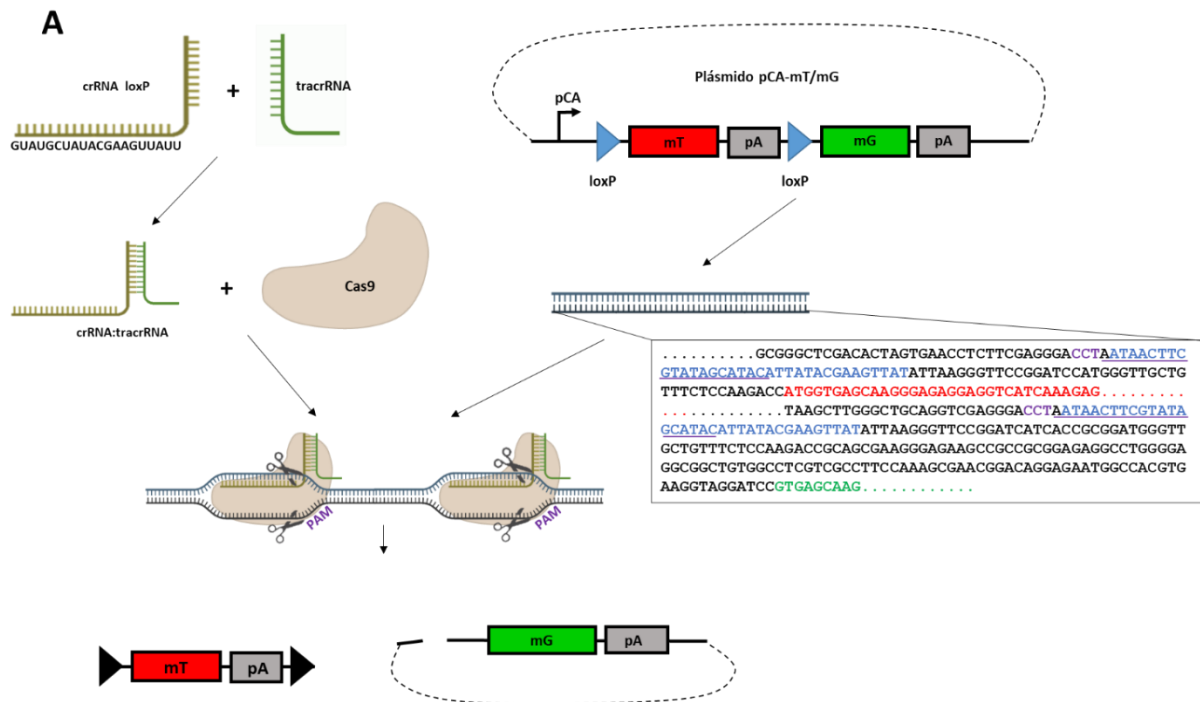
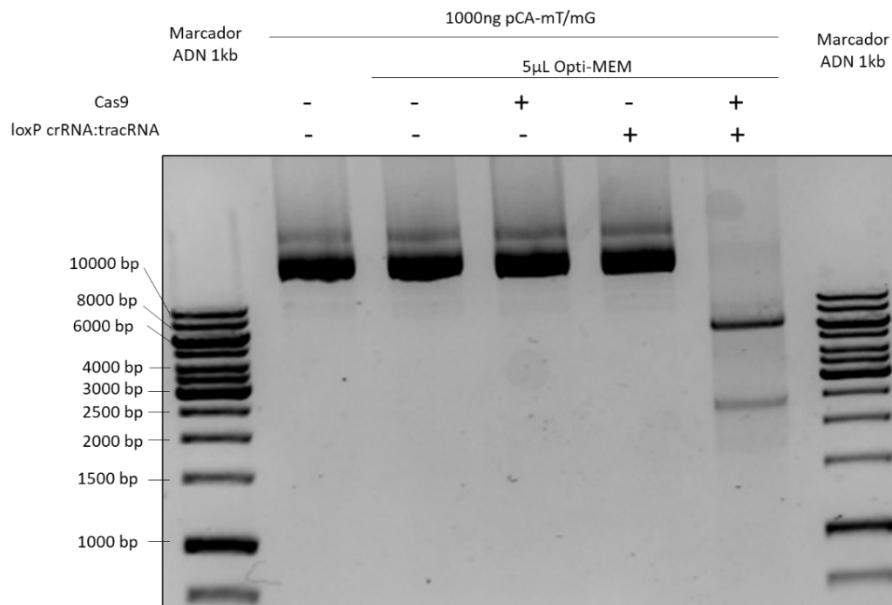
DISEÑO DE UN MÉTODO REPORTERO PARA MONITORIZAR LA EDICIÓN DE CRISPR/Cas9.

En primer lugar, previamente a la generación de GEMMs somáticos de cáncer de endometrio, utilizamos de nuevo la construcción reportera que contiene en tándem junto con secuencias de localización membranaria los genes que codifican para la proteína fluorescente tdTomato (mT) seguido del que codifica para la GFP (mG), donde, a su vez, la secuencia de mT se encuentra flanqueada por secuencias *loxP*.

Tras la recombinación dirigida por la recombinasa Cre, mT se elimina y las células recombinadas cambian de fluorescencia roja a verde. Por ello, hemos diseñado un ARNcr dirigido a los sitios *loxP*. Como las secuencias *loxP* en sí mismo no contienen ninguna secuencia PAM, utilizamos una PAM adyacente común en ambos sitios *loxP* que flanquean a mT. Empleando el algoritmo Cas-OFFinder de la herramienta bioinformática CRISPR RNA-guided endonucleases (RGEN) Tools (Bae et al., 2014) se comprobó que este ARNcr diseñado contra la secuencia *loxP* que flanquean a mT no presentaba posibles secuencias de corte que no fueran la secuencia diana de interés (*off-targets*) en el genoma de ratón.

Seguidamente, para comprobar el correcto diseño del ARNcr diseñado contra las secuencias *loxP* (*loxP-targeting*), realizamos un ensayo *in vitro* incubando el plásmido pCA-mT/mG con la ribonucleoproteína (RNP) *loxP-targeting*-Cas9 (*loxP*-RNP) preparada como se describe en la sección de métodos. La incubación de la RNP genera una banda de 2.45 Kb que sugiere que el complejo ribonucleoproteico fue capaz de cortar y liberar el fragmento de ADN correspondiente al mT flanqueado por *loxP* (Figura 96). Este fragmento no aparece en los casos donde la digestión se realizó con la falta de uno de los componentes de la RNP.

Figura 96. La RNP dirigida contra la secuencia *loxP* induce el corte del plásmido pCA-mT/mG de manera satisfactoria. (A) Esquema representativo de la digestión mediante el sistema CRISPR del plásmido pCA-mT/mG. En él se representa la generación de la ribonucleoproteína dirigida contra la secuencia *loxP* a partir de la proteína Cas9 y la previa producción del crRNA:tracrRNA partiendo del ARN CRISPR (ARNcr o crRNA) y ARN CRISPR transactivante (ARNtracr o tracrRNA). De igual manera, se plasma la secuencia del crRNA contra la secuencia *loxP*, así como las regiones de interés del plásmido pCA-mT/mG. En morado la secuencia PAM, subrayado en morado la secuencia de apareamiento con el crRNA contra el sitio *loxP*, en azul la secuencia *loxP*, en rojo parte de la secuencia codificante para la proteína fluorescente tdTomato (mT), en verde parte de la secuencia codificante para la proteína fluorescente EGFP (mG). pCA; promotor formado por potenciador de Citomegalovirus y el promotor de la β -Actina de gallina. pA; señal de poliadenilación de SV40. (B) Imagen del gel de agarosa 1% donde se ha resuelto los productos de las distintas condiciones de la digestión del plásmido pCA-mT/mG. Donde se aprecian las bandas correspondientes al plásmido sin digerir en su estado superrenrollado y relajado en las condiciones sin RNP, y las bandas correspondientes al fragmento liberado y al resto del plásmido en la condición problema.

**B**

Una vez demostrada la correcta focalización de los sitios loxP, probamos la capacidad de la RNP dirigida a loxP para inducir la edición de genes en células vivas. Para ello, se transfectaron fibroblastos de piel aislados de ratones mT/mG con RNP dirigidas a loxP, y se evaluó la aparición de células verdes 48 horas después de la transfección (Figura 97). La RNP dirigida a loxP causó un cambio de rojo a verde en aproximadamente el 10% de los fibroblastos, lo que indica que los complejos RNP dirigidos contra loxP fueron capaces de causar la edición del genoma en las células de cultivos vivos.

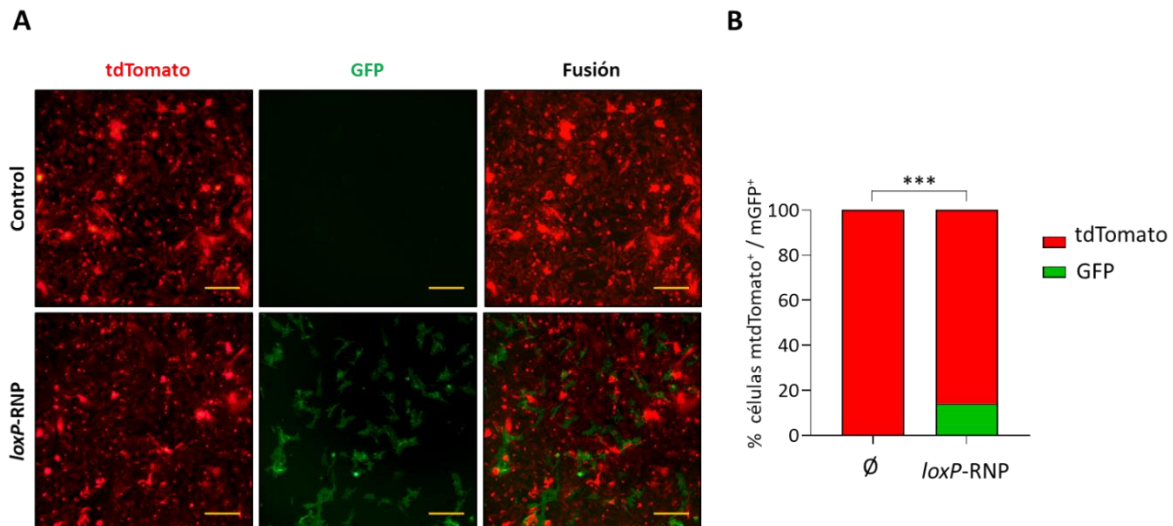


Figura 97. La RNP dirigida contra la secuencia *loxP* induce la edición génica *in vivo* en fibroblastos de ratón mT/mG. Imágenes representativas de cultivos de fibroblastos de ratón mT/mG^{f/f} a las 48h de ser transfectados con ribonucleoproteína contra la secuencia *loxP* (*loxP*-RNP). Se observa la actividad nucleasa (células verdes, GFP) o no (células rojas, tdTomato). Imágenes a 10x. Barras de 100 μ m.

LA ELECTROPORACIÓN CRISPR/CAS9 PROVOCA LA EDICIÓN GENÓMICA *IN VIVO* DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES DE RATÓN.

Los resultados anteriores nos alentaron a comprobar la capacidad de la RNP Cas9 dirigida a *LoxP in vivo*. Para ello, aprovechamos el ratón reportero mT/mG^{f/f} (Muzumdar *et al.*, 2007). Se cargaron 5 μ L de mezcla de RNP que contenía 0,5 μ L de Cas9 recombinante a 62 μ M, 1,5 μ L de dúplex 20 μ M de crRNA:tracrRNA y 3 μ L de Opti-MEM y 1 μ L de Fast Green FCF en una jeringa Neuros y se inyectaron en un cuerno uterino. Utilizando un electroporador de onda cuadrada BTX ECM™ 830, se aplicaron 4 pulsos de 50 mV/cm durante 50 mseg espaciados por 950 mseg de intervalo en el cuerno uterino inyectado. Este protocolo se repitió en sentido contrario a la orientación de las pinzas y se repitió de nuevo a lo largo de todo el cuerno uterino. Como control se inyectaron y electroporaron cuernos uterinos con solo Opti-MEM plus Fast Green, con Opti-MEM plus Fast Green y proteína Cas9 o crRNA:tracrRNA (Figura 98).

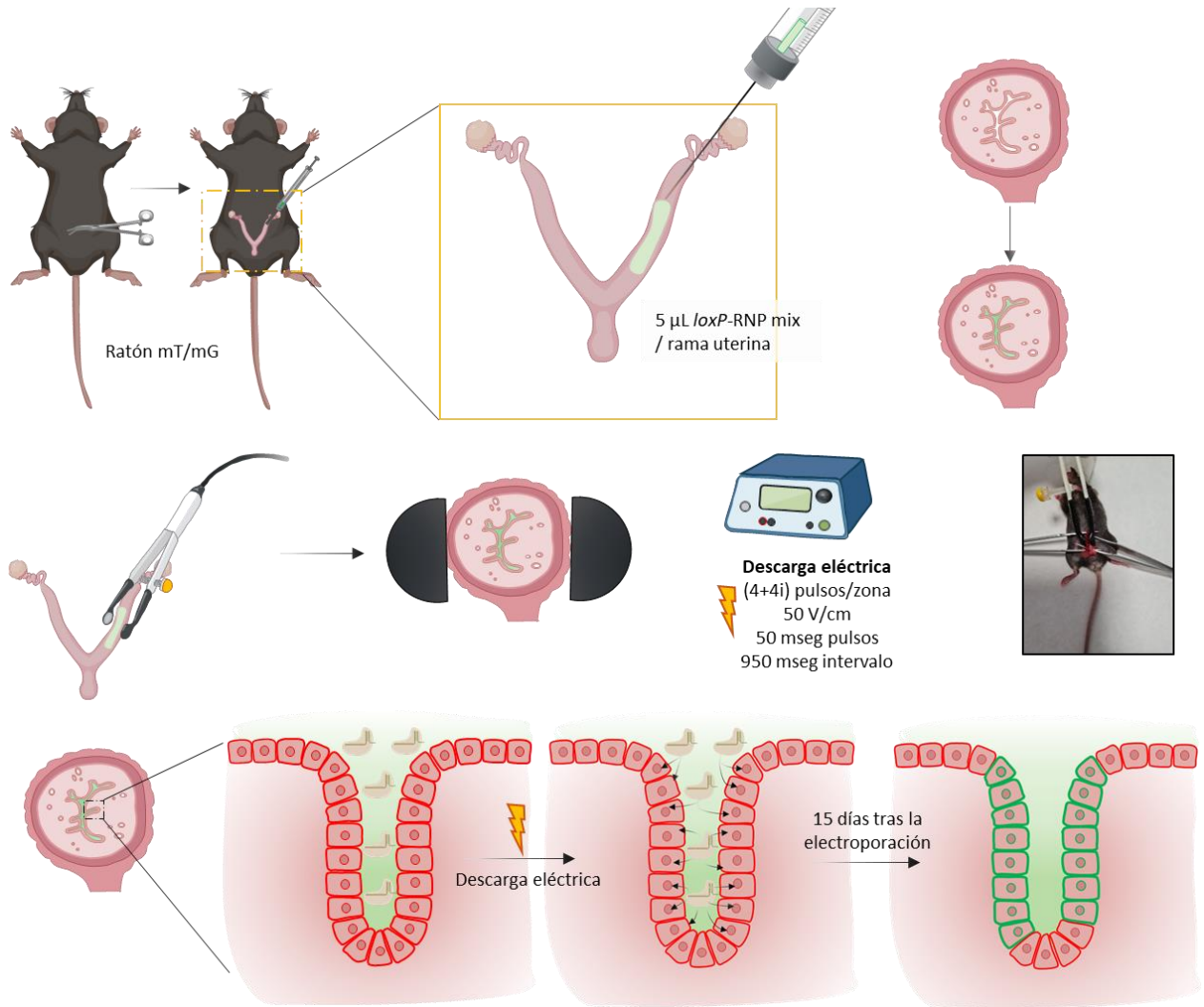


Figura 98. Estrategia para la administración de los componentes CRISPR/Cas9 en las células epiteliales del endometrio mT/mG^{ff} . Esquema ilustrativo del método empleado para la introducción de la ribonucleoproteína contra la secuencia *loxP* (*loxP*-RNP) en el lumen uterino (Arriba). En medio, ilustración de la electroporación uterina donde aparecen las condiciones de las descargas eléctricas. Abajo, esquema de lo ocurrido en las células epiteliales luminarias del endometrio, donde se puede apreciar que a los 15 días de la administración de la *loxP*-RNP algunas de las células tdTomato de este tejido cambian de fluorescencia roja a verde (GFP).

Después de 15 días, los cuernos uterinos se diseccionaron, se abrieron longitudinalmente y se examinó la presencia de células verdes bajo el microscopio estereoscópico de fluorescencia Nikon Eclipse Ts2R. Sólo los cuernos uterinos electroporados con RNP dirigida a *loxP* mostraron la expresión de la proteína verde fluorescente, lo que indica que se logró la edición del genoma en la cavidad uterina (Figura 99).

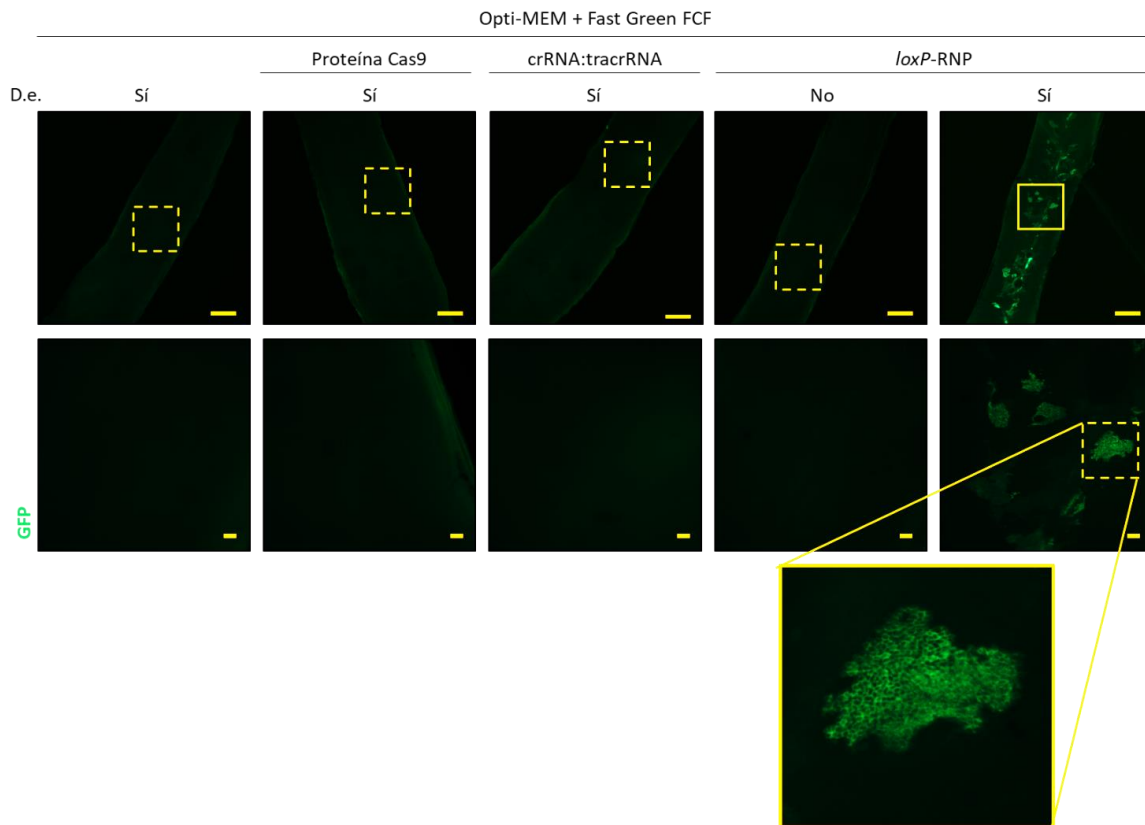


Figura 99. La electroporación de la *loxP*-RNP *in vivo* en las células epiteliales endometriales murinas desencadena la edición génica de las mismas. Quince días tras la electroporación de la ribonucleoproteína en los úteros de ratones mT/mG^{fl/fl} se analizó la fluorescencia verde de los endometrios, indicadora de la actividad nucleasa (verde). Imágenes representativas de la rama uterina donde solo se aprecia edición génica en la condición donde se introdujo la *loxP*-RNP y se realizó la descarga eléctrica (D.e). En el resto de condiciones donde faltó alguno de los componentes de la mezcla administrada no se observó ningún signo de actividad nucleasa. n=4 ramas por condición. Imágenes a 2x y 10x. Barras de 1mm y 100um, respectivamente.

Para demostrar aún más la edición genómica de los sitios *loxP*, y conocer la eficiencia de transfección *in vivo*, se electroporaron de nuevo endometrios de ratones mT/mG^{fl/fl}, a los 2 días de la descarga eléctrica se diseccionaron los fragmentos de los cuernos uterinos que mostraban células verdes (zonas electroporadas). Mediante un raspado cuidadoso de los endometrios, se extrajeron las células epiteliales endometriales de estas regiones uterinas. Una vez aisladas estas células, se procedió al aislamiento del ADN genómico de estas células (Figura 100).

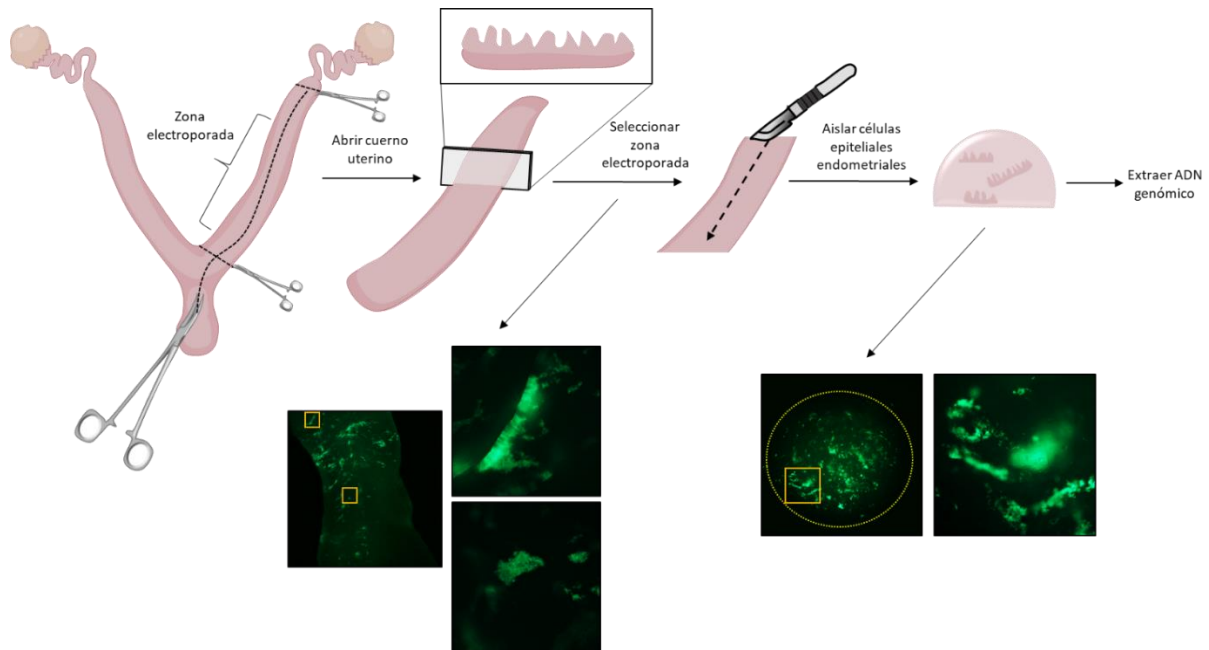


Figura 100. Esquema representativo para la obtención de las células epiteliales endometriales electroporadas *in vivo* con los componentes CRISPR/Cas9.

Una vez obtenido el ADN genómico, se llevó a cabo una PCR con unos *primers* que flanqueaban la secuencia mT floxeadada (explicada en mayor detalle en el apartado Materiales y Métodos). Cabe resaltar que en esta PCR se enriquecían el fragmento de PCR donde la secuencia mT había sido eliminada, correspondiente a 181bp. Estos productos de PCR se analizaron mediante la tecnología de secuenciación masiva (del inglés *next-generation sequencing*, NGS) conocida como secuenciación de amplicones (del inglés *amplicon-sequencing*) (Figura 101).

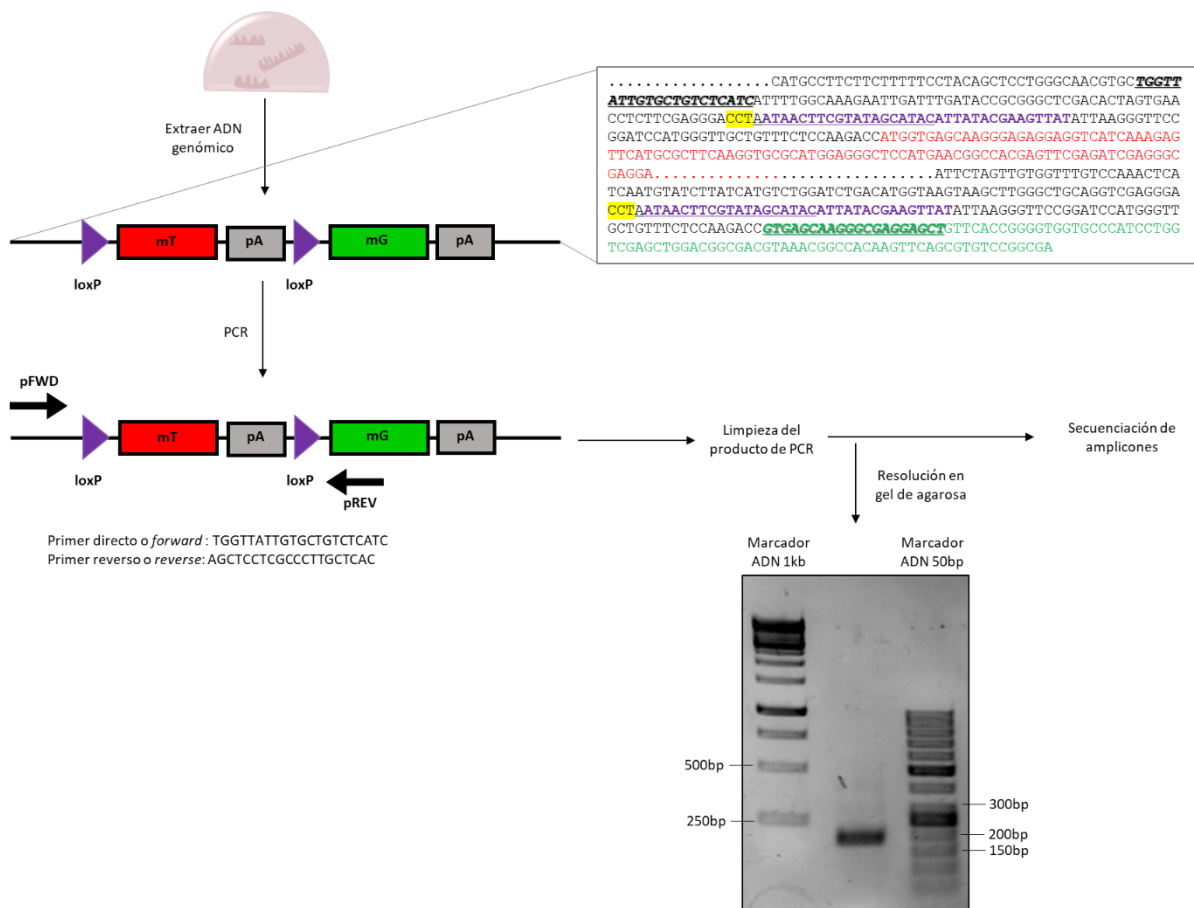


Figura 101. Esquema metodológico para la obtención de un producto de PCR que incluya las regiones de corte CRISPR en el genoma mT/mG de las células epiteliales endometriales de los úteros electroporados con loxP-RNP. En morado la secuencia *loxP*, subrayado en morado la secuencia de apareamiento con el crRNA contra el sitio *loxP*, en amarillo las secuencias PAM, en rojo parte de la secuencia codificante para la proteína fluorescente tdTomato (mT), en verde parte de la secuencia codificante para la proteína fluorescente EGFP (mG). Subrayado, en negrita y cursiva, secuencias de anillamiento de los primers de la PCR. pCA; promotor formado por potenciador de Citomegalovirus y el promotor de la β -Actina de gallina. pA; señal de poliadenilación de SV40. pFWD; primer directo o *forward*. pREV; primer reverso o *reverse*.

De esta manera, como se muestra en la figura 102, al analizar con el software Cas-Analyzer (Park et al., 2017) y CRISPResso2 (Clement et al., 2019) los resultados de la secuenciación de los productos de PCR obtenidos del genoma extraído de 3 ratones mT/mG^{f/f} electroporados de manera independiente. Estos resultados mostraron una delección aproximada de 2.5 kb correspondientes a los casos donde se elimina el fragmento floxeado entre las dos secuencias de corte (flecha negra). Asimismo, del total de lecturas que alinearon con el fragmento de referencia que se hubiera generado al reconstruirse el sitio *loxP* por recombinación homóloga tras ambos cortes, el 9,08% había sufrido delecciones o inserciones. Notablemente, en la posición 87bp de esta secuencia de referencia apareció una región con un pico de delecciones significativo, esta localización coincidía con la ubicación del corte CRISPR (flecha amarilla). Aun así, en el 90,92% de las secuencias alineadas

secuenciar los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{ff} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP. **(D)** Visualización de la distribución de los alelos más representativos (>0,2%) identificados alrededor del sitio de corte para el crRNA GUAUGCUAUACGAAGUUAUU en los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{ff} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP. Los nucleótidos se indican con colores únicos (A = verde; C = naranja; G = amarillo; T = púrpura). Las sustituciones se muestran en negrita. Los rectángulos rojos destacan las secuencias insertadas. Las líneas horizontales discontinuas indican las secuencias eliminadas. La línea vertical discontinua indica el sitio de escisión previsto por la *loxP*-RNP.

LA ELECTROPORACIÓN *IN VIVO* DE CRISPR/CAS9 EN EL ÚTERO RESULTA EN LA EDICIÓN GENÓMICA DE LAS CÉLULAS EPITELIALES Y NO ESTROMALES EN EL ENDOMETRIO.

El útero de ratón contiene células endometriales epiteliales y estromales rodeadas por el miometrio. Por lo tanto, analizamos qué tipos de células fueron editadas por la RNP electrodirigida a *loxP*. Para abordar este punto, realizamos inmunohistoquímica con anticuerpos contra citoqueratina y GFP en secciones de parafina consecutivas de cuernos uterinos electroporados con *loxP*-RNP a los 15 días tras la descarga eléctrica. En todas las secciones de parafina uterinas analizadas de estos EPO-GEMM, la expresión de la GFP membranaria (mGFP o mG) estaba restringida a las células que expresaban citoqueratina, indicando que la edición genómica se circunscribía a las células epiteliales del endometrio (Figura 103).

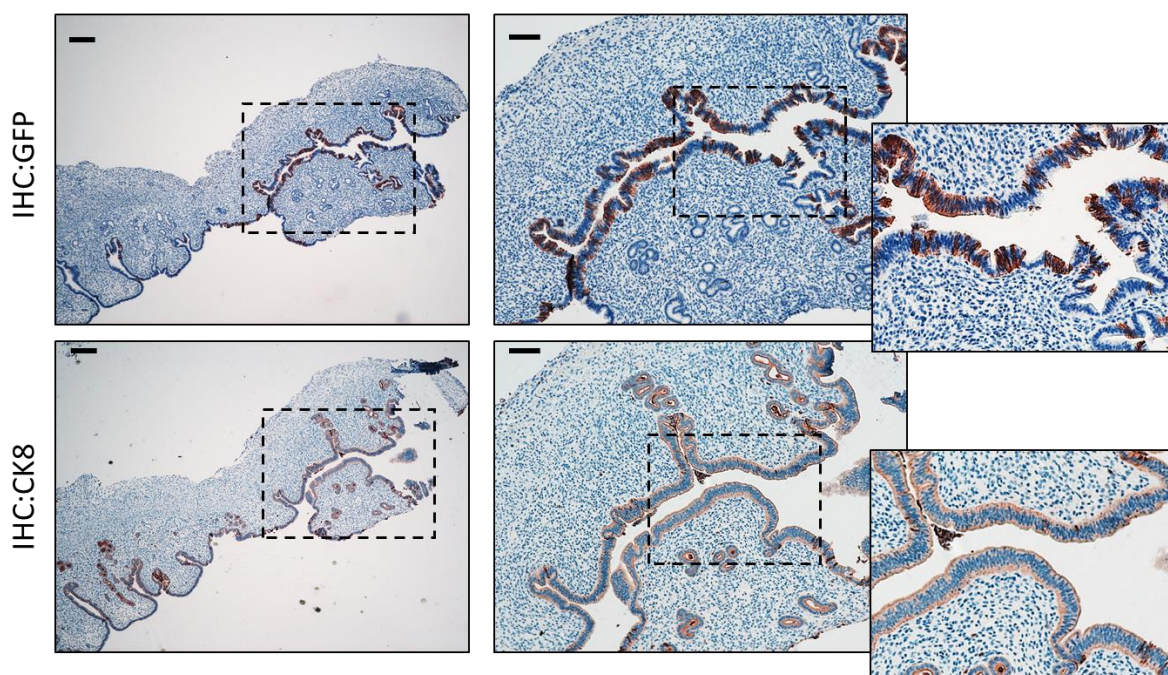


Figura 103. La electroporación de CRISPR/Cas9 *in vivo* de los úteros modifica de manera específica las células epiteliales endometriales. Imágenes representativas de la tinción contra GFP y citoqueratina 8 (CK8) de los cortes histológicos de los úteros mT/mG^{ff} a los 15 días de la electroporación con la *loxP*-RNP, donde se aprecia la existencia de células epiteliales endometriales que co-expresan la GFP membranaria (mG) y CK8. En ninguno de los tejidos analizados se detectó marcaje mG en otras células que no fueran epiteliales endometriales. Imágenes 4x y 10X. Barras de 200µm y 100µm, respectivamente.

Para demostrar aún más una edición genómica específica del epitelio, realizamos un análisis de todo el útero (previa selección de la región electroporada) de la expresión de mGFP utilizando microscopía de lámina de luz fluorescente (*Light sheet fluorescence microscopy, LSFM*). Primeramente, realizamos un análisis de imágenes de la expresión de mGFP utilizando LSFM en un fragmento uterino ópticamente calificado de los úteros electroporados con *loxP*-RNP. Nuevamente, las imágenes individuales de la lámina fluorescente, así como la reconstrucción tridimensional del tejido uterino de aproximadamente unos 7 mm de longitud revelaron que la expresión de mGFP y, por ende, la edición génica estaba restringida a las células que mostraban un patrón epitelial de organización glandular y luminal (Figura 104). Las imágenes de Lighsheet revelaron una distribución del patrón de mosaico en todo el tejido de células que expresan GFP, y confirmaron la delección esperada de mT en esas células, como se muestra en la figura 104.

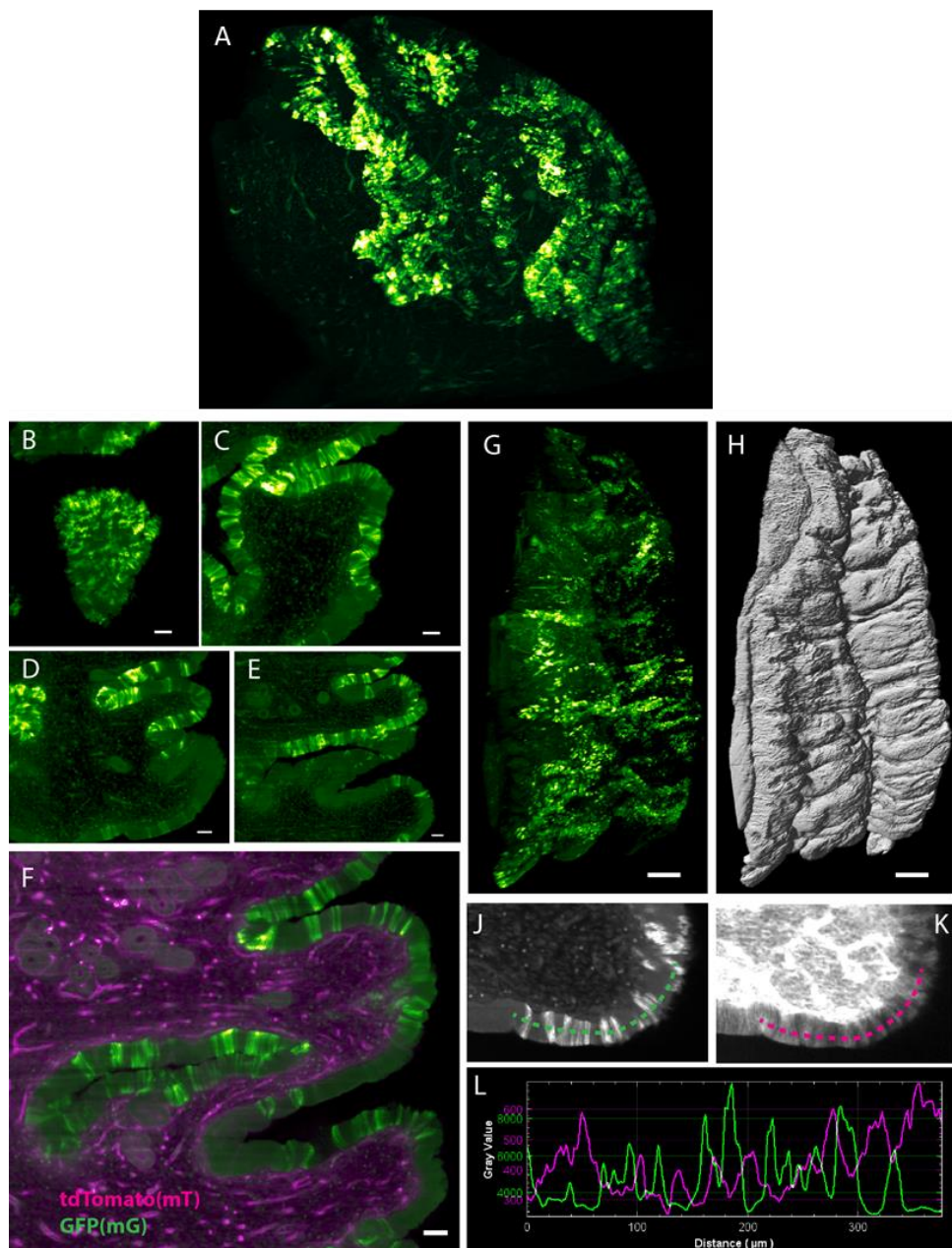
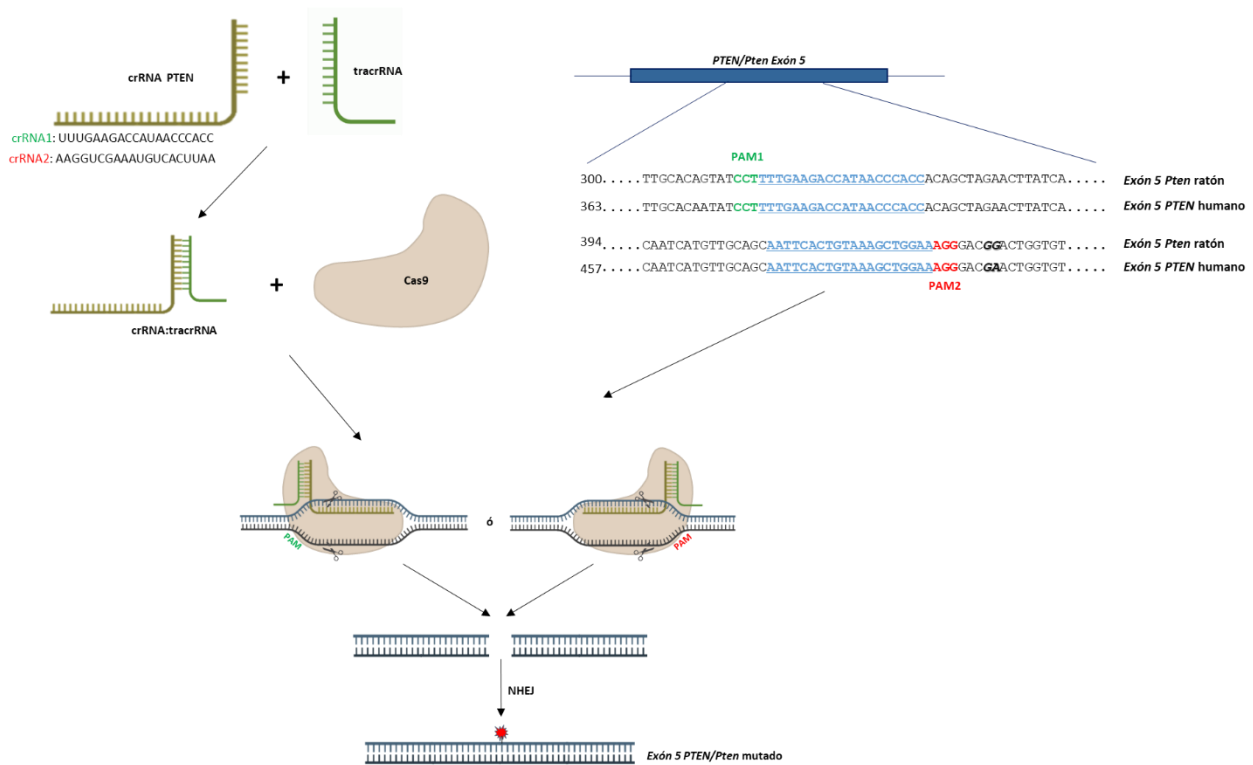


Figura 104. La microscopía de lámina de luz fluorescente muestra que la electroporación de CRISPR/Cas9 *in vivo* de los úteros modifica de manera específica las células epiteliales endometriales. (A-L) Imágenes representativas de los endometrios mT/mG^{fl/fl} a los 15 días de la electroporación con la *loxP*-RNP. Imágenes obtenidas a partir de capturas del video obtenido con el software Imaris 9.1 tras la transparentación de todo el órgano (*whole-organ clearing*) donde se iban alternando las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia en lámina en los canales GFP y RFP. **(G)** muestra la distribución de las células GFP en el fragmento endometrial de 7mm de longitud, **(H)** la superficie del endometrio detectada desde el canal tdTomato. (B a F) son secciones sucesivas en un plano representativo en una localización XY a distintas profundidades Z, calculadas desde la superficie del tejido, de 20µm **(B)**, 108µm **(C)**, 232µm **(D)**, 375µm **(E)**, 450µm **(F)**, donde se puede ver un patrón de mosaico GFP+ en las células epiteliales del endometrio. **(F)** muestra la fluorescencia fusionada adquirida con el canal verde de GFP superpuesto con la adquirida del tdTomato mostrado en magenta. **(J-K)** Muestra la distribución respectiva de las células GFP y tdTomato a lo largo del epitelio del endometrio. **(L)** Muestra el perfil de intensidad complementario (véase la correspondencia entre picos y valles, medido en J (verde) y K (magenta), a lo largo de la línea verde y magenta discontinua mostrada en J-K. Barras de escala: B-F, J-K, 50µm, G-H, 500µm. G-K se reconstruyó a partir de una imagen vertical en mosaico de 1x5 campos, todas las imágenes se adquirieron con un aumento de 7,2x con un grosor de la lámina de luz de aproximadamente 4,5 µm.

GENERACIÓN DE UN EPO-GEMM *KNOCK-OUT* PARA *PTEN* MEDIADO POR CRISPR/CAS9 EN CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES.

Los resultados anteriores nos permitieron diseñar un protocolo de edición genómica para alterar la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis endometrial. Entre todos los genes mutados, *PTEN* es el gen supresor de tumores que muestra la mayor frecuencia de mutación en los carcinomas de endometrio (*Bell and Ellenson, 2019; Tashiro et al., 1997*). El papel de *PTEN* en la carcinogénesis endometrial ha sido ampliamente validado por muchos modelos de ratón *knock-out* condicional de *Pten* que desarrollan neoplasias endometriales (*Maru and Hippo, 2021*). El *knock-out* condicional de *Pten* se construyó flanqueando el exón 5 de *Pten* con dos sitios *loxP* (*Groszer et al., 2001*). En el grupo se ha estudiado y demostrado previamente que el cruce de este ratón *knock-out* condicional con un ratón Cre:ER^T inducible por tamoxifeno conduce a la pérdida de expresión de *PTEN* en las células epiteliales del endometrio y posteriormente esta ablación génica desencadena la aparición de tumores endometriales (*Mirantes et al., 2013a*). Por esta razón, como se muestra en la figura 105, decidimos diseñar un crRNA dirigido al exón 5 de *Pten*. En este caso, se diseñó paralelamente dos *Pten-targeting* crRNAs. Al igual que se hizo con el crRNA diseñado contra la secuencia *loxP*, se comprobó mediante el empleo del algoritmo Cas-OFFinder de la herramienta bioinformática CRISPR RNA-guided endonucleases (RGEN) Tools (*Bae et al., 2014*) estos crRNAs diseñados contra el exón 5 de *Pten* no presentaron posibles secuencias de corte que no fueran la secuencia diana de interés (*off-targets*) en el resto del genoma de ratón. Debido a que este gen está altamente conservado entre especies, los ARN guías diseñados no solo valdrían para editar el *Pten* murino, sino que también servirían para la edición génica del gen *PTEN* humano, aunque en este caso ambos crRNA presentan una región *off-target* en el cromosoma 9 humano correspondiente a la secuencia de *PTENP1*, un pseudogen de *PTEN* (*Dahia et al., 1998*).

A



B

| crRNA | Secuencia diana | Especie | Número de dianas encontradas | Cromosoma | Posición | Dirección |
|--------|--------------------|---------|------------------------------|-----------|----------|-----------|
| crRNA1 | GGTGGGTTATGGTCTCAA | Ratón | 1 | chr19 | 32799871 | - |
| | | Humano | 2 | chr9 | 33676364 | + |
| | | | | chr10 | 87933023 | - |
| crRNA2 | AATTCAGTAAAGCTGGAA | Ratón | 1 | chr19 | 32799969 | + |
| | | Humano | 2 | chr9 | 33676266 | - |
| | | | | chr10 | 87933121 | + |

Figura 105. Diseño de los crRNA contra el exón 5 de *PTEN/Pten*. (A) Esquema representativo del diseño de dos crRNA contra el exón 5 de *PTEN/Pten* y la generación de edición CRISPR en esta secuencia. En él se representa la generación de la ribonucleoproteína dirigida contra dos secuencias del exón 5 del gen *PTEN/Pten* a partir de la proteína Cas9 y la previa producción del crRNA:tracrRNA partiendo del ARN CRISPR (ARNcr o crRNA) y ARN CRISPR transactivante (ARNtracr o tracrRNA). De igual manera, se plasma la secuencia del crRNA contra *PTEN/Pten*, así como las regiones de interés de exón 5 de *PTEN/Pten*. En verde la secuencia PAM del crRNA1, en rojo la secuencia PAM del crRNA2, en azul subrayado las secuencias de apareamiento con el crRNA1 y 2 contra el exón 5 del gen de interés. Se puede apreciar el apareamiento casi total entre el exón 5 del gen murino y humano (*Pten* y *PTEN*, respectivamente). En negrita y cursiva los 2 nucleótidos divergentes entre las secuencias de ambas especies. (B) Tabla donde aparecen las regiones de apareamiento de ambos crRNAs con el resto de genoma murino y humano, analizados con CRISPResso2. Donde se aprecia que en el genoma humano ambos crRNAs hibridan, además de con la secuencia de interés con el cromosoma 10, con otra secuencia del cromosoma 9 correspondiente a la secuencia del pseudogen 1 de *PTEN*. chr; cromosoma, del inglés chromosome.

Para comprobar la actividad nucleasa de los dos complejos RNP dirigidos a *Pten*, como se muestra en la figura 106, realizamos un ensayo *in vitro* en el cual se incubó un fragmento de DNA de 622bp que flanqueaba ambas secuencias dianas del exón 5 de *Pten* con las RNP dirigidas a *Pten* (*Pten*-RNP) preparadas como se muestran en el apartado Materiales y Métodos. Este fragmento fue obtenido mediante una PCR (descrita en el apartado Materiales y Métodos) usando como molde DNA genómico de células epiteliales endometriales de ratón no modificado genéticamente (*wild-type*). Así, tras resolver los productos de la digestión en un gel de agarosa, se observó que ambas ribonucleoproteínas eran capaces de cortar de manera satisfactoria el fragmento del exón 5 de *Pten*, liberando los fragmentos de 235bp y 387bp, y de 344bp y 278bp correspondientes al corte de la actividad nucleasa de la *Pten1*-RNP y *Pten2*-RNP respectivamente. En aquellos casos donde faltaba uno u ambos de los componentes CRISPR el fragmento de PCR se mantuvo intacto tras el periodo de incubación.

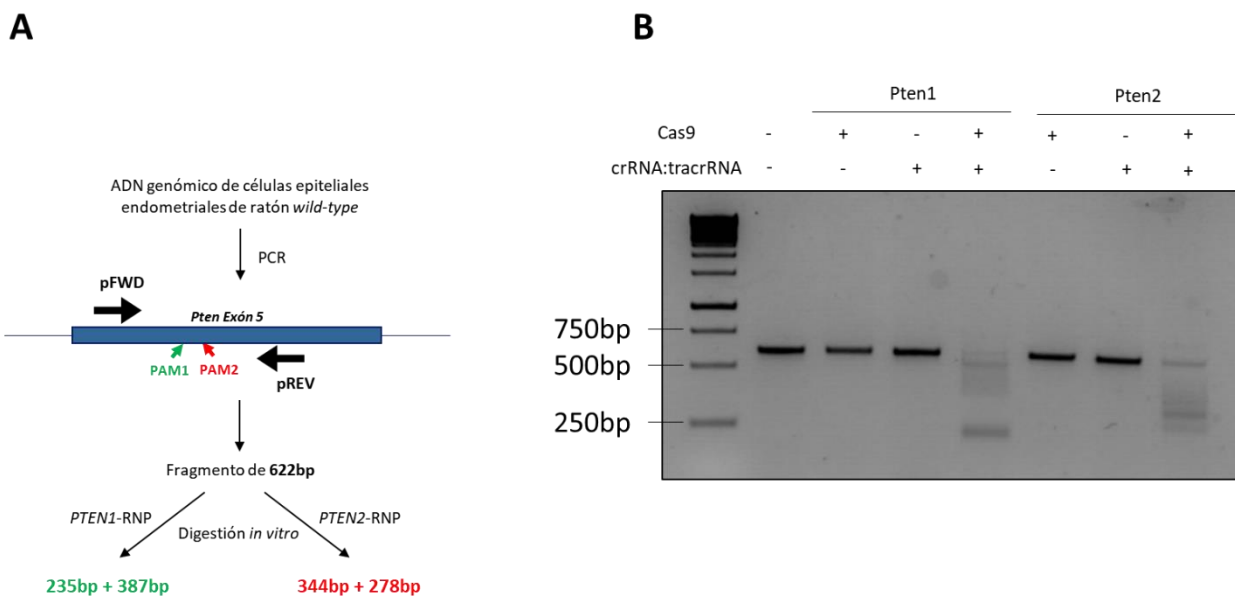


Figura 106. Las RNPs dirigidas contra el exón 5 de *Pten* presentan actividad nucleasa. (A) Esquema representativo de la generación del fragmento de PCR de 622bp que flanquea las dos secuencias dianas del exón 5 de *Pten* (PAM1 y PAM2) a partir de ADN genómico extraído de células epiteliales endometriales de ratón *wild-type*, seguido del esquema de la digestión *in vitro* con las RNP dirigidas a *Pten* (*Pten1*-RNP y *Pten2*-RNP) de dicho fragmento, donde se marcan la longitud de las fracciones de ADN resultantes del corte CRISPR. pFWD; primer directo o *forward*. pREV; primer reverso o *reverse*. (B) Imagen del gel de agarosa 1% donde se ha resuelto los productos de las distintas condiciones de la digestión del fragmento de PCR de 622bp del exón 5 de *Pten*. Donde se aprecian las bandas correspondientes al fragmento sin digerir en las condiciones donde falta uno de los componentes CRISPR, y las bandas correspondientes a los fragmentos liberados en la condición problema donde se añadió la *Pten1*-RNP o la *Pten2*-RNP.

Una vez demostrada *in vitro* la actividad nucleasa de las ribonucleoproteínas contra la secuencia del gen *Pten*, se decidió someter a prueba estos complejos ribonucleoproteicos *in vivo*, para así comprobar, como se representa en la figura 107, si eran capaces de generar tumores epiteliales de

endometrio. Antes que nada, de manera aleatoria, se decidió examinar con la RNP que tenía como diana la región próxima a la segunda secuencia PAM, la *Pten2*-RNP, de ahora en adelante denominada únicamente como *Pten*-RNP. Esta ribonucleoproteína junto con la que estaba compuesta por el crRNA contra el sitio *loxP* se prepararon como se describe en la sección de métodos y se mezclaron en proporción 1:1. De la mezcla resultante, se inyectaron cinco μL de la mezcla de RNPs por cada cuerno uterino de ratones reporteros $\text{mT}/\text{mG}^{\text{ff}}$. A continuación, se procedió a la electroporación de las ramas uterinas siguiendo el mismo protocolo de electroporación que se ha descrito en apartados anteriores.

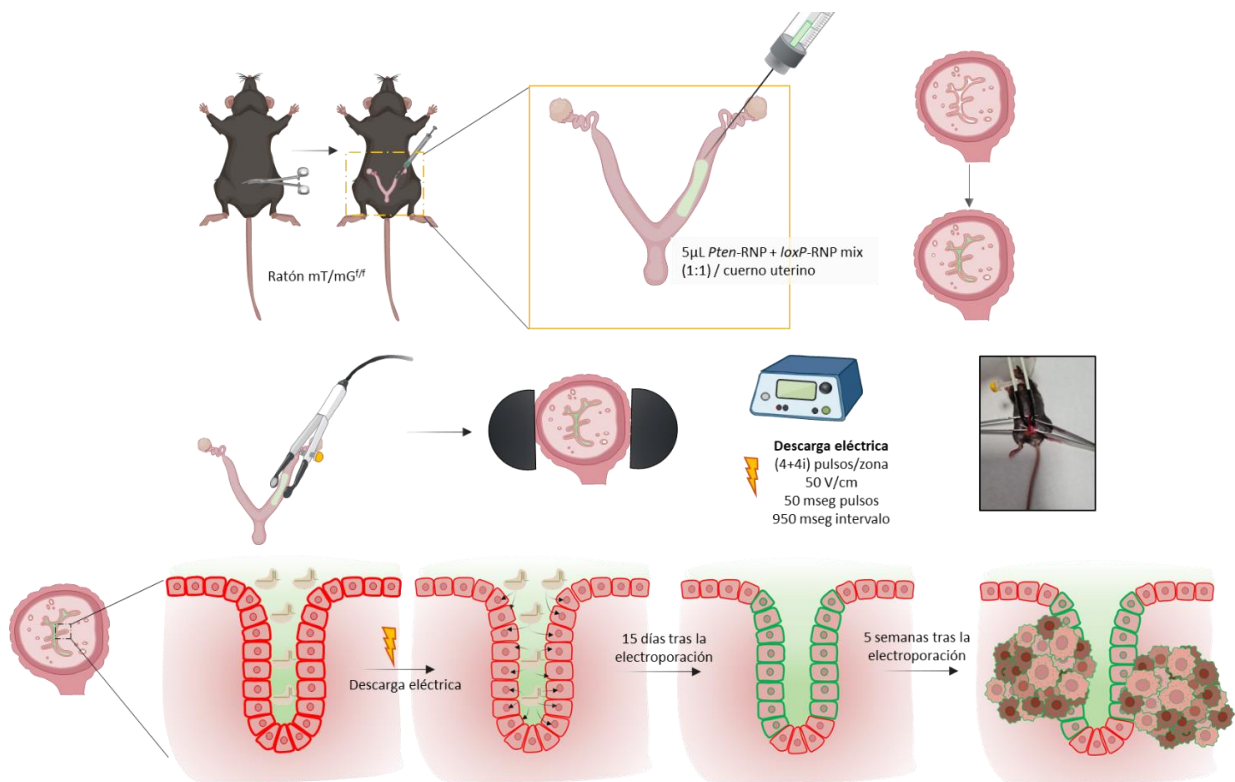


Figura 107. Estrategia para la administración de los componentes CRISPR/Cas9 en las células epiteliales del endometrio $\text{mT}/\text{mG}^{\text{ff}}$. Esquema ilustrativo del método empleado para la introducción de la mezcla de ribonucleoproteínas contra la secuencia *loxP* (*loxP*-RNP) y contra el exón 5 de *Pten* (*Pten*-RNP) en el lumen uterino (Arriba). En medio, ilustración de la electroporación uterina donde aparecen las condiciones de las descargas eléctricas. Abajo, esquema de lo ocurrido en las células epiteliales luminarias del endometrio, donde se puede apreciar que a los 15 días de la administración de la mezcla ribonucleoproteica algunas de las células tdTomato de este tejido cambian de fluorescencia roja a verde (GFP) y que transcurridas varias semanas algunas de estas células con marcaje membranario verde y *knock-out* para *Pten* generan tumores epiteliales endometriales.

15 días después de la electroporación se sacrificaron parte de los ratones electroporados, se diseccionaron los cuernos uterinos y se examinó la presencia de células verdes como indicativo de una correcta electroporación. Para comprobar si se consiguió la mutación de *Pten*, transcurridos estos días después de la descarga eléctrica con RNPs Cas9 dirigidas a *Pten* y *loxP*, al sacrificar los ratones y diseccionar las regiones del endometrio que contenían células que expresaban GFP (modelo reportero de la zona electroporada) las regiones uterinas fueron divididas en dos grupos.

Por un lado, como se muestra en la figura 100 se extrajo ADN genómico de las células epiteliales. Una vez obtenido el ADN genómico, se llevó a cabo una PCR con unos *primers* que flanqueaban la secuencia de corte de la RNP en el exón 5 de *Pten* (explicada en mayor detalle en el apartado Materiales y Métodos). Estos productos de PCR se analizaron mediante la tecnología de NGS conocida como secuenciación de amplicones (del inglés *amplicon-sequencing*). Por otro lado, el resto de fragmentos fue incluido en formol para su posterior análisis inmunohistoquímico (Figura 108).

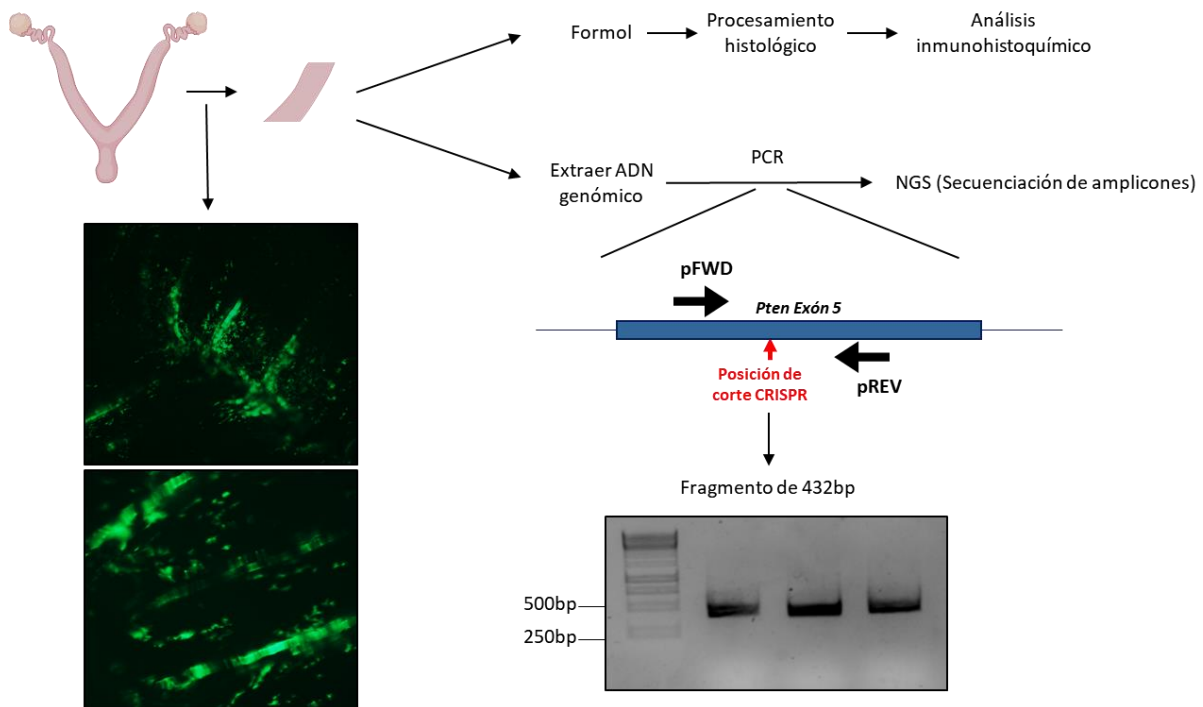


Figura 108. Esquema metodológico para el análisis de los endometrios electroporados con *loxP*-RNP y *Pten*-RNP. Representación ilustrativa de la selección de los fragmentos uterinos electroporados a partir de las zonas que presentan marcaje GFP positivo, seguido por un lado de la extracción de ADN genómico de las células epiteliales endometriales y la posterior obtención de un producto de PCR de 432bp que incluya las regiones de corte CRISPR en el genoma de ratón para su análisis mediante la técnica de NGS (*Next-generation sequencing*) de secuenciación de amplicones. Por otro lado, algunas secciones uterinas se incluyeron y procesaron para su análisis histológico. pFWD; primer directo o *forward*. pREV; primer reverso o *reverse*.

El análisis NGS de los amplicones del exón 5 de *Pten* demostró como se muestra en la figura 109 que cerca del 8% de las secuencias analizadas presentaba inserciones o deleciones próximas a la posición de corte CRISPR generadas por la reparación NHEJ tras el corte de la *Pten*-RNP. Notablemente, gran parte de ellas causan la pérdida del marco de lectura del gen o producen sustituciones aminoacídicas.

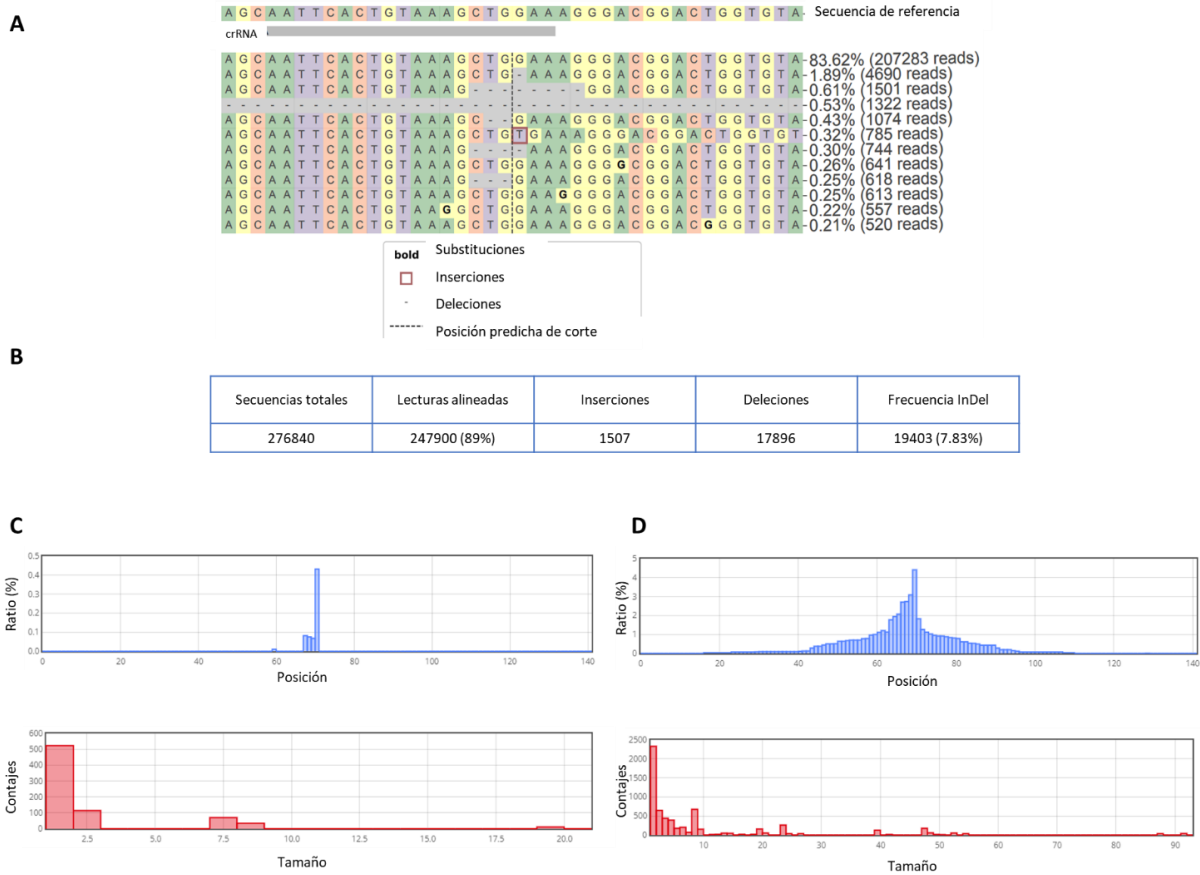


Figura 109. La electroporación de células epiteliales endometriales *in vivo* con los componentes CRISPR/Cas9 produce de manera satisfactoria la edición génica contra el exón 5 de *Pten*. (A) Visualización de la distribución de los alelos más representativos (>0,2%) identificados alrededor del sitio de corte para el crRNA AAUUCACUGUAAAGCUGGAA en los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{fl/fl} electroporadas *in vivo* con loxP-RNP y Pten-RNP. Los nucleótidos se indican con colores únicos (A = verde; C = naranja; G = amarillo; T = púrpura). Las sustituciones se muestran en negrita. Los rectángulos rojos destacan las secuencias insertadas. Las líneas horizontales discontinuas indican las secuencias eliminadas. La línea vertical discontinua indica el sitio de escisión previsto por la Pten-RNP. (B) Tabla con los datos de las medias de las secuencias alineadas, las inserciones, las delecciones y las frecuencias de inserciones y delecciones (InDel) próximas a la posición de corte de la Pten-RNP al secuenciar los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{fl/fl} electroporadas *in vivo* con loxP-RNP y Pten-RNP. (C-D) Gráficas de las posiciones y el tamaño correspondiente a las inserciones (izquierda) y delecciones (derecha) encontradas al secuenciar y analizar los productos de PCR que flanquean la región próxima del corte de la Pten-RNP (100bp por cada lado) obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{fl/fl} electroporadas *in vivo* con loxP-RNP y Pten-RNP.

El análisis inmunohistoquímico de los tejidos procesados, como se puede observar en la figura 110, reveló que a los 15 días de la descarga eléctrica algunas de las células epiteliales del endometrio perdían la expresión de PTEN.

Además, estas células *knock-out* para PTEN presentaban marcaje positivo para GFP. Con lo que estos resultados nos sugirieron que era posible la modificación simultánea de varias regiones del genoma a la vez en una misma célula.

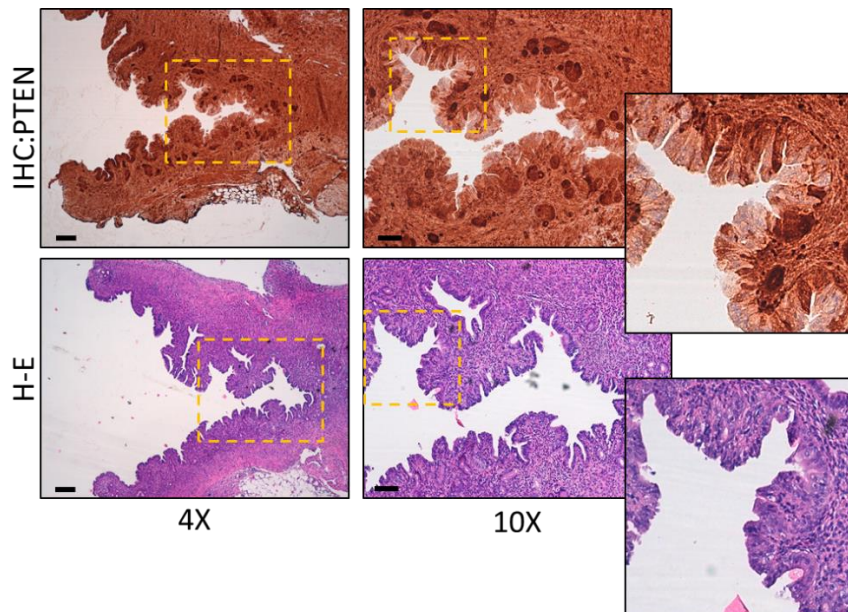


Figura 110. La electroporación de CRISPR/Cas9 *in vivo* de los úteros con la *Pten*-RNP modifica de la expresión de PTEN en las células epiteliales endometriales. Imágenes representativas de la tinción contra PTEN y hematoxilina-eosina (H-E) (CK8) de los cortes histológicos de los úteros mT/mG^{ff} a los 15 días de la electroporación con la *Pten*-RNP, donde se aprecia la existencia de células epiteliales endometriales con distintos grados de positividad para PTEN. Imágenes 4x y 10X. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente.

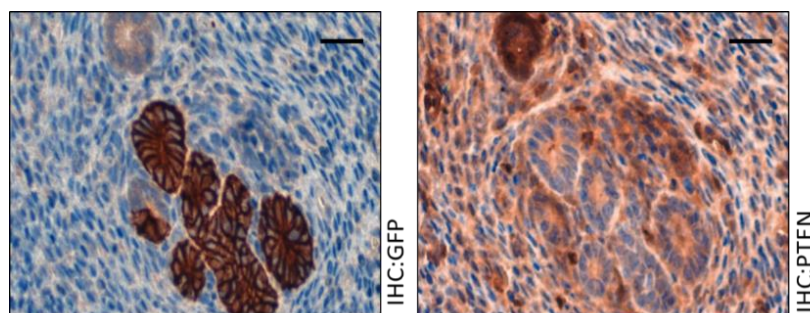


Figura 110. La electroporación de CRISPR/Cas9 *in vivo* en los úteros permite la generación de modificaciones génicas múltiples en una misma célula epitelial endometrial. Imágenes de la tinción contra GFP y PTEN de los cortes histológicos de los úteros mT/mG^{ff} a los 15 días de la electroporación con la *Pten*-RNP y la *loxP*-RNP, donde se aprecia la existencia de células epiteliales endometriales (glandulares) sin expresión de PTEN y que expresan GFP en sus membranas. Barras de 25 μ m.

Transcurridas 12 semanas desde la descarga eléctrica, se procedió al sacrificio de los ratones que habían sido inyectados con RNPs Cas9 dirigidas a *Pten* y *loxP*. El análisis inmunohistoquímico en estos tejidos de la expresión de citoqueratina, PTEN, p-Akt y GFP resultó en la aparición de lesiones endometriales positivas para citoqueratina 8 (lesiones epiteliales) que presentaban además de un marcaje positivo para GFP, una pérdida en la expresión de PTEN y como consecuencia de ésta, un aumento de la fosforilación de AKT. Estas lesiones fueron diagnosticadas como adenocarcinomas endometriales. Además de estas neoplasias epiteliales PTENKO y positivas para mG, se observaron lesiones deficientes para PTEN pero negativas para la GFP. Asimismo, también se detectaron regiones epiteliales que presentaban un marcaje membranario en la tinción contra GFP, pero que presentaban niveles normales de PTEN (Figura 111).

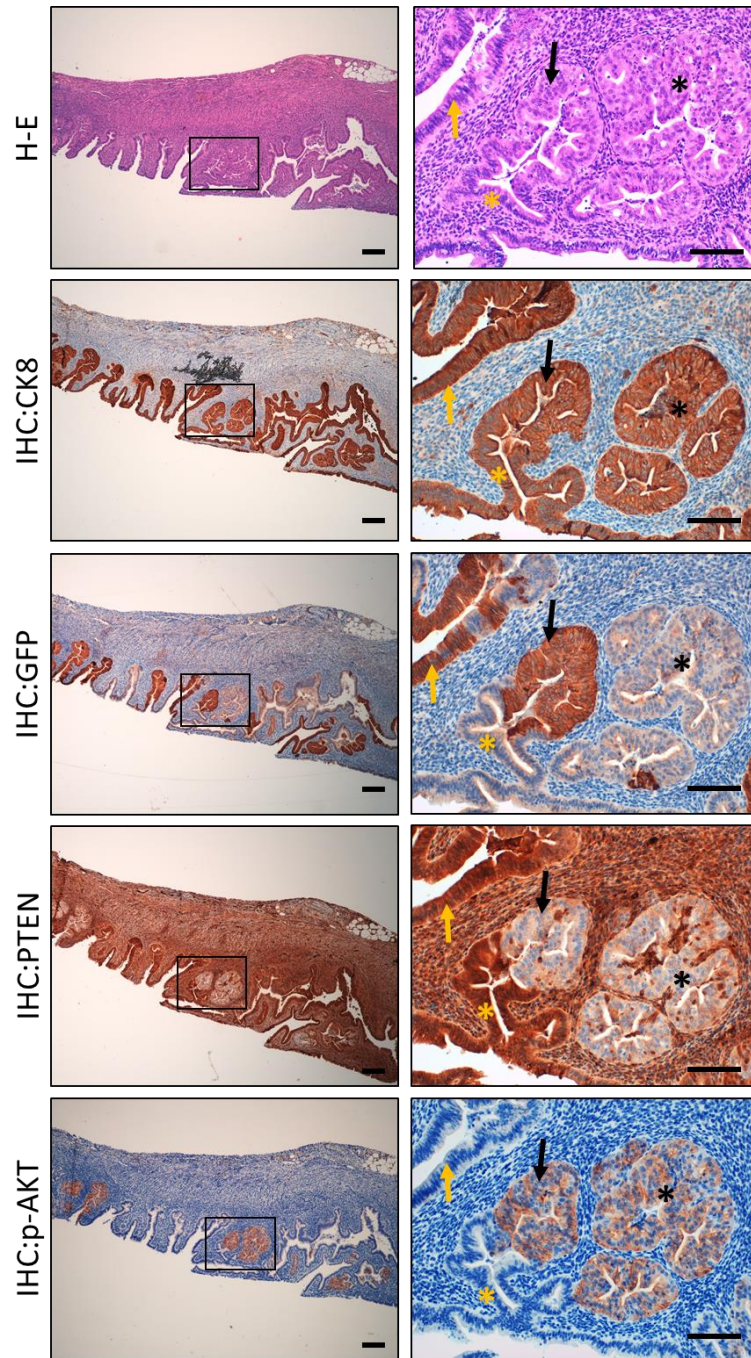


Figura 111. La co-electroporación *in vivo* de los componentes CRISPR genera lesiones epiteliales endometriales y una población heterogénea de poblaciones epiteliales endometriales. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E), y la tinción contra PTEN, AKT fosforilada (p-AKT), citoqueratina 8 (CK8) y GFP de los cortes histológicos consecutivos de los úteros mT/mG^{fl/fl} a las 12 semanas de la electroporación con la *Pten*-RNP y la *loxP*-RNP, donde se aprecia la co-existencia de carcinomas endometriales deficientes de PTEN que presentan (flecha negra) o no (asterisco negro) modificación génica en la secuencia loxP del mT/mG. Asimismo, también se observan células epiteliales no tumorales, con niveles salvaje de PTEN, pero que a su vez presentan (flecha amarilla) o no (asterisco amarillo) marcaje positivo para GFP en las membranas. Imágenes a 4x y 20x. Barras de 200 μ m y 100 μ m, respectivamente.

Para demostrar aún más la generación de lesiones endometriales epiteliales, realizamos un análisis de todo el útero (previa selección de la región electroporada) de la expresión de mGFP utilizando microscopía de lámina de luz fluorescente (*Light sheet fluorescence microscopy*, LSM). Para ello realizamos un análisis de imágenes de la expresión de mGFP en todo el fragmento uterino de los

úteros electroporados con *loxP*-RNP y *Pten*-RNP. Nuevamente, las imágenes individuales de la lámina fluorescente, así como la reconstrucción tridimensional del tejido uterino revelaron que la expresión de mGFP, y por ende, la edición génica estaba restringida a las células que mostraban un patrón epitelial de organización glandular y luminal (Figura 112). Asimismo, estas células verdes presentaban una organización celular similar la que se da en las neoplasias intraepiteliales endometriales que se generan en el modelo condicional inducible por tamoxifeno. En particular, la forma de "pera" en 3D de aquellas lesiones neoplásicas que se originan en la superficie epitelial del endometrio, se pueden apreciar en la segmentación de GFP+ y la representación en 3D de la figura 112.

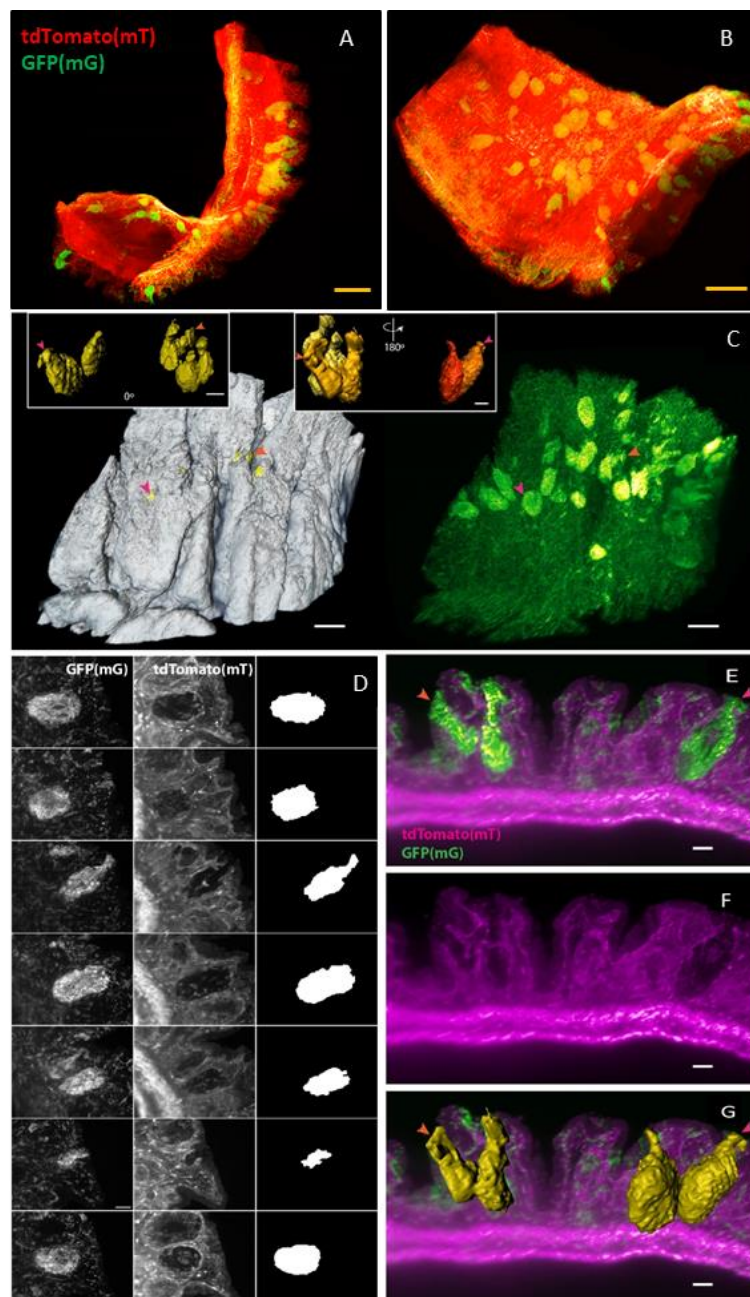


Figura 112. La microscopía de lámina de luz fluorescente muestra que la electroporación de CRISPR/Cas9 *in vivo* de los úteros con *Pten*-RNP y *loxP*-RNP genera lesiones epiteliales endometriales a lo largo de todo el tejido. **(A-G)** Imágenes representativas de los endometrios mT/mG^{f/f} a las 12 semanas de la electroporación con la *Pten*-RNP y la *loxP*-RNP. **(A-B)** Imágenes obtenidas a partir de capturas del video obtenido con el software Imaris 9.1 tras la transparentación de todo el órgano (*whole-organ clearing*). Barras de 700 μm . **(C-G)** La microscopía de fluorescencia en lámina de luz muestra que la electroporación CRISPR/Cas9 *in vivo* de úteros con *Pten*-RNP y *LoxP*-RNP genera lesiones epiteliales endometriales en todo el tejido. **(C)** Representación de la superficie (izquierda, del canal tdTomato) y la correspondiente proyección de máxima intensidad (derecha, del canal GFP) en un fragmento de tejido de 3x3mm. Los recuadros muestran seis lesiones segmentadas GFP+ seleccionadas por renderización de superficie, desde dos direcciones opuestas: vista frontal (izquierda, superficies amarillas) y vista posterior (derecha, volúmenes con colores diferentes). **(D)** Muestra secciones seleccionadas de lesiones GFP+ (izquierda) y la correspondiente señal tdTomato (centro), con la imagen segmentada de las lesiones. **(E-G)** Muestran un corte ortogonal a través de tres lesiones, visualizando únicamente los canales de tdTomato en **F**, canales tdTomato/GFP superpuestos en **E**, y la representación del volumen de las lesiones verdes en **G**. **(C)** y **(E-G)** muestran claramente las lesiones neoplásicas en forma de pera con la punta originada en la superficie del epitelio, en particular, ver las flechas en C, E y G. Las flechas magenta y naranja señalan las mismas lesiones a través de las imágenes C, E y G. Escalas: C, 400 μm , recuadros: izquierda 200 μm , derecha 100 μm , D-G, 100 μm .

DISEÑO DE NUEVOS DIANAS GÉNICAS CRISPR/CAS9 PARA LA GENERACIÓN DE NUEVOS EPO-GEMM

Los resultados anteriores nos animaron a diseñar y probar nuevas RNP esta vez dirigidas a nuevas regiones génicas correspondientes a secuencias de genes involucrados en la carcinogénesis endometrial. Para comenzar nos centramos en el diseño de crRNA contra las secuencias de dos genes que son supresores tumorales altamente mutados en CE: *transformation related protein 53* (*Trp53* o *p53*) y *F-box and WD-40 domain protein 7* (*Fbxw7*).

Como se muestra en la figura 113, en cuanto a *p53*, se decidió generar un crRNA contra el exón 7, debido a que en CE humanos las mutaciones de *TP53* afectan principalmente a este exón (*Schultheis et al., 2016*). Al diseñar la secuencia del crRNA contra *Trp53* se buscó una región homóloga para el gen humano *TP53* para que pudiera usarse también para la edición génica de células humanas. En el caso de *Fbxw7*, se probó de dirigir la RNP contra la secuencia de su tercer exón y al igual que con el gen *p53*, también se buscó una región genómica que fuera homóloga entre humano y ratón.

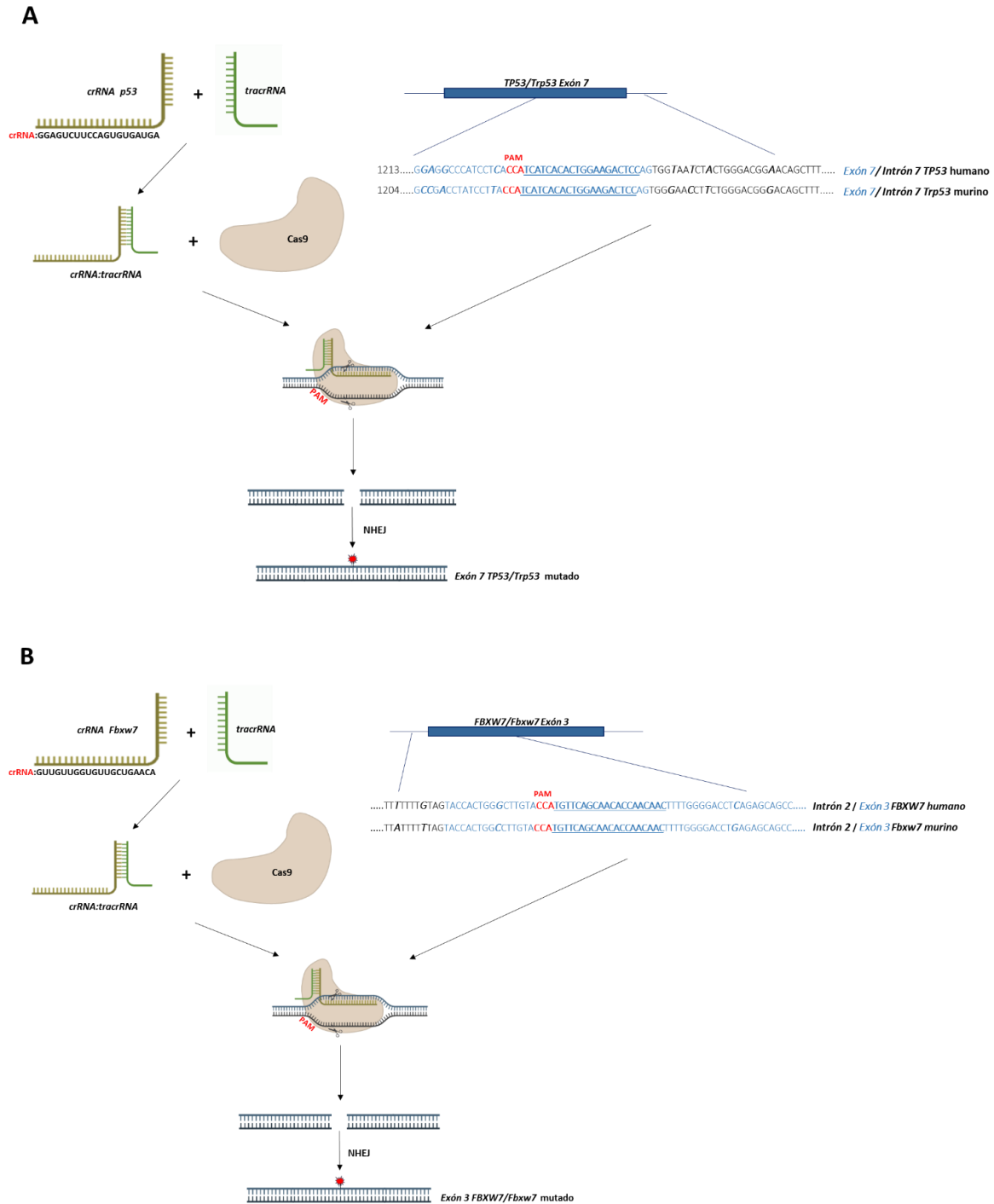


Figura 113. Diseño de los crRNA contra el exón 7 de *TP53/Trp53* y contra el exón 3 de *FBXW7/Fbxw7*. (A) Esquema representativo del diseño del crRNA contra el exón 7 de *TP53/Trp53* y la generación de edición CRISPR en esta secuencia. En él se representa la generación de la ribonucleoproteína dirigida contra la secuencia del exón 7 del gen *TP53/Trp53* a partir de la proteína Cas9 y la previa producción del crRNA:tracrRNA partiendo del ARN CRISPR (ARNcr o crRNA) y ARN CRISPR transactivante (ARNtracr o tracrRNA). De igual manera, se plasma la secuencia del crRNA contra *TP53/Trp53*, así como las regiones de interés de exón 7 de *TP53/Trp53*. En rojo la secuencia PAM, en azul subrayado las secuencias de apareamiento con el crRNA contra el exón de interés, en azul sin subrayar secuencia correspondiente al exón de *TP53/Trp53*, en negro la secuencia correspondiente al intrón 7 de *TP53/Trp53*. En negrita y cursiva los nucleótidos divergentes entre las secuencias de ambas especies. **(B)** Lo mismo que en el apartado A pero esta vez la secuencia del crRNA va dirigido contra el exón 3 del *FBXW7/Fbxw7*.

Seguidamente, se comprobó si los crRNAs diseñados presentaban regiones de corte en el resto del genoma fuera de la secuencia de interés mediante el empleo del algoritmo Cas-OFFinder de la herramienta bioinformática CRISPR RNA-guided endonucleases (RGEN) Tools (Bae *et al.*, 2014). Únicamente el crRNA contra *p53* presentó dos regiones homólogas con el genoma murino, ya que el gen *p53*, presenta un pseudogen en el cromosoma 17 conocido como *Trp53-ps* (NCBI). En el resto de casos solo se encontró una secuencia de corte tanto en el genoma humano como el de ratón (Tabla 21).

| crRNA | Secuencia diana | Especie | Número de dianas encontradas | Cromosoma | Posición | Dirección |
|--------------|----------------------|---------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <i>p53</i> | GGAGTCTTCCAGTGTGATGA | Humano | 1 | chr17 | 7674182 | + |
| | | Ratón | 2 | chr17 | 54420413 | - |
| | | | | chr11 | 69589225 | - |
| <i>Fbxw7</i> | GTTGTTGGTGTGCTGAACA | Humano | 1 | chr4 | 152347032 | + |
| | | Ratón | 1 | chr3 | 84958519 | - |

Tabla 21: Off-targets de los crRNA para la edición génica de *p53* y *Fbxw7*. Tabla donde aparecen las regiones de apareamiento de ambos crRNAs con el resto de genoma murino y humano, analizados con CRISPResso2. Donde se aprecia que en el genoma humano ambos crRNAs hibridan únicamente en una región del genoma. En cambio, en el genoma murino, el crRNA contra el exón 3 de *p53*, además de con la secuencia de interés con el cromosoma 11, hibrida con otra secuencia en el cromosoma 17 correspondiente a la secuencia del pseudogen de *Trp53*, *Trp53-ps*. chr; cromosoma, del inglés chromosome.

En primer lugar, una vez obtenidas las RNP con estas dos nuevas dianas de corte para *p53* y *Fbxw7*, se realizó un ensayo *in vitro* siguiendo un protocolo similar al utilizado con los crRNAs anteriores, pero esta vez utilizando como diana de la digestión *in vitro* unos fragmentos de PCR que flanquearan el exón 7 de *Trp53* y el exón 3 de *Fbxw7* respectivamente. Así, como se muestra en la siguiente figura, ambas ribonucleoproteínas mostraron actividad nucleasa *in vitro* exitosamente.

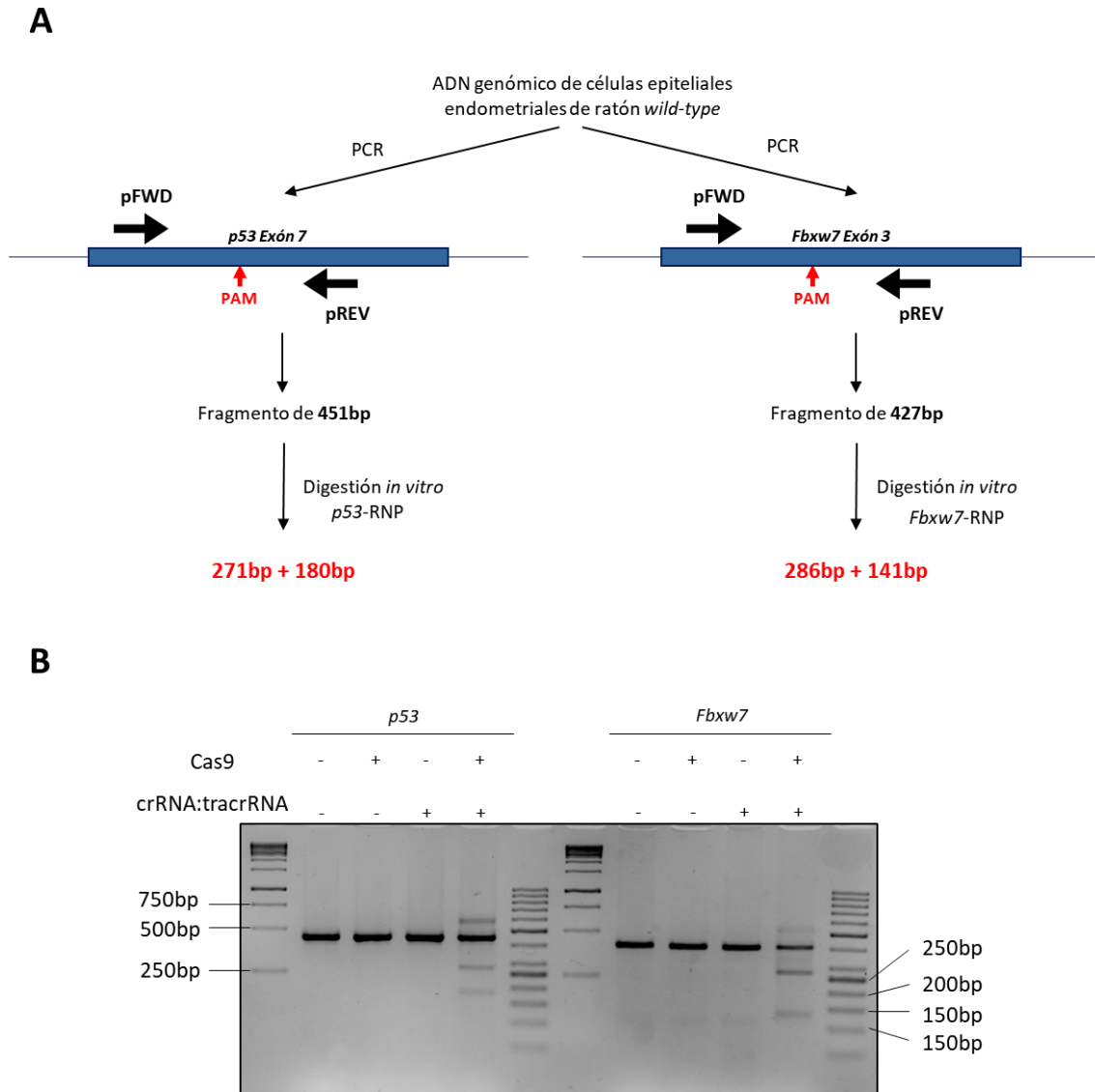


Figura 114. Las RNPs dirigidas contra el exón 7 de *p53* y el exón 3 de *Fbxw7* presentan actividad nucleasa. (A) Esquema representativo de la generación del fragmento de PCR de 451bp y 427bp que flanquean las dos secuencias dianas del exón 7 de *p53* y el exón 3 de *Fbxw7* respectivamente. Estos fragmentos se generan a partir de ADN genómico extraído de células epiteliales endometriales de ratón *wild-type*, seguido del esquema de la digestión *in vitro* con las RNP dirigidas a *p53* (*p53*-RNP) y a *Fbxw7* (*Fbxw7*-RNP) de dicho fragmento, donde se marcan la longitud de las fracciones de ADN resultantes del corte CRISPR. pFWD; primer directo o *forward*. pREV; primer reverso o *reverse*. (B) Imagen del gel de agarosa 1% donde se ha resuelto los productos de las distintas condiciones de la digestión de ambos fragmentos de PCR, donde se aprecian las bandas correspondientes al fragmento sin digerir en las condiciones donde falta uno de los componentes CRISPR, y las bandas correspondientes a los fragmentos liberados tras la digestión en la condición problema donde se añadió la *p53*-RNP o la *Fbxw7*-RNP.

Una vez demostrada *in vitro* la actividad nucleasa de las ribonucleoproteínas contra la secuencia de los genes *p53* y *Fbxw7*, se decidió someter a prueba estos complejos ribonucleoproteicos *in vivo*, para así comprobar si también eran eficientes en la edición génica en células epiteliales endometriales. Siguiendo el mismo protocolo de electroporación que con la *Pten*-RNP, se electroporaron un ratón cada una de las mixes ribonucleoproteicas.

Trascurridos 5 días de la descarga eléctrica se procedió a la extracción de ADN genómico de las células epiteliales endometriales de los úteros electroporados. Nuevamente, como se explica en el apartado Materiales y Métodos, se llevó a cabo una PCR que flanqueara el lugar de corte CRISPR, por un lado, del exón 7 de *p53* y por otro del exón 3 del gen *Fbxw7*.

Por un lado, el análisis NGS de los amplicones del exón 7 de *p53* demostró como se muestra en la figura 115 que cerca del 18.9% de las secuencias analizadas, que anillaron con la secuencia de referencia, presentaban inserciones o deleciones próximas a la posición de corte CRISPR generadas por la reparación NHEJ tras el corte de la *p53*-RNP. Notablemente, gran parte de ellas causan la pérdida del marco de lectura del gen o producen sustituciones aminoacídicas.

Por otra parte, el análisis NGS de los amplicones del exón 3 de *Fbxw7* demostró como se muestra en la figura 116 que cerca del 9.15% de las secuencias analizadas, que anillaron con la secuencia de referencia, presentaban inserciones o deleciones próximas a la posición de corte CRISPR generadas por la reparación NHEJ tras el corte de la *Fbxw7*-RNP. Notablemente, gran parte de ellas causan la pérdida del marco de lectura del gen o producen sustituciones aminoacídicas.

El conjunto de los resultados presentados nos sugirió que la técnica de electroporación *in vivo* de los componentes CRISPR en la cavidad uterina nos permitía generar de una manera fácil, flexible, rápida, robusta y múltiplexable de SEMM para el estudio del CE.

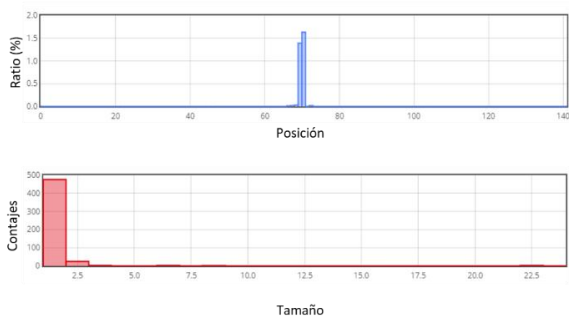
A



B

| Secuencias totales | Lecturas alineadas | Inserciones | Deleciones | Frecuencia InDel |
|--------------------|--------------------|-------------|------------|------------------|
| 300335 | 39941 | 1161 | 6398 | 7559 (18.9%) |

C



D

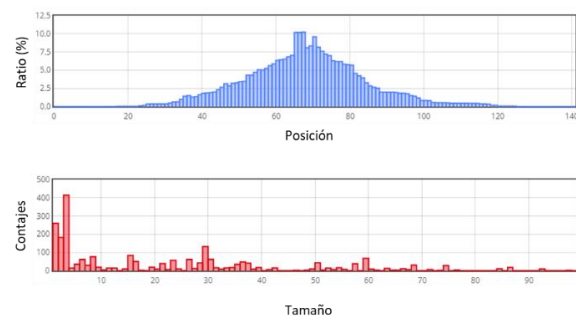
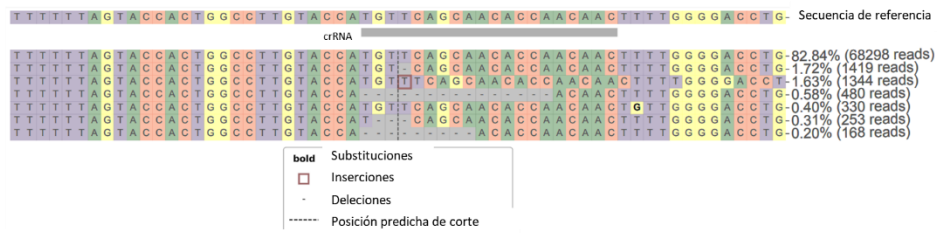


Figura 115. La electroporación de células epiteliales endometriales *in vivo* con los componentes CRISPR/Cas9 produce de manera satisfactoria la edición génica contra el exón 7 de *p53*. (A) Visualización de la distribución de los alelos más representativos (>0,2%) identificados alrededor del sitio de corte para el crRNA GGAGUCUCCAGUGUGAUGA en los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{f/f} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *p53*-RNP. Los nucleótidos se indican con colores únicos (A = verde; C = naranja; G = amarillo; T = púrpura). Las sustituciones se muestran en negrita. Los rectángulos rojos destacan las secuencias insertadas. Las líneas horizontales discontinuas indican las secuencias eliminadas. La línea vertical discontinua indica el sitio de escisión previsto por la *p53*-RNP. (B) Tabla con los datos de las medias de las secuencias alineadas, las inserciones, las deleciones y las frecuencias de inserciones y deleciones (InDel) próximas a la posición de corte de la *Pten*-RNP al secuenciar los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{f/f} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *p53*-RNP. (C-D) Gráficas de las posiciones y el tamaño correspondiente a las inserciones (izquierda) y deleciones (derecha) encontradas al secuenciar y analizar los productos de PCR que flanquean la región próxima del corte de la *p53*-RNP (70bp por cada lado) obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{f/f} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *p53*-RNP.

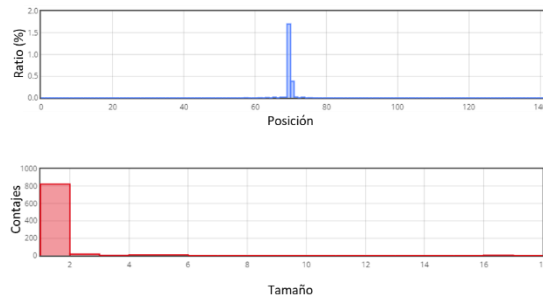
A



B

| Secuencias totales | Lecturas alineadas | Inserciones | Delecciones | Frecuencia InDel |
|--------------------|--------------------|-------------|-------------|------------------|
| 201880 | 82448 | 1779 | 5769 | 7548 (9.15%) |

C



D

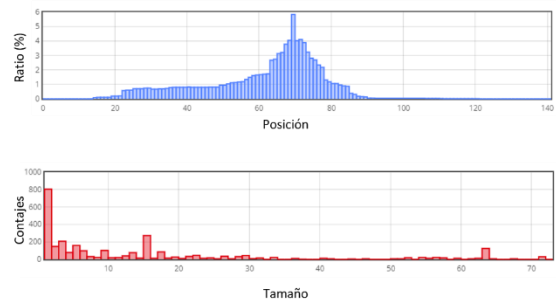


Figura 117. La electroporación de células epiteliales endometriales *in vivo* con los componentes CRISPR/Cas9 produce de manera satisfactoria la edición génica contra el exón 3 de *Fbxw7*. (A) Visualización de la distribución de los alelos más representativos (>0,2%) identificados alrededor del sitio de corte para el crRNA GUUGUUGGUGUUGCUGAACA en los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{ff} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *Fbxw7*-RNP. Los nucleótidos se indican con colores únicos (A = verde; C = naranja; G = amarillo; T = púrpura). Las sustituciones se muestran en negrita. Los rectángulos rojos destacan las secuencias insertadas. Las líneas horizontales discontinuas indican las secuencias eliminadas. La línea vertical discontinua indica el sitio de escisión previsto por la *Fbxw7*-RNP. (B) Tabla con los datos de las medias de las secuencias alineadas, las inserciones las delecciones y las frecuencias de inserciones y delecciones (InDel) próximas a la posición de corte de la *Pten*-RNP al secuenciar los productos de PCR obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{ff} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *Fbxw7*-RNP. (C-D) Gráficas de las posiciones y el tamaño correspondiente a las inserciones (izquierda) y delecciones (derecha) encontradas al secuenciar y analizar los productos de PCR que flanquean la región próxima del corte de la *p53*-RNP (70bp por cada lado) obtenidos de ADN genómico de células epiteliales endometriales de ratones mT/mG^{ff} electroporadas *in vivo* con *loxP*-RNP y *Fbxw7*-RNP.



DISCUSIÓN

*"En algún lugar, algo increíble
está esperando ser conocido"*

Carl Sagan

La generación de modelos murinos que mimetizaran la biología de los tumores humanos ha sido un progreso decisivo en el avance del conocimiento de la biología del cáncer. El uso de estos animales modificados genéticamente permite comprender los mecanismos que desencadenan la patología, y así mismo, determinar nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico, o evaluar los engranajes moleculares que desencadenan resistencia a las ya existentes. Durante este trabajo, se describe el desarrollo y evaluación de nuevos modelos animales para el estudio del cáncer endometrial.

1. ESTABLECIMIENTO DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE PTEN Y/O P53 EN EL DESARROLLO TUMORAL DEL ENDOMETRIO

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS DE ORIGEN EPITELIAL INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *P53*

En la primera parte del trabajo, se describe un modelo animal que permite la delección de *Pten* y/o *p53* de forma inducible por tamoxifeno en los tejidos epiteliales, lo que resulta en un rápido desarrollo de hiperplasias endometriales y carcinomas intraepiteliales endometriales en los animales con delección génica de *Pten* y de *Pten* y *p53*.

Por un lado, la inactivación mutacional de *PTEN* es muy frecuente en el cáncer de endometrio (*Getz et al., 2013; Merritt and Cramer, 2011; Okuda et al., 2010*), y su tasa mutacional varía entre los diferentes subtipos de CE (*Bell and Ellenson, 2019*). Por otro lado, las alteraciones de *TP53* son otras de las mutaciones típicas en este tipo de cáncer, ya al igual que *PTEN*, su frecuencia mutacional varía entre los distintos tipos de CE (*Getz et al., 2013; Okuda et al., 2010*). Así, en el CE existe una tendencia de exclusión mutacional entre ambos genes, siendo las de *PTEN* más comunes en mujeres jóvenes con tumores endometriales de bajo grado, y las de *TP53* en tumores de alto grado endometrioides y serosos (*Bell and Ellenson, 2019; Leskela et al., 2019*). No obstante, entorno al 15% de los CE presentan mutaciones en ambos genes (*Janiec-Jankowska et al., 2010; Stavropoulos et al., 2019*). Hasta la fecha son muchos los trabajos donde se ha estudiado modelos murinos condicionales que presentaban delecciones bialélicas de manera individual o combinada de *Pten* o *Trp53*, con otros genes frecuentemente alterados en CE. No obstante, el análisis de la mayoría de estos modelos presenta una serie de limitaciones, que hacen que los resultados obtenidos sean heterogéneos, e incluso a veces contradictorios. Así, dependiendo del ratón condicional con el que se cruce el ratón *Pten^{ff}* para activar la actividad recombinasa Cre, unos modelos desarrollan adenocarcinomas endometriales invasivos (*Daikoku et al., 2008*), adenocarcinomas endometriales *in situ* (*Mirantes et al., 2013a*) o hiperplasias endometriales (*Liang et al., 2018*). O, en el caso del

ratón *Trp55^{ff}*, que, al igual que nos sucede en nuestro modelo, en algún estudio no desarrolla ningún tipo de patología (Daikoku et al., 2008) y en cambio otro genera un modelo de carcinomas seroso y carcinosarcomas endometriales (Wild et al., 2012). De esta manera, en otros estudios, cuando uno de estos dos genes floxeados se combinan con otros RMG, con alteraciones genéticas en genes como *Kras* (Tae Hoon Kim et al., 2010b; Kun et al., 2020), *Tgfbr1* (Y. Gao et al., 2017), *Cdh1* (Reardon et al., 2012; Stodden et al., 2015), *PiK3ca* (Reske et al., 2021), *Dicer1* (Wang et al., 2020), *Pot1a* (Akbay et al., 2013), *Fbxw7* (Cuevas et al., 2019), *CycD1* (Dosil et al., 2017), *Rb1* (D. J. Fu et al., 2020) o *Arid1a* (Suryo Rahmanto et al., 2020), todos ellos desarrollan o carcinomas de endometrio, sarcomas o carcinosarcomas endometriales, todo ello dependiendo de si el gen mutado con el que se combina la delección de *Pten* o *p53* en esta relacionado con uno u otro tipo de tumor uterino, además el tiempo de latencia de la enfermedad difiere entre unos y otros estudios. Para empezar, es importante remarcar que salvo en los casos donde se emplea la activación de la Cre bajo el control de la administración de tamoxifeno (Mirantes et al., 2013a) o de tetraciclina (D. J. Fu et al., 2020; Suryo Rahmanto et al., 2020), en el resto de casos, la delección génica es desde su estado fetal. A excepción del Síndrome de Cowden (Farooq et al., 2010; Shai et al., 2014) y el de Lynch (Singh and Resnick, 2017), correspondientes al 2-5% de los casos de CE, donde los tumores son hereditarios y los pacientes presentan la mutación desde el nacimiento, en el cáncer de endometrio, como en la gran mayoría de cánceres, las mutaciones surgen esporádicamente y de manera progresiva en el transcurso del tiempo (Shai et al., 2014).

Igualmente, es probable que los cambios observados entre estudios surjan como consecuencia de que en ninguno de ellos la delección génica se da de manera única y específica en las células epiteliales endometriales. Así, en alguno de estos estudios, la actividad recombinasa, y por tanto, la ablación génica, se da tanto en el componente epitelial como en el mesenquimal uterino (Beauparlant et al., 2004; Jamin et al., 2002; Soyal et al., 2005), en otros se da en otros tejidos ginecológicos como ovarios y trompas de Falopio (Contreras et al., 2010; Daikoku et al., 2014; Jamin et al., 2002; Perets et al., 2013; Shao et al., 2002; Soyal et al., 2005), hecho que puede variar el ambiente uterino a la hora de la carcinogénesis, y por último en otros en órganos no genitales, como riñón, hígado, tiroides, entre otros, condición que pueden hacer variar significativamente la esperanza de vida de los animales, dificultando así el estudio a largo plazo del CE en estos modelos trasgénicos. Así, por ejemplo, un estudio comparó el desarrollo tumoral debido a la inactivación mutacional de *Pten* emplando tres tipos distintos de ratones condicionales Cre (Liang et al., 2018). En este, se describe como entre los diversos modelos, en aquel donde la delección es solo en el componente mesenquimal no se desarrolla ningún tipo de carcinoma endometrial, por el contrario en el que lo hace en el componente epitelial los ratones únicamente desarrollan hiperplasias endometriales, y únicamente los ratones que presentan el gen de la Cre bajo el promotor de la

progesterona (Pgr-Cre), donde la actividad recombinasa se da en ambos componentes endometriales, los tumores desarrollados presentan mayor agresividad que cuando únicamente la delección se da en el compartimento epitelial. No obstante, el carcinoma endometrial, al igual que todos los adenocarcinomas, aparecen como resultado de la acumulación de mutaciones en células epiteliales, siendo éstas las que forman el tumor. En este sentido, como comentábamos con anterioridad, la delección de *Pten* en el estroma uterino no induce la formación de tumores (*Daikoku et al., 2011*), pero no se puede menospreciar la influencia del mismo en el proceso neoplásico y en el ambiente tumoral (*De Nola et al., 2019; Pineda et al., 2015; Pradip et al., 2021; Sahoo et al., 2018*). Actualmente, la influencia del estroma y el microambiente tumoral sobre el desarrollo de la patología está ampliamente demostrado y aceptado (*Bhowmick et al., 2004*). Un ejemplo se observa en el cáncer de mama, en el cual la inactivación específica de *PTEN* en el estroma acelera el proceso tumoral (*Trimboli et al., 2009; Wallace et al., 2011*). Es probable que la delección de *PTEN* en las células del estroma endometrial afecte a la progresión tumoral de las células epiteliales. La inactivación del gen de forma específica en el componente epitelial es crucial para poder entender los mecanismos autónomos implicados en carcinogénesis. Hasta el momento, la delección exclusiva en células epiteliales endometriales sólo se ha conseguido mediante experimentos de recombinación tisular, los cuales se discutirán en apartados posteriores.

En cuanto al modelo con delección combinada de *Pten* y *p53*, hasta la fecha, solo existe un estudio que use un modelo murino para la alteración de la expresión de ambos genes (*Daikoku et al., 2008*). En este modelo se emplea la Pgr-Cre para generar la ablación, por lo que el modelo CAG-Cre:ER^T *PTEN^{f/f} P53^{f/f}* que presentamos en este trabajo es el primero en presentar la delección de *Pten* y *p53* de manera exclusiva en las células epiteliales endometriales dentro del útero y además de una manera temporalmente condicional. En este estudio, al igual que el nuestro, el ratón doble *KO* reduce su esperanza de vida con relación al *KO* para *Pten*, ya que también presenta delecciones génicas en tejidos no uterinos, por lo que ambos únicamente desarrollan el mismo tipo de patología, en este caso adenocarcinoma endometrial con invasión de miometrio, en el nuestro adenocarcinoma endometrial *in situ*.

El modelo CAG-Cre:ER^T precisa de la administración de tamoxifeno como inductor de la actividad recombinasa. Esta molécula es un análogo estrogénico ampliamente utilizado como terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer de mama, ya que aminora el riesgo de aparición de recidivas y metástasis (*Lewis and Jordan, 2005*). Sin embargo, a pesar de su elevado índice terapéutico, la administración de tamoxifeno incrementa en el doble de probabilidad de desarrollar cáncer de endometrio y puede causar hiperplasia en mujeres postmenopáusicas (*Emons et al., 2020; Houssami et al., 2006; Kedar et al., 1994; Vosse et al., 2002*). En ratones, la inyección de tamoxifeno en animales neonatos sin alteraciones genéticas, provoca la aparición de

adenocarcinoma de endometrio a partir de los 14 meses de edad (*Newbold et al., 1997*). En nuestro caso, uno de los riesgos era que el propio inductor del sistema contribuyera al proceso tumoral. No obstante, en (*Mirantes et al., 2013a*) se descartó esta opción, ya que al administrar el fármaco en ratones que no expresaban el gen CAG-Cre:ER^T (CAG-Cre:ER^{T-/-}), al analizar histológicamente todos los úteros de estos animales en todos los casos, estos mostraron tejidos sanos, análogas a los animales no inyectados. Esto puede deberse a que la inducción de la ablación génica de este modelo es con una única dosis puntual, y no de forma continuada como se da en el tratamiento de cáncer de mama. Otro hecho a tener en cuenta puede ser que los animales se analizaron entre las 5 y las 10 semanas desde su inducción, lo que contrarresta a los 14 meses del estudio comentado con anterioridad.

En relación al resto de patologías que presentaron los animales CAG-Cre:ER^T PTEN^{ff} P53^{ff} en tejidos alienos al útero, daba respuesta a lo observado al usar el animal reportero mT/mG junto con el CAG-Cre:ER^{T+/-} en (*Mirantes et al., 2013a*). En este estudio se vio que la delección tras una solo inyección de tamoxifeno producía la ablación de *Pten* en diversos tipos celulares epiteliales a lo largo de todos los órganos. En cambio, luego se detectaron únicamente carcinomas de endometrio e hiperplasias nodulares de tiroides, y no se observó crecimiento neoplásico en otros órganos epiteliales como los riñones, pulmones o colon. En el presente trabajo, la delección de *Pten* sumada a la ablación monoalélica o bialélica de *p53* inducida por tamoxifeno desencadena la aparición de neoplasias no solo en endometrio y tiroides, sino que también en hígado y colon, y de pulmón en la inyección intraperitoneal e intravaginal, respectivamente. Trabajos previos en el campo han demostrado que la inactivación de *PTEN* y/o *p53* en pulmón (*Andjelkovic et al., 2011; VanderLaan et al., 2017*), colón (*Armaghany et al., 2012; X. L. Li et al., 2015; Michel et al., 2021; Nakayama and Oshima, 2019; Salvatore et al., 2019*), hígado (*Luo et al., 2021; Peyrou et al., 2010*), o tejido hematopoyético (*Adamson et al., 1995; Mao et al., 2003; Mirantes et al., 2016; Wang et al., 2015*), provoca el desarrollo de tumores en dichos órganos. Existen varias explicaciones al porque, aunque este descrito que la pérdida única de *Pten* sería suficiente para desarrollar las neoplasias, éstas solo se hacen presentes con la delección de ambos genes. Por un lado, tanto el endometrio como la tiroides son tejidos muy sensibles a la inactivación de *Pten*, hecho que se aprecia en el elevado número de casos de pacientes que muestran mutaciones en este gen en patologías de ambos órganos. Además, estos órganos son, *a priori*, sensibles a estrógenos y, por ende, al tamoxifeno (*Marquardt et al., 2019; Santin and Furlanetto, 2011*), por lo que una concentración menor induce la carcinogénesis con anterioridad. Asimismo, el resto de órganos, pueden precisar de mayor tiempo para la aparición de neoplasias y/o factores adyuvantes del proceso tumoral como mutaciones secundarias, lo cual explicaría la aparición más temprana en los fenotipos de los ratones doble mutante. En estudios anteriores, utilizando el modelo Cre:ER^{T+/-}, la actividad recombinasa no

se daba en el tejido hematopoyético, en nuestro modelo, se observaron esplenomegalias y linfomas en los ratones dKO. Esta diferencia entre modelos, puede ser debida a la variación fenotípica causada por la alteración del fondo genético entre los animales empleados en cada estudio (Fowler et al., 2000; Montagutelli, 2000; Phillips et al., 1999; Tolman et al., 2021). Por ejemplo, se ha demostrado que el fondo genético afecta al desarrollo de tumores causados por la pérdida de *Pten* en ratones (Freeman et al., 2006) y de *p53* (Donehower et al., 1995). Además, la expresión espacio-temporal de la Cre también puede variar dependiendo de este factor (Dorà et al., 2014; Hébert and McConnell, 2000; Smith, 2011; H. Wang et al., 2010), provocando diferentes patrones de recombinación tanto en los ratones que expresan la CRE como los que aportan la secuencia *loxP*. En nuestro caso, la inactivación inducible de *Pten* y/o *p53*, se consiguió empleando una cepa transgénica de ratones que expresan la Cre:ER^T bajo el promotor de la β -actina de pollo (CAG). Así, debido a que la β -actina es un gen de expresión ubicua, teóricamente la Cre recombinasa se expresa en la mayoría de tejidos sanos en estadios tanto embrionarios como en adultos (Hayashi and McMahon, 2002). Es por estos motivos que, bajo el fondo genético de nuestro modelo, por un lado, los ratones PTENKO presenten lesiones colorrectales en un periodo temporal al que en el estudio original no lo hacían, o que los ratones dKO presenten una reducción en su esperanza de vida por delecciones y lesiones en tejidos que tampoco lo hacían en el modelo original.

En resumen, en la primera parte del trabajo hemos generado un modelo murino para estudiar los mecanismos autónomos de tumorigénesis inducida por la pérdida de *Pten* y *p53* en el útero, hígado, pulmón, tiroides, colon y tejido hematopoyético. Además, como se discutirá en apartados posteriores, este modelo de delección epitelial endometrial se utilizará como herramienta para la generación de nuevos modelos híbridos *ex vivo-in vivo* de CE.

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS INDUCIDAS POR LA PÉRDIDA DE *PTEN* Y/O *P53* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ÚTERO.

Como se mencionó en el apartado anterior, el modelo animal inducible por tamoxifeno, *in vivo*, debido al resto de patologías no ginecológicas, no nos permitió discernir histológicamente entre los ratones con ablación única de *Pten* con aquellos que además perdían también la expresión de *p53*. Por este motivo, en la siguiente parte del trabajo se decidió buscar modelos donde la inhibición génica tuviera lugar únicamente en el útero para poder estudiar así el efecto de la pérdida de *p53* en un contexto deficiente de PTEN en el CE.

El uso de modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, patient-derived xenograft) para el estudio de distintos tipos de cánceres, así como para la búsqueda de nuevos fármacos oncológicos está altamente descrito en la literatura (Aparicio et al., 2015; Hidalgo et al., 2014; Tentler et al.,

2012). Los PDX uterinos pueden generarse, de manera ortotópica o subcutánea, mediante la inyección de celulares de cáncer humano (Akimoto et al., 2018; Haldorsen et al., 2015), organoides (Boretto et al., 2019; Pauli et al., 2017), tumores frescos (Cabrera et al., 2012; Unno et al., 2014), o de aspirados uterinos (Casas-Arozamena et al., 2020), generalmente a huéspedes inmunocomprometidos, como los ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). De esta forma, se han realizado dos modelos de PDX, donde el tejido de origen provenía de ratones que presentaban delección condicional de Pten y/o p53 en las células de endometrio. En el primero mediante el injerto de explantes uterino, y el segundo mediante la introducción de células epiteliales *knock-out* para los genes de interés. El uso de explantes uterino ha sido descrito para evaluar la fisiología normal del endometrio, carcinogénesis, efecto de fármacos, entre otras cosas (Fasciani et al., 2003; Marbaix et al., 1995; Pitt et al., 2001; Sharma et al., 2003; Vassilev et al., 2005). En endometrio estos explantes tumorales están ligados a una pequeña viabilidad, por ello son pocos los artículos donde se desarrollan estos cultivos tumorales *ex vivo*. En ellos se ha podido estudiar la respuesta rápida a fármacos, y así evaluar los mecanismos de acción de estos fármacos en el tejido tumoral (Dolcet et al., 2006; Sales et al., 2010, 2007), pero no en estudios a largo plazo. Éstos, pueden ser los motivos por los que en nuestro modelo no ortotópico *ex vivo-in vivo* de explantes uterinos estos degenerasen antes de poder estudiar el avance del CE. A pesar de ello, en el modelo donde introdujimos de manera subcutánea células epiteliales aisladas de endometrios donde se les había inducido con tamoxifeno la ablación génica, conseguimos establecer un nuevo modelo para el estudio de la carcinogénesis endometrial. Este tipo de modelo, se asemeja a los PDX originados a partir de organoides tumorales derivados de pacientes (PDTO, PDX from patient-derived tumour organoids), estos modelos humano-ratón han sido utilizado en otros estudios para el estudio de diversos tipos de lesiones oncológicas, entre las que se encuentra los adenocarcinomas endometriales (Kato et al., 2021; Pauli et al., 2017). En este trabajo, basándose en este tipo de modelos, se ha conseguido estudiar la progresión de los adenocarcinomas endometriales deficientes para Pten y p53, los cuales desarrollaron carcinosarcomas endometriales (CSE).

Los carcinosarcomas uterinos, son un grupo tumoral ginecológico que hasta hace relativamente un periodo corto de tiempo, existía una discrepancia a la hora de su diagnóstico histológico debido a su naturaleza bifásica tanto epitelial como mesenquimal (McCluggage 2002; Pezzicoli et al., 2021). Estudios moleculares han demostrado que las alteraciones en el componente epitelial y el mesenquimal son las mismas, por lo que a día de hoy, a pesar de haber discrepancias en la literatura, esta aceptado que casi el total de los carcinosarcomas son carcinomas metaplásicos en los cuales el componente sarcomatosos deriva del epitelial como resultado de la transdiferenciación epitelio-mesénquima (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) durante la

progresión tumoral (*Castilla et al., 2011; Chiyoda et al., 2012; Mcconechy et al., 2015; Taylor et al., 2006; Zhao et al., 2016*). Nuestro modelo, refuerza esta hipótesis, puesto que los tumores subcutáneos que fueron diagnosticados como CSE, habían sido generados a partir de células uterinas donde solo presentaban modificaciones génicas las células endometriales epiteliales. Además, el análisis transcriptómico de organoides derivados de estas mismas células epiteliales que se usaron para la generación de los tumores subcutáneos, presento un aumento es marcadores típicos de EMT en cáncer, como lo son la vimentina, ZEB1, SNAIL o la MMP2 entre otros (*Guarino et al., 2007; Radisky and Radisky, 2010; Y. Wang et al., 2014; Zhang et al., 2015*).

La mayoría de los carcinosarcomas endometriales pertenecen al subtipo molecular de carcinoma endometrial de alto número de copias, caracterizado por la mutación del *TP53* y frecuentemente acompañado por un gran número de alteraciones del número de copias de los genes, incluyendo la amplificación de importantes oncogenes, como el *CCNE1* y el *c-MYC*. Sin embargo, una proporción de casos (20%) probablemente representa la progresión de tumores inicialmente pertenecientes al subtipo molecular de bajo número de copias de tipo endometriode (caracterizado por mutaciones en genes como *PTEN*, *PI3KCA* o *ARID1A*), tras la adquisición de las mutaciones *TP53* (*Leskela et al., 2019*). Por lo tanto, nuestro modelo de CSE se correspondería al segundo subtipo de lesión uterina, y en este contexto son escasos los modelos de CSE presentes en la literatura (*Cuevas et al., 2019*), por lo que este modelo será útil a la hora de entender la progresión tumoral del CEE a CSE.

Otro de los modelos presentados dentro de este apartado, requería del uso de la proteína Cre fusionada a un péptido de penetración celular. Estos CPP han sido utilizados terapéuticamente en investigación preclínica y clínica para el estudio y tratamiento del cáncer (*Borrelli et al., 2018; Kondo et al., 2021; Maity et al., 2020; Palanikumar et al., 2020; Tripathi et al., 2018*). Con este fin, entre los péptidos ampliamente utilizados en la literatura, se encuentra el péptido TAT (*Cantelmo et al., 2010; Lee et al., 2011*). Este péptido es un fragmento proteico derivado del virus del VIH, que presenta de manera autónoma la capacidad de inducir la endocitosis en las células que entran en contacto con él (*Frankel and Pabo, 1988; Marciniak et al., 1990*) entre otros mecanismos de entrada celular (*Wadia et al., 2004*). Su combinación con la proteína recombinasa Cre fue descrita por primera vez en (*Joshi et al., 2002*), donde se observó que su uso *in vitro* e *in vivo* permitía prescindir del uso del transgen Cre para la delecionar alelos floxeados por secuencias *loxP*. De manera similar, esto se estaba probando en otros laboratorios con otros tipos de CPPs (*Jo et al., 2001*). Desde entonces, el uso de esta proteína de fusión ha sido utilizado desde para la generación de modelos animales transgénicos (*Kang et al., 2018; Xu et al., 2008*), para la delección génica específica *in situ* en hígados de ratones (*Sonsteng et al., 2014*). Esta proteína recombinante también ha sido usada con anterioridad para generar modelos *in vivo* de cáncer, como por ejemplo para la generación de tumores de pulmón (Lukas Heukamp; et al., 2007) , o de sarcomas de célula clara (*Straessler et al.,*

2013), o en organoides de tumores intestinales (*Jardé et al., 2018*), pero en ginecología solo se ha empleado para la edición genética específica de placenta (*Ozguldez et al., 2020*), por lo que nuestro modelo es el primero en utilizar esta proteína de fusión para generar un modelo de delección *in situ* en el útero para el estudio de cánceres uterinos.

El uso de la TAT-Cre en otros modelos se vio que presentaba una alta penetrancia celular (*Sonsteng et al., 2014*), eso por esto que su uso en el útero no solo desencadenaba la delección génica en las células epiteliales, sino que, dependiendo de la manera de administración, también lo hacía en las células estromales y miometriales. En la actualidad no son muchos los modelos para el estudio de tumores sarcomas uterinos (*Hayashi et al., 2011; Hayashi and Faustman, 2002; Kun et al., 2020; Politi et al., 2004; Wild et al., 2012; Xing et al., 2009*), por lo que este nuevo modelo permitirá el estudio de la iniciación y progresión de este tipo de tumores que presentan mutaciones en *Pten* y *p53* (*Grossmann et al., 2012; Guijarro et al., 2013; Mäkinen et al., 2016; Pan et al., 2021; Schaefer et al., 2017*).

El modelo TAT-Cre, además presenta una ventaja a la hora de generar tumores uterinos, tanto de origen epitelial como mesenquimal, ya que permite elegir el momento y el tejido donde se da la ablación génica, hecho que como se explica en apartados anteriores y posteriores, en muchos de los modelos no es posible. Otro factor a tener en cuenta, es que este modelo evita el uso de virus portadores de la proteína Cre, como el Adenovirus-Cre (*Beauparlant et al., 2004*), para la generación de modelos murinos oncológicos de endometrio de manera temporal y espacial (*Cheng et al., 2014; Joshi and Ellenson, 2011; Saito et al., 2011; Tirodkar et al., 2014*), mejorando además notablemente la penetrancia de este modelo viral, y asimismo reduciendo al peligro y citotoxicidad del uso de este modelo (*Gagat et al., 2017*).

ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS ENDOMETRIALES CON MUTACIONES A LA CARTA GENERADAS *IN VIVO* DE MANERA ESPECÍFICA EN EL ENDOMETRIO CON EL SISTEMA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR/Cas9

Hasta la fecha, no existe ningún método para la ingeniería genómica *in vivo* de las células epiteliales del endometrio. Aquí, describimos un método fácil, rápido, flexible, multiplexable y robusto para la mimetización de CE utilizando la entrega *in vivo* de CRISPR/Cas9 por electroporación en el útero del ratón. Para validar este método de modelización de CE, nos dirigimos a *Pten*, el principal gen supresor de tumores implicado en el CE.

En el presente estudio, hemos utilizado la electroporación de las RNPs de Cas9 como método para la entrega *in vivo* de Cas9 y ARNg en la cavidad uterina del ratón. La entrega de complejos de Cas9 RNP ofrece algunas ventajas sobre el uso de plásmidos que codifican Cas9 y ARNg. En primer lugar, la RNP puede editar inmediatamente los genes diana sin necesidad de transcripción o traducción, lo que permite una rápida edición genómica tras su entrega intranuclear. En segundo lugar, la entrega de los complejos RNP de Cas9 es rápida y transitoria, lo que hace que las tasas de edición sean mayores y que se reduzcan los objetivos no deseados (*off-targets*), la mutagénesis por inserción y la toxicidad (Cho et al., 2014; S. Kim et al., 2014; Liang et al., 2015; Lin et al., 2014). El uso de estrategias basadas en el ADN para introducir la maquinaria de Cas9 en las células, ya sea por transfección transitoria o mediante el uso de virus, aumenta el riesgo de integración genómica accidental que conduce a la mutagénesis por inserción (Hanlon et al., 2019; C. L. Xu et al., 2019). En tercer lugar, la administración de Cas9 y ARNg basada en el ADN puede conducir a una expresión prolongada y descontrolada de Cas9 y ARN guía, lo que aumenta las posibilidades de efectos fuera de los objetivos y la interrupción de los genes endógenos (Bloomer et al., 2022; Bykonya et al., 2022). Por último, la introducción de secuencias de ADN exógenas puede potenciar la respuesta inmunitaria del huésped, lo que limita su uso para aplicaciones terapéuticas (Chew et al., 2016; Zhang, 2021). A pesar de las ventajas de la RNP Cas9, su administración *in vivo* sigue siendo un reto. La transfección directa de la RNP se ha logrado utilizando una amplia variedad de sistemas de entrega, como la microinyección, la transfección basada en lípidos, las nanopartículas, la electroporación y un largo etcétera de materiales y técnicas emergentes (Bloomer et al., 2022; Bykonya et al., 2022; Fajrial et al., 2020; Zhang, 2021; S. Zhang et al., 2020). Entre los métodos

físicos, la electroporación *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para la transfección de la RNP en líneas celulares, cultivos primarios o explantes, pero su uso *in vivo* (Y. Zhang *et al.*, 2021). Aunque la microinyección y la electroporación de RNP en embriones de ratón se han utilizado para generar eficientemente ratones *knock-out* y *knock-in* (Aida *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016), su uso para la entrega de RNP y la edición genómica de tejidos adultos apenas se ha utilizado. En cambio, la entrega sistémica de RNP mediante nanopartículas se ha utilizado recientemente para editar tejidos como el músculo, el cerebro, el hígado y los pulmones (Wei *et al.*, 2020). Recientemente, las estrategias basadas en lípidos (Noureddine *et al.*, 2020; Zuris *et al.*, 2015) o diferentes tipos de nanopartículas y vesículas, como las nanoláminas (Sun *et al.*, 2015), las nanopartículas carboladas (Rui *et al.*, 2019), nanopartículas de oro (K. Lee *et al.*, 2017), nanoláminas (Zhou *et al.*, 2018), vesículas extracelulares (Gee *et al.*, 2020) o vesículas de tipo VSV (Montagna *et al.*, 2018), se ha utilizado de forma eficiente para la modificación del genoma *in vivo*. Sin embargo, nunca se ha logrado la entrega precisa *in vivo* de RNP en el útero de ratones mediante ninguno de los métodos descritos. Este protocolo de electroporación proporciona un método *in situ* específico para la célula y controlable espacio-temporalmente para introducir mutaciones en las células epiteliales del endometrio, lo que es de importancia fundamental para el modelado preciso de la CE. Al inyectar los complejos RNP en la cavidad luminal uterina, la lámina epitelial luminal que cubre el endometrio del ratón queda expuesta a los complejos RNP y, por tanto, se facilita su transfección tras la electroporación. Cabe mencionar que los CE surgen del compartimento epitelial. A este respecto, son muchos los modelos transgénicos descritos en la literatura para el estudio y modelización del CE, y aunque de gran utilidad, a día de hoy no existe ningún modelo que permita la generación de la delección específica únicamente de las células epiteliales endometriales y que además esté regulado de manera temporal (Maru and Hippo, 2021). No solo esto, sino que únicamente existe un modelo que permite la delección espacial específica en las células epiteliales endometriales, que presenta el gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor *Spr2* y una secuencia bacteriana reguladora de este promotor (Cuevas *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). El resto de modelos, tanto condicionales temporales como espaciales, presentan ablaciones génicas en otros compartimento tanto uterinos como en órganos ajenos al sistema reproductivo femenino. Así, nuestro modelo de generación de modelos de ratones modificados genéticamente *in situ* en epitelio endometrial mediante electroporación *in vivo* de las RNP CRISPR, es el primero en ser descrito en conseguir la delección espacial y temporal para la mimetización del CE.

Si bien el sistema CRISPR/Cas9 ha sido utilizado ha sido con anterior trabajos para el estudio y caracterización del CE, todos ellos se basan en la entrega de los componentes CRISPR para la modificación génica o en líneas celulares de CE, como por ejemplo Ishikawa (Blanchard *et al.*, 2019;

Rodriguez et al., 2020; Tang et al., 2021; H. Wang et al., 2019), HEC-1A (Cai et al., 2019; Peng et al., 2021; Tahara et al., 2016), RUCA-1 (Zierau et al., 2018), ECC1 (Kavlashvili et al., 2016), K562 (C. G. Bailey et al., 2018), AN3CA (Tang et al., 2021), ARK1 (Urlick et al., 2021), ARK4 (Urlick et al., 2021), HEC-1B (Tahara et al., 2019; Urlick et al., 2021), JHUEM-1 (Urlick et al., 2021), HEC-108 (Tahara et al., 2019), HEC-50B (Urlick and Bell, 2018); en cultivos primarios de células endometriales de ratón (Megino-Luque et al., 2022) o en organoides (Chen et al., 2021). En este sentido, no existen modelos murinos para el estudio de CE que emplea el sistema CRISPR/Cas9 para la edición génica en el útero. Más aún, no solamente es el primer modelo de ratón descrito en utilizar la herramienta CRISPR/Cas9, sino que es el primero en emplear la RNP para la edición *in situ* en para el estudio de CE. En general, el sistema CRISPR ha sido utilizado para modelar *in vitro* (W. Zhang et al., 2020) e *in vivo* (Teng et al., 2021) otros tipos de cáncer ginecológicos (ovario, cérvix, trompas de Falopio), pero en ninguno se utilizó el complejo endonucleasa-ARN guía, sino que se empleaban otras estrategias de entrega como son por ejemplo los plásmidos.

En los últimos años, otra de las ventajas observadas del sistema CRISPR/Cas9 es su capacidad de hacer ingeniería genómica multiplexable, es decir, que permite la edición simultánea de más de un *locus* a la vez. Desde que en 2013 se demostró por primera vez la capacidad del sistema Cas9 para editar múltiples *loci* en células de mamífero (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013), numerosos estudios han demostrado la capacidad de multiplexación del sistema Cas9 (McCarty et al., 2020). En este trabajo mediante el uso de mezclas de RNP, hemos logrado la co-dirección de hasta dos *loci* diferentes (se ha logrado hasta tres *loci* a la vez, experimentos no mostrados en la tesis), lo que puede ser una herramienta valiosa para modelar el CE. Como la mayoría de las enfermedades malignas, el CE surge de la acumulación de mutaciones conductoras que confieren las características del fenotipo de las células cancerosas (Hanahan, 2022). La secuenciación del genoma completo ha desvelado o confirmado mutaciones previamente conocidas en el CE (Getz et al., 2013; Weinstein et al., 2013). Sin embargo, la validación funcional de las alteraciones identificadas como una mutación conductora en sí misma o en combinación con otras alteraciones sigue siendo un reto en la investigación del cáncer. El principal enfoque para la validación funcional de las alteraciones moleculares descubiertas por la secuenciación del genoma completo del cáncer es su recapitulación en modelos animales modificados genéticamente, especialmente en ratones. Tradicionalmente, la recapitulación del CE se ha realizado mediante modelos de ratones genéticamente embrionarios portadores de mutaciones en los genes candidatos. Dichos enfoques proporcionaban información inagotable sobre el papel de las alteraciones de los genes en el desarrollo y la progresión de la CE. Sin embargo, uno de los principales cuellos de botella de este enfoque es la generación de modelos de ratón portadores de mutaciones específicas del endometrio en más de un gen (es decir, *knock-outs* dobles o triples), lo que requiere la reproducción

de dos o más cruces de ratón genéticamente modificadas con ratones portadores de la recombinasa Cre específica del tejido. Estos procedimientos pueden llevar incluso años hasta alcanzar las combinaciones deseadas de alelos mutantes para estudiar su función en la CE. Nuestra ingeniería genómica *in vivo* mediada por CRISPR/Cas9 en el endometrio del ratón permite co-dirigir diferentes *loci* en un solo día, reduciendo drásticamente el tiempo para conocer la función de los genes editados en el CE. Otra ventaja es el control temporal de la edición del genoma. Todavía hay una cantidad limitada de ratones que expresan Cre y que permiten la recombinación específica e inducible en las células epiteliales del endometrio. Simplemente eligiendo la edad de los ratones que serán electroporados con los complejos Cas9 RNP, podemos inducir la edición del genoma en diferentes momentos de la vida del ratón. Dado que la incidencia de los cánceres aumenta drásticamente con la edad, esta característica resulta especialmente adecuada para la modelización del cáncer. Además del conocimiento de las funciones de los genes en la carcinogénesis, los modelos modificados genéticamente proporcionan una plataforma para las pruebas preclínicas de los medicamentos contra el cáncer. Así, la alteración de un solo gen o de una combinación de genes conductores puede generar nuevos modelos para probar la eficacia de las terapias dirigidas.

Un arma de doble filo, pero que, en el caso del cáncer, es beneficiosa, ya que a diferencia de la activación sistémica de Cre, que afecta uniformemente a todas las células que expresan activamente la recombinasa Cre en los tejidos, la electroporación puede crear un patrón de mosaico aleatorio de células normales y células que hayan adquirido una, o varias mutaciones dentro de un mismo epitelio. Este patrón de mosaico se asemeja más a la carcinogénesis humana, que se produce de forma esporádica y de forma localizada. Además, el alto nivel de flexibilidad en la elección de objetivos y áreas génicas será útil en el desarrollo de RMG para el EC, que es genéticamente muy heterogéneo, y muchos de los entresijos de su progresión tumoral aún son desconocidos (*Gatius et al., 2018; Mota et al., 2022*). Aprovechando esta condición podremos discernir entre que genes y que conjunto de alteraciones son los que hacen que el CE progrese. Por ejemplo, estudios similares han conseguido recapitular *in vivo* mediante infecciones víricas de los componentes CRISPR, otro tipo tumoral, el glioblastoma, y así identificar nuevos genes en el surgimiento y progreso de este tipo tumoral (*Chow et al., 2017*). En nuestro caso, por ejemplo, como se muestra en la figura 118, podremos generar una variedad de modelos de CE que presenten una heterogeneidad tumoral la cual podremos utilizar a nuestro favor a la hora de realizar ensayos farmacológicos (generación de resistencias a fármacos) o análisis de la progresión tumoral (mutaciones que incrementen la capacidad invasiva y metastásica de las células epiteliales).

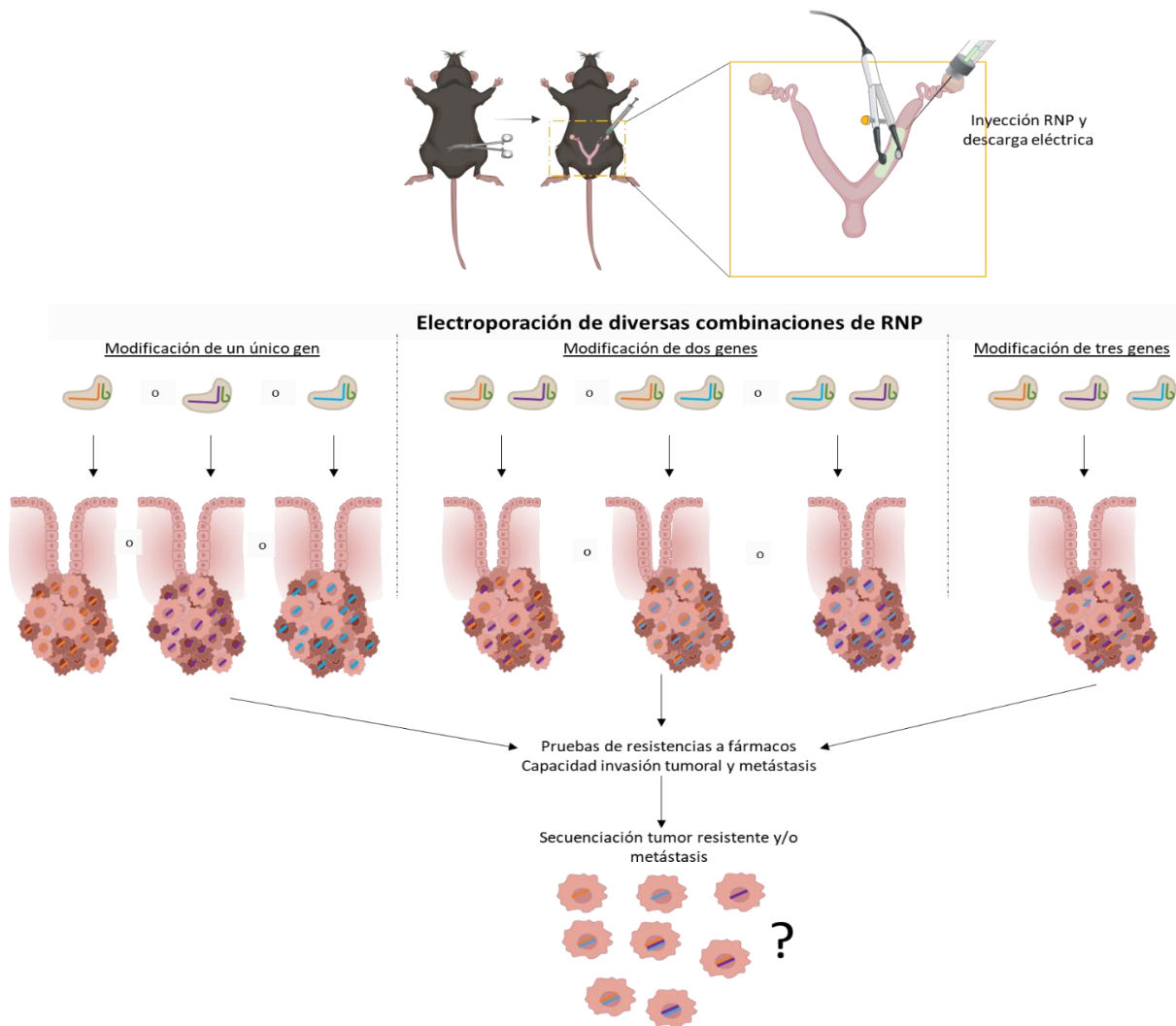


Figura 118. Esquema de posibles estrategias a seguir a partir del modelo murino modificado genéticamente *in situ* en epitelio endometrial mediante electroporación *in vivo* de las RNP CRISPR para el estudio de la carcinogénesis endometrial. Se pueden observar las estrategias resultantes de electroporar mezclas de RNP contra uno, dos o hasta 3 *loci*, donde surge CE con heterogeneidad intratumoral. Estos CE servirán por ejemplo para realizar pruebas de resistencia a fármacos y estudiar que mutaciones o conjuntos de alteraciones desencadenan un aumento o disminución de la carcinogénesis endometrial. Tras una secuenciación y análisis inmunohistológico, o del tumor resultante en el ensayo farmacológico, o de las células de las metástasis endometriales resultantes.

Finalmente, otro punto importante es la actividad informativa que proporciona el ratón fluorescente dual mT/mG. Al lograr la co-edición del gen de interés (como el *Pten*) y los sitios *loxP* del locus mT/mG, las células verdes fluorescentes portadoras de mutaciones en el gen de interés pueden ser fácilmente visualizadas y rastreadas mediante técnicas de microscopía fluorescente. Entre ellas, la microscopía fluorescente de lámina de luz (LSFM, *Light-Sheet Fluorescence Microscopy*), que es un sistema de imágenes ópticas para la obtención de imágenes volumétricas que abarca la biología celular, la embriología y las imágenes *in vivo*. La LSFM proporciona una alta resolución espacial tridimensional, una elevada relación señal/ruido, una rápida tasa de adquisición de imágenes y niveles minúsculos de efectos fototóxicos y de fotodaño (Chatterjee *et al.*, 2018). El método tradicional para el análisis histopatológico de las muestras implica un proceso tedioso y largo de deshidratación, inclusión en parafina, seccionamiento y tinción de las muestras. Tras este

proceso se obtiene un portaobjetos que contiene una sección (o unas cuantas secciones correspondientes a diferentes zonas) del tejido y se analiza microscópicamente. Debido a la heterogeneidad tumoral, las secciones observadas de una muestra pueden no ser representativas de toda la estructura y propiedades morfológicas del tumor y no es posible realizar una evaluación volumétrica y tridimensional del crecimiento tumoral. Las imágenes LSMF pueden adaptarse fácilmente y sustituir potencialmente los procedimientos histopatológicos convencionales (*Poola et al., 2019*). La técnica LSMF puede convertirse en una herramienta de imagen útil para abordar el crecimiento volumétrico tridimensional de los cánceres en modelos animales y biopsias humanas en un futuro próximo (*Glaser et al., 2017*). Las imágenes de LSMF proporcionan una visión tridimensional completa de tejidos enteros y son complementarias a los procedimientos histopatológicos convencionales, y en el caso de características distribuidas de forma no homogénea en el tejido, la LSMF puede llegar a ser esencial para caracterizarlo completamente. En este contexto, y como hemos demostrado, las imágenes de LSMF con técnicas de limpieza eficientes que preservan los niveles de emisión de las proteínas fluorescentes, pueden convertirse en una herramienta de imagen útil para abordar el crecimiento volumétrico tridimensional de los cánceres en modelos animales y biopsias humanas en un futuro próximo. Hemos obtenido imágenes volumétricas del endometrio de ratones reporteros mT/mG editados con el método de electroporación CRISPR/Cas9 *in vivo*, lo que indica que la LSMF puede ser una técnica de microscopía útil para analizar con precisión el crecimiento tumoral en una perspectiva tridimensional, permitiendo un modelado preciso y la evaluación de las características morfológicas del CE. Creemos que este método puede utilizarse ampliamente para el seguimiento del destino de las células editadas no sólo en la cavidad uterina, sino en otros tejidos en los que se pretende realizar la edición somática de CRISPR/Cas9. Este método abrirá la puerta a la interrogación de los genes conductores (*drivers*) candidatos en el CE.

En conclusión, el modelo murino CRISPR/Cas9 presentado en este trabajo, permitirá en un corto periodo de tiempo desenmascarar los procesos biológicos y moleculares que tienen lugar en la aparición y progresión del CE.



CONCLUSIONES

*"Cada día sabemos más y
entendemos menos"*

Albert Einstein

- **Primera**

La adición del péptido de penetración celular TAT a la Cre recombinasa causa su translocación a través de membranas en células vivas.

- **Segunda**

La administración de TAT-Cre *in situ* en los úteros murinos causa la ablación génica de genes flanqueados por sitios *loxP* en células epiteliales y mesenquimales *in vivo* e *in vitro*.

- **Tercera**

La doble delección de *Pten* y *p53* mediante TAT-Cre en las células mesenquimales uterinas provoca la aparición de sarcomas uterinos.

- **Cuarta**

La doble delección de *Pten* y *p53* mediante TAT-Cre en las células epiteliales uterinas desencadenan la aparición de carcinosarcomas endometriales invasivos y metastásicos.

- **Quinta**

La doble delección de *Pten* y *p53* provoca la transición epitelio-mesenquima en células epiteliales endometriales.

- **Sexta**

La electroporación *in vivo* es un sistema eficiente para la introducción del sistema CRISPR/Cas9, formado por la ribonucleoproteína Cas9 conjugada con los RNA híbridos tracrRNA:crRNA, en células epiteliales del endometrio.

- **Séptima**

La electroporación del sistema CRISPR/Cas9 permite la edición génica específicamente en células epiteliales del útero de una manera rápida, flexible, multiplexable y controlable en espacio y tiempo.

- **Octava**

El sistema CRISPR/Cas9 supone un nuevo modelo para el estudio del inicio, progresión y heterogeneidad tumoral del cáncer de endometrio.



BIBLIOGRAFÍA

"La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad"

Julio Verne

- Abal, M., Llauradà, M., Dolla, A., Monge, M., Colas, E., González, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Demajo, S., Castellví, J., García, A., Ramón y Cajal, S., Xercavins, J., Vázquez-Levin, M.H., Alameda, F., Gil-Moreno, A., Reventos, J., 2007. Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 272–277. <https://doi.org/10.1007/S12094-007-0054-Z>
- Abdulfatah, E., Lordello, L., Khurram, M., Van De Vijver, K., Alish, B., Bandyopadhyay, S., Oliva, E., Ali-Fehmi, R., 2019. Predictive Histologic Factors in Carcinosarcomas of the Uterus: A Multi-institutional Study. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 38, 205–215. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000497>
- Abeler, V.M., Røyne, O., Thoresen, S., Danielsen, H.E., Nesland, J.M., Kristensen, G.B., 2009. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology* 54, 355–364. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2559.2009.03231.X>
- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J.J., Verdine, V., Cox, D.B.T., Kellner, M.J., Regev, A., Lander, E.S., Voytas, D.F., Ting, A.Y., Zhang, F., 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550, 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Adamovic, T., Hamta, A., Roshani, L., Lü, X., Röhme, D., Helou, K., Klinga-Levan, K., Levan, G., 2008. Rearrangement and allelic imbalance on chromosome 5 leads to homozygous deletions in the CDKN2A/2B tumor suppressor gene region in rat endometrial cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 184, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.02.016>
- Adamson, D.J.A., Thompson, W.D., Dawson, A.A., Bennett, B., Haites, N.E., 1995. P53 mutation and expression in lymphoma. *Br. J. Cancer* 72, 150–154. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.292>
- Adli, M., 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
- Aghajanian, C., Filiaci, V., Dizon, D.S., Carlson, J.W., Powell, M.A., Secord, A.A., Tewari, K.S., Bender, D.P., O'Malley, D.M., Stuckey, A., Gao, J.J., Dao, F., Soslow, R.A., Lankes, H.A., Moore, K., Levine, D.A., 2018. A phase II study of frontline paclitaxel/carboplatin/bevacizumab, or paclitaxel/carboplatin/temsirolimus, or ixabepilone/carboplatin/bevacizumab in advanced/recurrent endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 150, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.05.018>
- Aghajanian, C., Sill, M.W., Darcy, K.M., Greer, B., McMeekin, D.S., Rose, P.G., Rotmensch, J., Barnes, M.N., Hanjani, P., Leslie, K.K., 2011. Phase II trial of bevacizumab in recurrent or persistent endometrial cancer: A gynecologic oncology group study. *J. Clin. Oncol.* 29, 2259–2265. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.6397>
- Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., Bulla, R., 2019. Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02387>
- Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K.F., Sakuma, T., Yamamoto, T., Tanaka, K., 2015. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0653-x>
- Ain, Q.U., Chung, J.Y., Kim, Y.H., 2015. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J. Control. Release* 205, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.036>
- Akbay, E.A., Contreras, C.M., Perera, S.A., Sullivan, J.P., Broaddus, R.R., Schorge, J.O., Ashfaq, R., Saboorian, H., Wong, K.K., Castrillon, D.H., 2008. Differential roles of telomere attrition in type I and II endometrial carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 173, 536–544. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071179>
- Akbay, E.A., Peña, C.G., Ruder, D., Michel, J.A., Nakada, Y., Pathak, S., Multani, A.S., Chang, S., Castrillon, D.H., 2013. Cooperation between p53 and the telomere-protecting shelterin component Pot1a in endometrial carcinogenesis. *Oncogene* 32, 2211–2219. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.232>
- Akimoto, J., Nakayama, M., Takagi, S., Okano, T., 2018. Improved in vivo subcutaneous tumor generation by cancer cell sheet transplantation. *Anticancer Res.* 38, 671–676. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12271>
- Al-Juboori, A.A.A., Ghosh, A., Jamaluddin, M.F. Bin, Kumar, M., Sahoo, S.S., Syed, S.M., Nahar, P., Tanwar, P.S., 2019. Proteomic Analysis of Stromal and Epithelial Cell Communications in Human Endometrial Cancer Using a Unique 3D Co-Culture Model. *Proteomics* 19. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201800448>

- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., Cohen, P., 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* 7, 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00122-9)
- Alimonti, A., Carracedo, A., Clohessy, J.G., Trotman, L.C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W.J., Brogi, E., Richardson, A.L., Zhang, J., Pandolfi, P.P., 2010. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 42, 454–458. <https://doi.org/10.1038/NG.556>
- Allo, G., Bernardini, M.Q., Wu, R.C., Shih, I.M., Kalloger, S., Pollett, A., Gilks, C.B., Clarke, B.A., 2014. ARID1A loss correlates with mismatch repair deficiency and intact p53 expression in high-grade endometrial carcinomas. *Mod. Pathol.* 27, 255–261. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.144>
- Alsaiairi, S.K., Patil, S., Alyami, M., Alamoudi, K.O., Aleisa, F.A., Merzaban, J.S., Li, M., Khashab, N.M., 2018. Endosomal Escape and Delivery of CRISPR/Cas9 Genome Editing Machinery Enabled by Nanoscale Zeolitic Imidazolate Framework. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 143–146. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11754>
- Alzamil, L., Nikolakopoulou, K., Turco, M.Y., 2021. Organoid systems to study the human female reproductive tract and pregnancy. *Cell Death Differ.* 28, 35–51. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0565-5>
- Amant, F., Cadron, I., Fuso, L., Berteloot, P., De Jonge, E., Jacomen, G., Van Robaey, J., Neven, P., Moerman, P., Vergote, I., 2005. Endometrial carcinosarcomas have a different prognosis and pattern of spread compared to high-risk epithelial endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 98, 274–280. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2005.04.027>
- Andjelković, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W., Hemmings, B.A., 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5699–5704. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.12.5699>
- Andjelkovic, T., Bankovic, J., Stojisic, J., Milinkovic, V., Podolski-Renic, A., Ruzdijic, S., Tanic, N., 2011. Coalterations of p53 and PTEN tumor suppressor genes in non-small cell lung carcinoma patients. *Transl. Res.* 157, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2010.09.004>
- Anisimov, V.N., Ukraintseva, S. V., Yashin, A.I., 2005. Cancer in rodents: Does it tell us about cancer in humans? *Nat. Rev. Cancer* 5, 807–819. <https://doi.org/10.1038/nrc1715>
- Anne Croy, Aureo Yamada, Francesco DeMayo, S. Lee Adamson The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy | ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/book/9780123944450/the-guide-to-investigation-of-mouse-pregnancy> (accessed 5.15.22).
- Aparicio, S., Hidalgo, M., Kung, A.L., 2015. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat. Rev. Cancer* 15, 311–316. <https://doi.org/10.1038/nrc3944>
- Arango, N.A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S.P., Lee, H.H., Orvis, G.D., Behringer, R.R., 2008. A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in Amhr2-lacZ mice. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1154–1162. <https://doi.org/10.1002/mrd.20858>
- Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., Mills, G., 2012. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest. Cancer Res.* 5, 19–27.
- Arora, E., Masab, M., Mittar, P., Jindal, V., Gupta, S., Dourado, C., 2018. Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced or Recurrent Endometrial Cancer. *Cureus* 10, e2521. <https://doi.org/10.7759/cureus.2521>
- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Ramsay Shaw, B., Juliano, R.L., 2002. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and Antennapedia cell-penetrating peptides: Effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.* 19, 744–754. <https://doi.org/10.1023/A:1016136328329>
- Augoff, K., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabola, R., 2020. Invadopodia: clearing the way for cancer cell invasion. *Ann. Transl. Med.* 8, 902–902. <https://doi.org/10.21037/ATM.2020.02.157>
- Bae, S., Park, J., Kim, J.S., 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473–1475. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU048>
- Bailey, C.G., Metierre, C., Feng, Y., Baidya, K., Filippova, G.N., Loukinov, D.I., Lobanenkova, V. V., Semaan, C., Rasko, J.E.J., 2018. CTCF expression is essential for somatic cell viability and

- protection against cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19123832>
- Bailey, M.H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M.C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P.K.S., Jeong, K.J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E.M., Mularoni, L., Rubio-Perez, C., Nagarajan, N., Cortés-Ciriano, I., Zhou, D.C., Liang, W.W., Hess, J.M., Yellapantula, V.D., Tamborero, D., Gonzalez-Perez, A., Suphavilai, C., Ko, J.Y., Khurana, E., Park, P.J., Van Allen, E.M., Liang, H., Caesar-Johnson, S.J., Demchok, J.A., Felau, I., Kasapi, M., Ferguson, M.L., Hutter, C.M., Sofia, H.J., Tarnuzzer, R., Yang, L., Zenklusen, J.C., Zhang, J. (Julia),..., 2018. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173, 371-385.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.060>
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Banno, K., Yanokura, M., Iida, M., Masuda, K., Aoki, D., 2014. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40, 1957–1967. <https://doi.org/10.1111/jog.12442>
- Bansal, N., Yendluri, V., Wenham, R.M., 2009. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* 16, 8–13. <https://doi.org/10.1177/107327480901600102>
- Bartosch, C., Monteiro-Reis, S., Vieira, R., Pereira, A., Rodrigues, M., Jerónimo, C., Lopes, J.M., 2015. Endometrial endometrioid carcinoma metastases show decreased ER-alpha and PR-A expression compared to matched primary tumors. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134969>
- Bartosch, C., Pires, M., Jerónimo, C., Lopes, J.M., 2017. The role of pathology in the management of patients with endometrial carcinoma. *Future Oncol.* 13, 1003–1020. <https://doi.org/10.2217/FON-2016-0570>
- Beauparlant, S.L., Read, P.W., Di Cristofano, A., 2004. In vivo adenovirus-mediated gene transduction into mouse endometrial glands: A novel tool to model endometrial cancer in the mouse. *Gynecol. Oncol.* 94, 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.06.008>
- Bechara, C., Sagan, S., 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587, 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>
- Bell, D.W., Ellenson, L.H., 2019. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 339–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043609>
- Bergadà, L., Sorolla, A., Yeramian, A., Eritja, N., Mirantes, C., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2013. Combination of Vorinostat and caspase-8 inhibition exhibits high anti-tumoral activity on endometrial cancer cells. *Mol. Oncol.* 7, 763–775. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.03.003>
- Berlose, J.P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., Chassaing, G., 1996. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* 242, 372–386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0372r.x>
- Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., McHenry, K.T., Pinchback, R.M., Ligon, A.H., Cho, Y.J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M.S., Weir, B.A., Tanaka, K.E., Chiang, D.Y., Bass, A.J., Loo, A., Hoffman, C., Prensner, J., Liefeld, T., Gao, Q., Yecies, D., Signoretti, S., Maher, E., Kaye, F.J., Sasaki, H., Tepper, J.E., Fletcher, J.A., Tabernero, J., Baselga, J., Tsao, M.S., Demicheli, F., Rubin, M.A., Janne, P.A., Daly, M.J., Nucera, C., Levine, R.L., Ebert, B.L., Gabriele, S., Rustgi, A.K., Antonescu, C.R., Ladanyi, M., Letai, A., Garraway, L.A., Loda, M., Beer, D.G., True, L.D., Okamoto, A., Pomeroy, S.L., Singer, S., Golub, T.R., Lander, E.S., Getz, G., Sellers, W.R., Meyerson, M., 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905. <https://doi.org/10.1038/NATURE08822>
- Bhatia, S.N., Ingber, D.E., 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 32, 760–772. <https://doi.org/10.1038/NBT.2989>
- Bhaya, D., Davison, M., Barrangou, R., 2011. CRISPR-cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L., 2004. Stromal

- fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Bhyan, S.B., Wee, Y.K., Liu, Y., Cummins, S., Zhao, M., 2019. Integrative analysis of common genes and driver mutations implicated in hormone stimulation for four cancers in women. *PeerJ* 7. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6872>
- Biagioni, A., Skalamera, I., Peri, S., Schiavone, N., Cianchi, F., Giommoni, E., Magnelli, L., Papucci, L., 2019. Update on gastric cancer treatments and gene therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 537–548. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09803-7>
- Bian, X., Gao, J., Luo, F., Rui, C., Zheng, T., Wang, D., Wang, Y., Roberts, T.M., Liu, P., Zhao, J.J., Cheng, H., 2018. PTEN deficiency sensitizes endometrioid endometrial cancer to compound PARP-PI3K inhibition but not PARP inhibition as monotherapy. *Oncogene* 37, 341–351. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.326>
- Bilichak, A., Sastry-Dent, L., Sriram, S., Simpson, M., Samuel, P., Webb, S., Jiang, F., Eudes, F., 2020. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes. *Plant Biotechnol. J.* 18, 1307–1316. <https://doi.org/10.1111/PBI.13296>
- Bivalkar-Mehla, S., Mehla, R., Chauhan, A., 2017. Chimeric peptide-mediated siRNA transduction to inhibit HIV-1 infection. *J. Drug Target.* 25, 307–319. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1245311>
- Black, D., Soslow, R.A., Levine, D.A., Tornos, C., Chen, S.C., Hummer, A.J., Bogomolny, F., Olvera, N., Barakat, R.R., Boyd, J., 2006. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 1745–1753. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.1574>
- Blanchard, Z., Vahrenkamp, J.M., Berrett, K.C., Arnesen, S., Gertz, J., 2019. Estrogen-independent molecular actions of mutant estrogen receptor 1 in endometrial cancer. *Genome Res.* 29, 1429–1441. <https://doi.org/10.1101/gr.244780.118>
- Bloomer, H., Khirallah, J., Li, Y., Xu, Q., 2022. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated genome and epigenome editing in mammalian cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 181. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114087>
- Bode, S.A., Thévenin, M., Bechara, C., Sagan, S., Lavielle, Sarah, Lavielle, Solange, Chassaing, G., Burlina, F., 2012. Self-assembling mini cell-penetrating peptides enter by both direct translocation and glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *Chem. Commun.* 48, 7179–7181. <https://doi.org/10.1039/c2cc33240j>
- Bokhman, J. V., 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 15, 10–17. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7)
- Bonneville, R., Krook, M.A., Kautto, E.A., Miya, J., Wing, M.R., Chen, H.-Z., Reeser, J.W., Yu, L., Roychowdhury, S., 2017. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis. Oncol.* 1–15. <https://doi.org/10.1200/po.17.00073>
- Boretto, M., Cox, B., Noben, M., Hendriks, N., Fassbender, A., Roose, H., Amant, F., Timmerman, D., Tomassetti, C., Vanhie, A., Meuleman, C., Ferrante, M., Vankelecom, H., 2017. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Dev.* 144, 1775–1786. <https://doi.org/10.1242/dev.148478>
- Boretto, M., Maenhoudt, N., Luo, X., Hennes, A., Boeckx, B., Bui, B., Heremans, R., Perneel, L., Kobayashi, H., Van Zundert, I., Brems, H., Cox, B., Ferrante, M., Uji-i, H., Koh, K.P., D’Hooghe, T., Vanhie, A., Vergote, I., Meuleman, C., Tomassetti, C., Lambrechts, D., Vriens, J., Timmerman, D., Vankelecom, H., 2019. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat. Cell Biol.* 21, 1041–1051. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0360-z>
- Borrelli, A., Tornesello, A.L., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., 2018. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23020295>
- Bosse, T., Ter Haar, N.T., Seeber, L.M., Diest, P.J.V., Hes, F.J., Vasen, H.F., Nout, R.A., Creutzberg, C.L., Morreau, H., Smit, V.T., 2013. Loss of ARID1A expression and its relationship with PI3K-Akt pathway alterations, TP53 and microsatellite instability in endometrial cancer 26, 1525–1535.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bredholt, G., Mannelqvist, M., Stefansson, I.M., Birkeland, E.,

- B, T.H., yan, A.M., Trovik, J., Kalland, K.H., Jonassen, I., Salvesen, H.B., Wik, E., Akhlen, L.A., 2015. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* 6, 39676–39691. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5344>
- Brognaard, J., Sierrecki, E., Gao, T., Newton, A.C., 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol. Cell* 25, 917–931. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.02.017>
- Brosh, R., Rotter, V., 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713. <https://doi.org/10.1038/NRC2693>
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuys, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E. V., Van Der Oost, J., 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* (80-). 321, 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Bruna, A., Rueda, O.M., Greenwood, W., Batra, A.S., Callari, M., Batra, R.N., Pogrebniak, K., Sandoval, J., Cassidy, J.W., Tufegdžic-Vidakovic, A., Sammut, S.J., Jones, L., Provenzano, E., Baird, R., Eirew, P., Hadfield, J., Eldridge, M., McLaren-Douglas, A., Barthorpe, A., Lightfoot, H., O'Connor, M.J., Gray, J., Cortes, J., Baselga, J., Marangoni, E., Welm, A.L., Aparicio, S., Serra, V., Garnett, M.J., Caldas, C., 2016. A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell* 167, 260–274.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.041>
- Buck, V.U., Kohlen, M.T., Sternberg, A.K., Rösing, B., Neulen, J., Leube, R.E., Classen-Linke, I., 2021. Steroid hormones and human chorionic gonadotropin influence the distribution of alpha6-integrin and desmoplakin 1 in gland-like endometrial epithelial spheroids. *Histochem. Cell Biol.* 155, 581–591. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01960-z>
- Burney, R.O., Giudice, L.C., 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 98, 511–519. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.06.029>
- Burr, M.L., Sparbier, C.E., Chan, K.L., Chan, Y.C., Kersbergen, A., Lam, E.Y.N., Azidis-Yates, E., Vassiliadis, D., Bell, C.C., Gilan, O., Jackson, S., Tan, L., Wong, S.Q., Hollizeck, S., Michalak, E.M., Siddle, H. V., McCabe, M.T., Prinjha, R.K., Guerra, G.R., Solomon, B.J., Sandhu, S., Dawson, S.J., Beavis, P.A., Tothill, R.W., Cullinane, C., Lehner, P.J., Sutherland, K.D., Dawson, M.A., 2019. An Evolutionarily Conserved Function of Polycomb Silences the MHC Class I Antigen Presentation Pathway and Enables Immune Evasion in Cancer. *Cancer Cell* 36, 385–401.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.008>
- Burr, M.L., Sparbier, C.E., Chan, Y.C., Williamson, J.C., Woods, K., Beavis, P.A., Lam, E.Y.N., Henderson, M.A., Bell, C.C., Stolzenburg, S., Gilan, O., Bloor, S., Noori, T., Morgens, D.W., Bassik, M.C., Neeson, P.J., Behren, A., Darcy, P.K., Dawson, S.J., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Cebon, J., Lehner, P.J., Dawson, M.A., 2017. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-Tumour immunity. *Nature* 549, 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature23643>
- Buza, N., Tavassoli, F.A., 2009. Comparative analysis of P16 and P53 expression in uterine malignant mixed müllerian tumors. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 28, 514–521. <https://doi.org/10.1097/PGP.0B013E3181A934E9>
- Bykonya, A.G., Lavrov, A. V., Smirnikhina, S.A., 2022. Methods for CRISPR-Cas as Ribonucleoprotein Complex Delivery In Vivo. *Mol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00479-z>
- Byrne, A.T., Alférez, D.G., Amant, F., Annibali, D., Arribas, J., Biankin, A. V., Bruna, A., Budinská, E., Caldas, C., Chang, D.K., Clarke, R.B., Clevers, H., Coukos, G., Dangles-Marie, V., Gail Eckhardt, S., Gonzalez-Suarez, E., Hermans, E., Hidalgo, M., Jarzabek, M.A., De Jong, S., Jonkers, J., Kemper, K., Lanfranccone, L., Mælandsmo, G.M., Marangoni, E., Marine, J.C., Medico, E., Norum, J.H., Palmer, H.G., Peeper, D.S., Pelicci, P.G., Piris-Gimenez, A., Roman-Roman, S., Rueda, O.M., Seoane, J., Serra, V., Soucek, L., Vanhecke, D., Villanueva, A., Vinolo, E., Bertotti, A., Trusolino, L., 2017. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat. Rev. Cancer* 17, 254–268. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.140>
- Byron, S.A., Gartside, M.G., Wellens, C.L., Mallon, M.A., Keenan, J.B., Powell, M.A., Goodfellow, P.J., Pollock, P.M., 2008. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer Res.* 68, 6902–6907. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0770>
- Cabrera, S., Llauradó, M., Castellví, J., Fernandez, Y., Alameda, F., Colás, E., Ruiz, A., Doll, A., Schwartz, S., Carreras, R., Xercavins, J., Abal, M., Gil-Moreno, A., Reventós, J., 2012. Generation and characterization of orthotopic murine models for endometrial cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 29, 217–227.

<https://doi.org/10.1007/s10585-011-9444-2>

Caduff, R.F., Johnston, C.M., Frank, T.S., 1995. Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am. J. Pathol.* 146, 182.

Caduff, R.F., Johnston, C.M., Svoboda-Newman, S.M., Poy, E.L., Merajver, S.D., Frank, T.S., 1996. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148, 1671.

Cai, J., Huang, S., Yi, Y., Bao, S., 2019. Ultrasound microbubble-mediated CRISPR/Cas9 knockout of C-erbB-2 in HEC-1A cells. *J. Int. Med. Res.* 47, 2199–2206. <https://doi.org/10.1177/0300060519840890>

Cantelmo, A.R., Cammarota, R., Noonan, D.M., Focaccetti, C., Comoglio, P.M., Prat, M., Albin, A., 2010. Cell delivery of Met docking site peptides inhibit angiogenesis and vascular tumor growth. *Oncogene* 29, 5286–5298. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.267>

Cao, Y., Ma, E., Cestellos-Blanco, S., Zhang, B., Qiu, R., Su, Y., Doudna, J.A., Yang, P., 2019. Nontoxic nanopore electroporation for effective intracellular delivery of biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 7899–7904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818553116>

Carver, B.S., Pandolfi, P.P., 2006. Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin. Cancer Res.* 12, 5305–5311. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0482>

Casas-Arozamena, C., Díaz, E., Moiola, C.P., Alonso-Alconada, L., Ferreirós, A., Abalo, A., Gil, C.L., Oltra, S.S., de Santiago, J., Cabrera, S., Sampayo, V., Bouso, M., Arias, E., Cueva, J., Colas, E., Vilar, A., Gil-Moreno, A., Abal, M., Moreno-Bueno, G., Muínelo-Romay, L., 2020. Genomic Profiling of Uterine Aspirates and cfDNA as an Integrative Liquid Biopsy Strategy in Endometrial Cancer. *J. Clin. Med.* 9. <https://doi.org/10.3390/jcm9020585>

Castilla, M.Á., Moreno-Bueno, G., Romero-Pérez, L., De Vijver, K. Van, Biscuola, M., López-García, M.Á., Prat, J., Matías-Guiu, X., Cano, A., Oliva, E., Palacios, J., Van De Vijver, K., Biscuola, M., López-García, M.Á., Prat, J., Matías-Guiu, X., Cano, A., Oliva, E., Palacios, J., 2011. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J. Pathol.* 223, 72–80.

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. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)90430-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)90430-0)

Chakraborty, S., Ji, H., Kabadi, A.M., Gersbach, C.A., Christoforou, N., Leong, K.W., 2014. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports* 3, 940–947. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.09.013>

Chang, Y.S., Huang, H. Da, Yeh, K.T., Chang, J.G., 2016. Genetic alterations in endometrial cancer by targeted next-generation sequencing. *Exp. Mol. Pathol.* 100, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.YEXMP.2015.11.026>

Chatterjee, K., Pratiwi, F.W., Wu, F.C.M., Chen, P., Chen, B.C., 2018. Recent Progress in Light Sheet Microscopy for Biological Applications. *Appl. Spectrosc.* 72, 1137–1169. <https://doi.org/10.1177/0003702818778851>

Chemerinski, A., Liu, C., Morelli, S.S., Babwah, A. V, Douglas, N.C., 2022. Mouse Cre drivers: Tools for studying disorders of the human female neuroendocrine-reproductive axis. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/biolre/iaoc012>

Chen, J., Zhao, L., Peng, H., Dai, S., Quan, Y., Wang, M., Wang, J., Bi, Z., Zheng, Y., Zhou, S., Liu, Y., Chen, C., Na, F., 2021. An organoid-based drug screening identified a menin-MLL inhibitor for endometrial cancer through regulating the HIF pathway. *Cancer Gene Ther.* 28, 112–125. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0190-y>

Chen, M., Wolfe, A., Wang, X., Chang, C., Yeh, S., Radovick, S., 2009. Generation and characterization of a complete null estrogen receptor α mouse using Cre/LoxP technology. *Mol. Cell. Biochem.* 321, 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9928-9>

Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., Lee, H., Zhang, F., Sharp, P.A., 2015. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* 160, 1246–1260. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.038>

Chen, S., Sun, S., Moonen, D., Lee, C., Lee, A.Y.F., Schaffer, D. V., He, L., 2019. CRISPR-READI: Efficient Generation of Knockin Mice by CRISPR RNP Electroporation and AAV Donor Infection. *Cell Rep.* 27, 3780–3789.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.103>

- Chen, Z., Jaafar, L., Agyekum, D.G., Xiao, H., Wade, M.F., Ileng Kumaran, R., Spector, D.L., Bao, G., Porteus, M.H., Dynan, W.S., Meiler, S.E., 2013. Receptor-mediated delivery of engineered nucleases for genome modification. *Nucleic Acids Res.* 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt710>
- Chen, Z.H., Zhu, M., Yang, J., Liang, H., He, J., He, S., Wang, P., Kang, X., McNutt, M.A., Yin, Y., Shen, W.H., 2014. PTEN interacts with histone H1 and controls chromatin condensation. *Cell Rep.* 8, 2003–2014. <https://doi.org/10.1016/j.CELREP.2014.08.008>
- Cheng, H., Liu, P., Zhang, F., Xu, E., Symonds, L., Ohlson, C.E., Bronson, R.T., Maira, S.M., Tomaso, E. Di, Li, J., Myers, A.P., Cantley, L.C., Mills, G.B., Zhao, J.J., 2014. A genetic mouse model of invasive endometrial cancer driven by concurrent loss of pten and Lkb1 is highly responsive to mTOR inhibition. *Cancer Res.* 74, 15–23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0544>
- Chew, W.L., Tabebordbar, M., Cheng, J.K.W., Mali, P., Wu, E.Y., Ng, A.H.M., Zhu, K., Wagers, A.J., Church, G.M., 2016. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat. Methods* 13, 868–874. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3993>
- Chi, D.S., Berchuck Andrew, Dizon, D.S., Yashar, C.M., 2017. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology* - Google Libros.
- Chiou, S.H., Winters, I.P., Wang, J., Naranjo, S., Dudgeon, C., Tamburini, F.B., Brady, J.J., Yang, D., Grüner, B.M., Chuang, C.H., Caswell, D.R., Zeng, H., Chu, P., Kim, G.E., Carpizo, D.R., Kim, S.K., Winslow, M.M., 2015. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. *Genes Dev.* 29, 1576–1585. <https://doi.org/10.1101/gad.264861.115>
- Chitcholtan, K., Asselin, E., Parent, S., Sykes, P.H., Evans, J.J., 2013. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer 319, 75–87.
- Chiyoda, T., Tsuda, H., Tanaka, H., Kataoka, F., Nomura, H., Nishimura, S., Takano, M., Susumu, N., Saya, H., Aoki, D., 2012. Expression profiles of carcinosarcoma of the uterine corpus—are these similar to carcinoma or sarcoma? 51, 229–239.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.S., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 230–232. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., Kim, J.S., 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Chow, R.D., Chen, S., 2018. Cancer CRISPR Screens In Vivo. *Trends in Cancer* 4, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.03.002>
- Chow, R.D., Guzman, C.D., Wang, G., Schmidt, F., Youngblood, M.W., Ye, L., Errami, Y., Dong, M.B., Martinez, M.A., Zhang, S., Renauer, P., Bilguvar, K., Gunel, M., Sharp, P.A., Zhang, F., Platt, R.J., Chen, S., 2017. AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat. Neurosci.* 20, 1329–1341. <https://doi.org/10.1038/nn.4620>
- Chung, E.J., Lee, H.K., Jung, S.A., Lee, S.J., Chee, H.Y., Sohn, Y.H., Lee, J.H., 2012. Transduction of PTEN proteins using the tat domain modulates TGF- β 1-mediated signaling pathways and transdifferentiation in subconjunctival fibroblasts. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 379–386. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8491>
- Cleal, K., He, L., D. Watson, P., T. Jones, A., 2013. Endocytosis, intracellular traffic and fate of cell penetrating peptide based conjugates and nanoparticles. *Curr. Pharm. Des.* 19, 2878–2894. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990297>
- Clement, K., Rees, H., Canver, M.C., Gehrke, J.M., Farouni, R., Hsu, J.Y., Cole, M.A., Liu, D.R., Joung, J.K., Bauer, D.E., Pinello, L., 2019. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat. Biotechnol.* 37, 224–226. <https://doi.org/10.1038/S41587-019-0032-3>
- Colas, E., Pedrola, N., Devis, L., Ertekin, T., Campoy, I., Martínez, E., Llauro, M., Rigau, M., Olivan, M., Garcia, M., Cabrera, S., Gil-Moreno, A., Xercavins, J., Castellvi, J., Garcia, A., Santiago Ramon Y Cajal, S., Moreno-Bueno, G., Dolcet, X., Alameda, F., Palacios, J., Prat, J., Doll, A., Matias-Guiu, X., Abal, M., Reventos, J., 2012. The EMT signaling pathways in endometrial carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* 14, 715–720. <https://doi.org/10.1007/S12094-012-0866-3>
- Concin, N., Matias-Guiu, X., Vergote, I., Cibula, D., Mirza, M.R., Marnitz, S., Ledermann, J., Bosse, T., Chagari, C., Fagotti, A., Fotopoulou, C., Martin, A.G., Lax, S., Lorusso, D., Marth, C., Morice, P., Nout, R.A., O'Donnell, D., Querleu, D., Raspollini, M.R., Sehouli, J., Sturdza, A., Taylor, A., Westermann, A.,

- Wimberger, P., Colombo, N., Planchamp, F., Creutzberg, C.L., 2021. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Radiother. Oncol.* 154, 327–353. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.11.018>
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* (80-). 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Cong, L., Zhang, F., 2015. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol. Biol.* 1239, 197–217. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10
- Conklin, C.M.J., Longacre, T.A., 2014. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification 21, 383–393. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000046>
- Contreras, C.M., Akbay, E.A., Gallardo, T.D., Haynie, J.M., Sharma, S., Tagao, O., Bardeesy, N., Takahashi, M., Settleman, J., Wong, K.K., Castrillon, D.H., 2010. Lkb1 inactivation is sufficient to drive endometrial cancers that are aggressive yet highly responsive to mTOR inhibitor monotherapy. *DMM Dis. Model. Mech.* 3, 181–193. <https://doi.org/10.1242/dmm.004440>
- Cook, N., Jodrell, D.I., Tuveson, D.A., 2012. Predictive in vivo animal models and translation to clinical trials. *Drug Discov. Today* 17, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.02.003>
- Cotzia, P., Benayed, R., Mullaney, K., Oliva, E., Felix, A., Ferreira, J., Soslow, R.A., Antonescu, C.R., Ladanyi, M., Chiang, S., 2019. Undifferentiated Uterine Sarcomas Represent Under-Recognized High-grade Endometrial Stromal Sarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 43, 662–669. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001215>
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B., Engelman, J.A., 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1075–1083. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.3641>
- Crombez, L., Morris, M.C., Dufort, S., Aldrian-Herrada, G., Nguyen, Q., Mc Master, G., Coll, J.L., Heitz, F., Divita, G., 2009. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res.* 37, 4559–4569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp451>
- Crowet, J.M., Lins, L., Deshayes, S., Divita, G., Morris, M., Brasseur, R., Thomas, A., 2013. Modeling of non-covalent complexes of the cell-penetrating peptide CADY and its siRNA cargo. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1828, 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.09.006>
- Cuevas, I.C., Sahoo, S.S., Kumar, A., Zhang, H., Westcott, J., Aguilar, M., Cortez, J.D., Sullivan, S.A., Xing, C., Neil Hayes, D., Brekken, R.A., Bae-Jump, V.L., Castrillon, D.H., 2019. Fbxw7 is a driver of uterine carcinosarcoma by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 25880–25890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911310116>
- D'Andrilli, G., Bovicelli, A., Paggi, M.G., Giordano, A., 2012. New insights in endometrial carcinogenesis. *J. Cell. Physiol.* 227, 2842–2846. <https://doi.org/10.1002/JCP.24016>
- D'Angelo, E., Prat, J., 2010. Uterine sarcomas: a review 116, 131–139.
- Dadgar, N., Gonzalez-Suarez, A.M., Fattahi, P., Hou, X., Weroha, J.S., Gaspar-Maia, A., Stybayeva, G., Revzin, A., 2020. A microfluidic platform for cultivating ovarian cancer spheroids and testing their responses to chemotherapies. *Microsystems Nanoeng.* 6, 93. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00201-6>
- Dahia, P.L.M., Fitzgerald, M.G., Zhang, X., Marsh, D.J., Zheng, Z., Pietsch, T., Von Deimling, A., Haluska, F.G., Haber, D.A., Eng, C., 1998. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene* 16, 2403–2406. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201762>
- Daikoku, T., Hirota, Y., Tranguch, S., Joshi, A.R., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Ellenson, L.H., Dey, S.H.K., 2008. Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res.* 68, 5619–5627. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1274>
- Daikoku, T., Jackson, L., Besnard, V., Whitsett, J., Ellenson, L.H., Dey, S.K., 2011. Cell-specific conditional deletion of Pten in the uterus results in differential phenotypes. *Gynecol. Oncol.* 122, 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.04.022>
- Daikoku, T., Ogawa, Y., Terakawa, J., Ogawa, A., DeFalco, T., Dey, S.K., 2014. Lactoferrin-iCre: A new mouse line to study uterine epithelial gene function. *Endocrinology* 155, 2718–2724. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1265>
- Daikoku, T., Yoshie, M., Xie, H., Sun, X., Cha, J., Ellenson, L.H., Dey, S.K., 2013. Conditional deletion of Tsc1 in the female reproductive tract impedes normal oviductal and uterine

- function by enhancing mTORC1 signaling in mice. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 463–472. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat016>
- Datlinger, P., Rendeiro, A.F., Schmidl, C., Krausgruber, T., Traxler, P., Klughammer, J., Schuster, L.C., Kuchler, A., Alpar, D., Bock, C., 2017. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat. Methods* 14, 297–301. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4177>
- Davidson, T.J., Harel, S., Arboleda, V.A., Prunell, G.F., Shelanski, M.L., Greene, L.A., Troy, C.M., 2004. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces microRNA-like effects before mRNA degradation. *J. Neurosci.* 24, 10040–10046. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3643-04.2004>
- de Buhr, H., Lebbink, R.J., 2018. Harnessing CRISPR to combat human viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 54, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.002>
- De Coupade, C., Fittipaldi, A., Chagnas, V., Michel, M., Carlier, S., Tasciotti, E., Darmon, A., Ravel, D., Kearsley, J., Giacca, M., Cailler, F., 2005. Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules. *Biochem. J.* 390, 407–418. <https://doi.org/10.1042/BJ20050401>
- De Jong, R.A., Nijman, H.W., Wijbrandi, T.F., Reyners, A.K.L., Boezen, H.M., Hollema, H., 2011. Molecular markers and clinical behavior of uterine carcinosarcomas: focus on the epithelial tumor component. *Mod. Pathol.* 24, 1368–1379. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2011.88>
- De Nola, R., Menga, A., Castegna, A., Loizzi, V., Ranieri, G., Cicinelli, E., Cormio, G., 2019. The crowded crosstalk between cancer cells and stromal microenvironment in gynecological malignancies: Biological pathways and therapeutic implication. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20102401>
- Dedes, K.J., Wetterskog, D., Ashworth, A., Kaye, S.B., Reis-Filho, J.S., 2011. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 261–271. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2010.216>
- Deerberg, F., Rehm, S., Pittermann, W., 1981. Uncommon Frequency of Adenocarcinomas of the Uterus in Virgin Han: Wistar Rats. *Vet. Pathol.* 18, 707–713. <https://doi.org/10.1177/030098588101800601>
- Dekkers, J.F., Whittle, J.R., Vaillant, F., Chen, H.R., Dawson, C., Liu, K., Geurts, M.H., Herold, M.J., Clevers, H., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., 2020. Modeling Breast Cancer Using CRISPR-Cas9-Mediated Engineering of Human Breast Organoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 112, 540–544. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz196>
- Deligdisch-Schor, L., Mareş Miceli, A., 2020. Hormonal Biophysiology of the Uterus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1242, 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_1
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Deng, C.X., 2014. Conditional knockout mouse models of cancer. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 1217–1233. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074393>
- Depreeuw, J., Hermans, E., Schrauwen, S., Annibali, D., Coenegrachts, L., Thomas, D., Luyckx, M., Gutierrez-Roelens, I., Debruyne, D., Konings, K., Moerman, P., Vergote, I., Lambrechts, D., Amant, F., 2015. Characterization of patient-derived tumor xenograft models of endometrial cancer for preclinical evaluation of targeted therapies. *Gynecol. Oncol.* 139, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.07.104>
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1996. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188–18193. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18188>
- Derossi, D., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1998. Trojan peptides: The penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8, 84–87. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)80017-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)80017-2)
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34080-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34080-2)
- Deshayes, S., Plénat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C., Heitz, F., 2004. Primary amphipathic cell-penetrating peptides: Structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry* 43, 7698–7706. <https://doi.org/10.1021/bi049298m>

- Devaney, K., Tavassoli, F.A., 1991. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the interpretation of unusual mesenchymal tumors of the uterus. *Mod. Pathol.* 4, 225–231.
- Di Cristofano, A., Ellenson, L.H., 2007. Endometrial carcinoma. *Annu. Rev. Pathol.* 2, 57–85. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHOL.2.010506.091905>
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 1998. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* 19, 348–355. <https://doi.org/10.1038/1235>
- Diel, P., Smolnikar, K., Schulz, T., Laudenschlager, U., Michna, H., Vollmer, G., 2001. Phytoestrogens and carcinogenesis - Differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum. Reprod.* 16, 997–1006. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.997>
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K.M., Ng, S.L., Gosis, B.S., Regan, S.N., Cowan, C.A., Rader, D.J., Musunuru, K., 2014. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* 115, 488–492. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304351>
- Dixit, A., Parnas, O., Li, B., Chen, J., Fulco, C.P., Jerby-Arnon, L., Marjanovic, D., Dionne, D., Burks, T., Raychowdhury, R., Adamson, B., Norman, T.M., Lander, E.S., Weissman, J.S., Friedman, N., Regev, A., 2016. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell* 167, 1853–1866.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.038>
- Dotz, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Ziegler, W., Becker, K., 2007. Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth1036>
- Doench, J.G., 2018. Am i ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* 19, 67–80. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.97>
- Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J., Root, D.E., 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34, 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., Pallares, J., Cabero, A., Schoenenberger, J.A., Comella, J.X., Matias-Guiu, X., 2006. Proteasome inhibitors induce death but activate NF- κ B on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J. Biol. Chem.* 281, 22118–22130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601350200>
- Donehower, L.A., Harvey, M., Vogel, H., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Park, S.H., Thompson, T., Ford, R.J., Bradley, A., 1995. Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol. Carcinog.* 14, 16–22. <https://doi.org/10.1002/mc.2940140105>
- Donovan, K.F., Hegde, M., Sullender, M., Vaimberg, E.W., Johannessen, C.M., Root, D.E., Doench, J.G., 2017. Creation of novel protein variants with CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis: Turning a screening by-product into a discovery tool. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170445>
- Dorà, N.J., Collinson, J.M., Hill, R.E., West, J.D., 2014. Hemizygous Le-Cre transgenic mice have severe eye abnormalities on some genetic backgrounds in the absence of LoxP Sites. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109193>
- Dosil, M.A., Mirantes, C., Eritja, N., Felip, I., Navaridas, R., Gatus, S., Santacana, M., Colàs, E., Moiola, C., Schoenenberger, J.A., Encinas, M., Garí, E., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2017. Palbociclib has antitumour effects on Pten-deficient endometrial neoplasias 242, 152–164.
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-.). 346. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dow, L.E., Fisher, J., O'Rourke, K.P., Muley, A., Kasthuber, E.R., Livshits, G., Tschaharganeh, D.F., Socci, Lowe, S.W., 2015. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 33, 390–394. <https://doi.org/10.1038/nbt.3155>
- Drost, J., Van Boxtel, R., Blokzijl, F., Mizutani, T., Sasaki, N., Sasselli, V., De Ligt, J., Behjati, S., Grolleman, J.E., Van Wezel, T., Nik-Zainal, S., Kuiper, R.P., Cuppen, E., Clevers, H., 2017. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science* (80-.). 358, 234–238. <https://doi.org/10.1126/science.aao3130>

- Drost, J., Van Jaarsveld, R.H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., Van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R.M., Offerhaus, G.J., Begthel, H., Korving, J., Van De Wetering, M., Schwank, G., Logtenberg, M., Cuppen, E., Snippert, H.J., Medema, J.P., Kops, G.J.P.L., Clevers, H., 2015. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* 521, 43–47. <https://doi.org/10.1038/nature14415>
- Duan, Z., Chen, C., Qin, J., Liu, Q., Wang, Q., Xu, X., Wang, J., 2017. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer. *Drug Deliv.* 24, 752–764. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1321060>
- Duggan, B.D., Felix, J.C., Munderspach, 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.
- Dutta, D., Donaldson, J.G., 2012. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell. Logist.* 2, 203–208.
- El-Andaloussi, S., Holm, T., Langel, U., 2005. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3597–611. <https://doi.org/10.2174/138161205774580796>
- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16, 551–558. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02139-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02139-9)
- Elliott, G., O'Hare, P., 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223–233. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81843-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81843-7)
- Elmqvist, A., Langel, Ü., 2003. In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog. *Biol. Chem.* 384, 387–393. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.044>
- Emons, G., Mustea, A., Tempfer, C., 2020. Tamoxifen and Endometrial Cancer: A Janus-Headed Drug. *Cancers (Basel)*. 12, 1–11. <https://doi.org/10.3390/cancers12092535>
- Encyclopedia, C.C.L. Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) [WWW Document]. URL <https://sites.broadinstitute.org/ccle/> (accessed 5.15.22).
- Engelman, J.A., 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* 9, 550–562. <https://doi.org/10.1038/NRC2664>
- Engelsen, I.B., Akslen, L.A., Salvesen, H.B., 2009. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS* 117, 693–707. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.2009.02467.X>
- Eoh, J., Gu, L., 2019. Biomaterials as vectors for the delivery of CRISPR-Cas9. *Biomater. Sci.* 7, 1240–1261. <https://doi.org/10.1039/c8bm01310a>
- Eritja, Núria, Chen, B.J., Rodríguez-Barrueco, R., Santacana, M., Gatus, S., Vidal, A., Martí, M.D., Ponce, J., Bergadà, L., Yeramian, A., Encinas, M., Ribera, J., Reventós, J., Boyd, J., Villanueva, A., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., Llobet-Navàs, D., 2017. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer. *Autophagy* 13, 608–624. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1271512>
- Eritja, Nuria, Felip, I., Dosil, M.A., Vigezzi, L., Mirantes, C., Yeramian, A., Navaridas, R., Santacana, M., Llobet-Navas, D., Yoshimura, A., Nomura, M., Encinas, M., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2017. A Smad3-PTEN regulatory loop controls proliferation and apoptotic responses to TGF- β in mouse endometrium. *Cell Death Differ.* 24, 1443–1458. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.73>
- Eritja, N., Llobet, D., Domingo, M., Santacana, M., Yeramian, A., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2010. A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 176, 2722–2731. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.090974>
- Eritja, N., Santacana, M., Maiques, O., Gonzalez-Tallada, X., Dolcet, X., Matias-Guiu, X., 2015. Modeling glands with PTEN deficient cells and microscopic methods for assessing PTEN loss: endometrial cancer as a model. *Methods* 77–78, 31–40. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.11.001>
- Esteller, M., García, A., Martínez-Palones, J.M., Xercavins, J., Reventós, J., 1997. The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur. J. Cancer* 33, 1572–1577. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00154-8)
- 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. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1202178>
- Euscher, E.D., Bassett, R., Duose, D.Y., Lan, C., Wistuba, I., Ramondetta, L., Ramalingam, P., Malpica, A., 2020.

- Mesonephric-like Carcinoma of the Endometrium: A Subset of Endometrial Carcinoma With an Aggressive Behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* 44, 429–443. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001401>
- Evans, H.L., 1982. Endometrial stromal sarcoma and poorly differentiated endometrial sarcoma. *Cancer* 50, 2170–2182. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19821115\)50:10<2170::AID-CNCR2820501033>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19821115)50:10<2170::AID-CNCR2820501033>3.0.CO;2-K)
- Ewart, D.T., Peterson, E.J., Steer, C.J., 2019. Gene editing for inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 6–15. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213454>
- Fader, A.N., Roque, D.M., Siegel, E., Buza, N., Hui, P., Abdelghany, O., Chambers, S.K., Secord, A.A., Havrilesky, L., O'Malley, D.M., Backes, F., Nevadunsky, N., Edraki, B., Pikaart, D., Lowery, W., El Sahwi, K.S., Celano, P., Bellone, S., Azodi, M., Litkouhi, B., Ratner, E., Silasi, D.A., Schwartz, P.E., Santin, A.D., 2018. Randomized Phase II trial of carboplatin-paclitaxel versus carboplatin-paclitaxel-trastuzumab in uterine serous carcinomas that overexpress human epidermal growth factor receptor 2/neu. *J. Clin. Oncol.* 36, 2044–2051. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.5966>
- Fajrial, A.K., He, Q.Q., Wirusanti, N.I., Slansky, J.E., Ding, X., 2020. A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics* 10, 5532–5549. <https://doi.org/10.7150/thno.43465>
- Falato, L., Vunk, B., Langel, Ü., 2022. CRISPR/Cas9 Plasmid Delivery Through the CPP: PepFect14. *Methods Mol. Biol.* 2383, 587–593. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_38
- Farooq, A., Walker, L.J., Bowling, J., Audisio, R.A., 2010. Cowden syndrome. *Cancer Treat. Rev.* 36, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.04.002>
- Fasciani, A., Bocci, G., Xu, J., Bielecki, R., Greenblatt, E., Leyland, N., Casper, R.F., 2003. Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stages of endometriosis. *Fertil. Steril.* 80, 1137–1143. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)02164-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)02164-2)
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., Lemeur, M., Metzger, D., Chambon, P., 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10887–10890. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10887>
- Fellmann, C., Gowen, B.G., Lin, P.C., Doudna, J.A., Corn, J.E., 2017. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 89–100. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.238>
- Ferguson, S.E., Tornos, C., Hummer, A., Barakat, R.R., Soslow, R.A., 2007. Prognostic features of surgical stage I uterine carcinosarcoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 1653–1661. <https://doi.org/10.1097/PAS.0B013E3181161BA3>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fleming, G.F., Sill, M.W., Darcy, K.M., McMeekin, D.S., Thigpen, J.T., Adler, L.M., Berek, J.S., Chapman, J.A., DiSilvestro, P.A., Horowitz, I.R., Fiorica, J. V., 2010. Phase II trial of trastuzumab in women with advanced or recurrent, HER2-positive endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 116, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.025>
- Fowler, K.J., Hudson, D.F., Salamonsen, L.A., Edmondson, S.R., Earle, E., Sibson, M.C., Choo, K.H.A., 2000. Uterine dysfunction and genetic modifiers in centromere protein B-deficient mice. *Genome Res.* 10, 30–41.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O., 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2)
- Franquemont, D.W., Frierson, H.F., Mills, S.E., 1991. An immunohistochemical study of normal endometrial stroma and endometrial stromal neoplasms: Evidence for smooth muscle differentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* 15, 861–870. <https://doi.org/10.1097/0000478-199109000-00006>
- Freeman, D., Lesche, R., Kertesz, N., Wang, S., Li, G., Gao, J., Groszer, M., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Thomas, G., Liu, X., Wu, H., 2006. Genetic background controls tumor development in Pten-deficient mice. *Cancer Res.* 66, 6492–6496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4143>
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., Liu, X., Wu, H., 2003. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 3, 117–130.

[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00021-7)

Frew, I.J., Minola, A., Georgiev, S., Hitz, M., Moch, H., Richard, S., Vortmeyer, A.O., Krek, W., 2008. Combined Vhlh and Pten Mutation Causes Genital Tract Cystadenoma and Squamous Metaplasia. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4536–4548. <https://doi.org/10.1128/mcb.02132-07>

Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiácovo, M.P., Church, G.M., Calarco, J.A., 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* 10, 741–743. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2532>

Frock, R.L., Hu, J., Meyers, R.M., Ho, Y.J., Kii, E., Alt, F.W., 2015. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat. Biotechnol.* 33, 179–188. <https://doi.org/10.1038/nbt.3101>

Fu, D.J., de Micheli, A.J., Bidarimath, M., Ellenson, L.H., Cosgrove, B.D., Flesken-Nikitin, A., Nikitin, A.Y., 2020. Cells expressing PAX8 are the main source of homeostatic regeneration of adult mouse endometrial epithelium and give rise to serous endometrial carcinoma. *DMM Dis. Model. Mech.* 13. <https://doi.org/10.1242/dmm.047035>

Fu, T.K., Kuo, P.H., Lu, Y.C., Lin, H.N., Wang, L.H.C., Lin, Y.C., Kao, Y.C., Lai, H.M., Chang, M.D.T., 2020. Cell penetrating peptide as a high safety anti-inflammation ingredient for cosmetic applications. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10010101>

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., Sander, J.D., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>

Gagat, M., Zielińska, W., Grzanka, A., 2017. Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review) 40, 1615–1623.

Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S.J., Barbas, C.F., 2012. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods* 9, 805–807. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2030>

Gao, H., Korn, J.M., Ferretti, S., Monahan, J.E., Wang, Y., Singh, M., Zhang, C., Schnell, C., Yang, G., Zhang, Y., Balbin, O.A., Barbe, S., Cai, H., Casey, F., Chatterjee, S., Chiang, D.Y., Chuai, S., Cogan, S.M., Collins, S.D., Dammassa, E., Ebel, N., Embry, M., Green, J., Kauffmann, A., Kowal, C., Leary, R.J., Lehar, J., Liang, Y., Loo, A., Lorenzana, E., Robert McDonald, E., McLaughlin, M.E., Merkin, J., Meyer, R., Naylor, T.L., Patawaran, M., Reddy, A., Röelli, C., Ruddy, D.A., Salangsang, F., Santacroce, F., Singh, A.P., Tang, Y., Tinetto, W., Tobler, S., Velazquez, R., Venkatesan, K., Von Arx, F., Wang, H.Q., Wang, Z., Wiesmann, M., Wyss, D., Xu, F., Bitter, H., Atadja, P., Lees, E., Hofmann, F., Li, E., Keen, N., Cozens, R., Jensen, M.R., Pryer, N.K., Williams, J.A., Sellers, W.R., 2015. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat. Med.* 21, 1318–1325. <https://doi.org/10.1038/nm.3954>

Gao, M., Fan, F., Li, D., Yu, Y., Mao, K., Sun, T., Qian, H., Tao, W., Yang, X., 2017. Tumor acidity-activatable TAT targeted nanomedicine for enlarged fluorescence/magnetic resonance imaging-guided photodynamic therapy. *Biomaterials* 133, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.013>

Gao, Q., Dong, X., Xu, Q., Zhu, L., Wang, F., Hou, Y., Chao, C. chi, 2019. Therapeutic potential of CRISPR/Cas9 gene editing in engineered T-cell therapy. *Cancer Med.* 8, 4254–4264. <https://doi.org/10.1002/cam4.2257>

Gao, Y., Lin, P., Lydon, J.P., Li, Q., 2017. Conditional abrogation of transforming growth factor- β receptor 1 in PTEN-inactivated endometrium promotes endometrial cancer progression in mice. *J. Pathol.* 243, 89–99. <https://doi.org/10.1002/path.4930>

Garneau, J.E., Dupuis, M.È., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H., Moineau, S., 2010. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksny, V., 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>

Gatcliffe, T.A., Monk, B.J., Planutis, K., Holcombe, R.F., 2008. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int. J. Gynecol. Cancer* 18, 954–962. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01127.x>

- Gatius, S., Cuevas, D., Fernández, C., Roman-Canal, B., Adamoli, V., Piulats, J.M., Eritja, N., Martin-Satue, M., Moreno-Bueno, G., Matias-Guiu, X., 2018. Tumor Heterogeneity in Endometrial Carcinoma: Practical Consequences. *Pathobiology* 85, 35–40. <https://doi.org/10.1159/000475529>
- Gatius, S., Velasco, A., Azueta, A., Santacana, M., Pallares, J., Valls, J., Dolcet, X., Prat, J., Matias-Guiu, X., 2011. FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. *Mod. Pathol.* 24, 1500–1510. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2011.110>
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., Liu, D.R., 2017. Programmable base editing of T to G in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Gayraud, F., Klußmann, M., Neundorf, I., 2021. Recent advances and trends in chemical cpp–drug conjugation techniques. *Molecules* 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26061591>
- Gee, P., Lung, M.S.Y., Okuzaki, Y., Sasakawa, N., Iguchi, T., Makita, Y., Hozumi, H., Miura, Y., Yang, L.F., Iwasaki, M., Wang, X.H., Waller, M.A., Shirai, N., Abe, Y.O., Fujita, Y., Watanabe, K., Kagita, A., Iwabuchi, K.A., Yasuda, M., Xu, H., Noda, T., Komano, J., Sakurai, H., Inukai, N., Hotta, A., 2020. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14957-y>
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wüthrich, K., 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211–223. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90292-5)
- Geletina, N.S., Kobelev, V.S., Babayants, E. V., Feng, L., Pustylnyak, V.O., Gulyaeva, L.F., 2018. PTEN negative correlates with miR-181a in tumour tissues of non-obese endometrial cancer patients. *Gene* 655, 20–24. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.02.051>
- George, E., Lillemoe, T.J., Twiggs, L.B., Perrone, T., 1995. Malignant mixed müllerian tumor versus high-grade endometrial carcinoma and aggressive variants of endometrial carcinoma: a comparative analysis of survival. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 14, 39–44. <https://doi.org/10.1097/00004347-199501000-00007>
- Getz, G., Gabriel, S.B., Cibulskis, K., Lander, E., Sivachenko, A., Sougnez, C., Lawrence, M., Kandoth, C., Dooling, D., Fulton, R., Fulton, L., Kalicki-Veizer, J., McLellan, M.D., O’Laughlin, M., Schmidt, H., Wilson, R.K., Ye, K., Li, D., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y.S.N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A.A.L., Chuah, E., Chun, H.J.E., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Lee, D., Li, H.I., Marra, M.A., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Plettner, P., et al., 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67–73.
- Ghafouri-Fard, S., Abak, A., Shoorei, H., Mohaqiq, M., Majidpoor, J., Sayad, A., Taheri, M., 2021. Regulatory role of microRNAs on PTEN signaling. *Biomed. Pharmacother.* 133. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110986>
- Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., Jasin, M., Brunet, E., 2014. Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining. *Mol. Cell* 55, 829–842. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.002>
- Giono, L.E., Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. Cell. Physiol.* 209, 13–20. <https://doi.org/10.1002/JCP.20689>
- Girda, E., Huang, E.C., Leiserowitz, G.S., Smith, L.H., 2017. The use of endometrial cancer PatientYDerived organoid culture for drug sensitivity testing is feasible. *Int. J. Gynecol. Cancer* 27, 1701–1707. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001061>
- Gitton, Y., Tibaldi, L., Dupont, E., Levi, G., Joliot, A., 2009. Efficient CPP-mediated Cre protein delivery to developing and adult CNS tissues. *BMC Biotechnol.* 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-40>
- Givens, B.E., Naguib, Y.W., Geary, S.M., Devor, E.J., Salem, A.K., 2018. Nanoparticle-Based Delivery of CRISPR/Cas9 Genome-Editing Therapeutics. *AAPS J.* 20. <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0267-9>
- Glaser, A.K., Reder, N.P., Chen, Y., McCarty, E.F., Yin, C., Wei, L., Wang, Y., True, L.D., Liu, J.T.C., 2017. Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens. *Nat. Biomed. Eng.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0084>
- GLOBACAN 2020 Global Cancer Observatory [WWW Document]. URL <https://gco.iarc.fr/404> (accessed 5.15.22).
- Goad, J., Ko, Y.A., Kumar, M., Fairuz, M., Jamaluddin, B.,

- Tanwar, P.S., 2018. Oestrogen fuels the growth of endometrial hyperplastic lesions initiated by overactive Wnt/ β -catenin signalling. *Carcinogenesis* 39, 1105–1116. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGY079>
- Goebel, E.A., Vidal, A., Matias-Guiu, X., Blake Gilks, C., 2018. The evolution of endometrial carcinoma classification through application of immunohistochemistry and molecular diagnostics: past, present and future. *Virchows Arch.* 472, 885–896. <https://doi.org/10.1007/S00428-017-2279-8>
- Gonzalez Bosquet, J., Terstriep, S.A., Cliby, W.A., Brown-Jones, M., Kaur, J.S., Podratz, K.C., Keeney, G.L., 2010. The impact of multi-modal therapy on survival for uterine carcinosarcomas. *Gynecol. Oncol.* 116, 419–423. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2009.10.053>
- Goodman, A., 2000. Abnormal genital tract bleeding. *Clin. Cornerstone* 3, 25–35. [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(00\)90019-X](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(00)90019-X)
- Gordon, K.J., Globe, G.C., 2008. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1782, 197–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.01.006>
- Gotoh, O., Sugiyama, Y., Takazawa, Y., Kato, K., Tanaka, N., Omatsu, K., Takeshima, N., Nomura, H., Hasegawa, K., Fujiwara, K., Taki, M., Matsumura, N., Noda, T., Mori, S., 2019. Clinically relevant molecular subtypes and genomic alteration-independent differentiation in gynecologic carcinosarcoma. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-12985-X>
- Gottlieb, E., Vousden, K.H., 2010. p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001040>
- Gray, C.A., Bartol, F.F., Tarleton, B.J., Wiley, A.A., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2001. Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.* 65, 1311–1323. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1311>
- Groeneweg, J.W., Hall, T.R., Zhang, L., Kim, M., Byron, V.F., Tambouret, R., Sathayanayanan, S., Foster, R., Rueda, B.R., Growdon, W.B., 2014a. Inhibition of gamma-secretase activity impedes uterine serous carcinoma growth in a human xenograft model. *Gynecol. Oncol.* 133, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.560>
- Groeneweg, J.W., Hernandez, S.F., Byron, V.F., DiGloria, C.M., Lopez, H., Scialabba, V., Kim, M., Zhang, L., Borger, D.R., Tambouret, R., Foster, R., Rueda, B.R., Growdon, W.B., 2014b. Dual HER2 targeting impedes growth of HER2 gene-amplified uterine serous carcinoma xenografts. *Clin. Cancer Res.* 20, 6517–6528. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1647>
- Groothuis, P.G., Dassen, H.H.N.M., Romano, A., Punyadeera, C., 2007. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum. Reprod. Update* 13, 405–417. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMM009>
- Grossman, S.C., Mattson Porth, C., Adriana Cantarell, A., Bautista, C., 2014. Porth fisiopatología: alteraciones de la salud. Conceptos básicos.
- Grossmann, A.H., Layfield, L.J., Randall, R.L., 2012. Classification, molecular characterization, and the significance of pten alteration in leiomyosarcoma. *Sarcoma* 2012, 380896. <https://doi.org/10.1155/2012/380896>
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J.A., Kornblum, H.I., Liu, X., Wu, H., 2001. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* (80-.). 294, 2186–2189. <https://doi.org/10.1126/science.1065518>
- Guan, B., Wang, T.L., Shih, I.M., 2011. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res.* 71, 6718–6727. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1562>
- Guarino, M., Rubino, B., Ballabio, G., 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39, 305–318. <https://doi.org/10.1080/00313020701329914>
- Guijarro, M. V., Dahiya, S., Danielson, L.S., Segura, M.F., Vales-Lara, F.M., Menendez, S., Popiolek, D., Mittal, K., Wei, J.J., Zavadil, J., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., Hernando, E., 2013. Dual Pten/Tp53 suppression promotes sarcoma progression by activating Notch signaling. *Am. J. Pathol.* 182, 2015–2027. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.035>
- Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A.J.H., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., 2008. The p110beta isoform of

- phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 8292–8297. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0707761105>
- Guntupalli, S.R., Ramirez, P.T., Anderson, M.L., Milam, M.R., Bodurka, D.C., Malpica, A., 2009. Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a retrospective analysis. *Gynecol. Oncol.* 113, 324–326. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2009.02.020>
- Guo, F., Ke, J., Fu, Z., Han, W., Wang, L., 2021. Cell penetrating peptide-based self-assembly for PD-L1 targeted tumor regression. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222413314>
- Guo, Y., Xu, Q., Canzio, D., Shou, J., Li, J., Gorkin, D.U., Jung, I., Wu, H., Zhai, Y., Tang, Y., Lu, Y., Wu, Y., Jia, Z., Li, W., Zhang, M.Q., Ren, B., Krainer, A.R., Maniatis, T., Wu, Q., 2015. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function. *Cell* 162, 900–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.038>
- Guo, Z., Peng, H., Kang, J., Sun, D., 2016. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed. reports* 4, 528–534. <https://doi.org/10.3892/br.2016.639>
- H B Salvesen, N MacDonald, A Ryan, I J Jacobs, E D Lynch, L A Akslen, S Das, 2001. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma 91(1), 22–26.
- H Nei, T Saito, H Yamasaki, H Mizumoto, E Ito, R Kudo, 1999. Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium. *Mol Carcinog.* 25(3), 207–218.
- H Tashiro, C Isacson, R Levine, R J Kurman, K R Cho, L Hedrick, Tashiro, H., Isacson, C., Levine, R., Kurman, R.J., Cho, K.R., Hedrick, L., 1997. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis 177–185.
- H Wada, T Enomoto, M Fujita, K Yoshino, R Nakashima, H Kurachi, T Haba, K Wakasa, K R Shroyer, M Tsujimoto, T Hongyo, T Nomura, Y Murata, 1997. Molecular evidence that most but not all carcinosarcomas of the uterus are combination tumors - PubMed. *Cancer Res* 57(23), 5379–5385.
- Habault, J., Poyet, J.L., 2019. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., Weinberg, R.A., 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464–468. <https://doi.org/10.1038/22780>
- Haldorsen, I.S., Popa, M., Fonnes, T., Brekke, N., Kopperud, R., Visser, N.C., Rygh, C.B., Pavlin, T., Salvesen, H.B., McCormack, E., Krakstad, C., 2015. Multimodal imaging of orthotopic mouse model of endometrial carcinoma. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135220>
- Hale, C.R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M.O., Graveley, B.R., Wells, L., Terns, R.M., Terns, M.P., 2009. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 139, 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.040>
- Hamilton, C.A., Cheung, M.K., Osann, K., Chen, L., Teng, N.N., Longacre, T.A., Powell, M.A., Hendrickson, M.R., Kapp, D.S., Chan, J.K., 2006. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br. J. Cancer* 94, 642–646. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6603012>
- Han, X., Liu, Z., Jo, M.C., Zhang, K., Li, Y., Zeng, Z., Li, N., Zu, Y., Qin, L., 2015. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. *Sci. Adv.* 1, e1500454. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500454>
- Han, X., Zhang, Z., He, L., Zhu, H., Li, Yan, Pu, W., Han, M., Zhao, H., Liu, K., Li, Yi, Huang, X., Zhang, M., Jin, H., Lv, Z., Tang, J., Wang, J., Sun, R., Fei, J., Tian, X., Duan, S., Wang, Q.D., Wang, L., He, B., Zhou, B., 2021. A suite of new Dre recombinase drivers markedly expands the ability to perform intersectional genetic targeting. *Cell Stem Cell* 28, 1160–1176.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.007>
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hanlon, K.S., Kleinstiver, B.P., Garcia, S.P., Zaborowski, M.P., Volak, A., Spirig, S.E., Muller, A., Sousa, A.A., Tsai, S.Q., Bengtsson, N.E., Lööv, C., Ingelsson, M., Chamberlain, J.S.,

- Corey, D.P., Aryee, M.J., Joung, J.K., Breakefield, X.O., Maguire, C.A., György, B., 2019. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2>
- Hansen-Bruhn, M., de Ávila, B.E.F., Beltrán-Gastélum, M., Zhao, J., Ramírez-Herrera, D.E., Angsantikul, P., Vesterager Gothelf, K., Zhang, L., Wang, J., 2018. Active Intracellular Delivery of a Cas9/sgRNA Complex Using Ultrasound-Propelled Nanomotors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57, 2657–2661. <https://doi.org/10.1002/anie.201713082>
- Harlow, B.L., Weiss, N.S., Lofton, S., 1986. The Epidemiology of Sarcomas of the Uterus. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 76, 399–402. <https://doi.org/10.1093/JNCI/76.3.399>
- Hasegawa, K., Ishikawa, K., Kawai, S., Torii, Y., Kawamura, K., Kato, R., Tsukada, K., Udagawa, Y., 2013. Overcoming paclitaxel resistance in uterine endometrial cancer using a COX-2 inhibitor. *Oncol. Rep.* 30, 2937–2944. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2790>
- Hashimoto, M., Taniguchi, M., Yoshino, S., Arai, S., Sato, K., 2008. S phase-preferential Cre-recombination in mammalian cells revealed by HIV-TAT-PTD-mediated protein transduction. *J. Biochem.* 143, 87–95. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm198>
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., Takemoto, T., 2016. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev. Biol.* 418, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.017>
- Hassell, B.A., Goyal, G., Lee, E., Sontheimer-Phelps, A., Levy, O., Chen, C.S., Ingber, D.E., 2017. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Rep.* 21, 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.043>
- Hayashi, S., McMahon, A.P., 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* 244, 305–318. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0597>
- Hayashi, T., Faustman, D.L., 2002. Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Res.* 62, 24–27.
- Hayashi, T., Horiuchi, A., Sano, K., Hiraoka, N., Kasai, M., Ichimura, T., Sudo, T., Tagawa, Y.I., Nishimura, R., Ishiko, O., Kanai, Y., Yaegashi, N., Aburatani, H., Shiozawa, T., Konishi, I., 2011. Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci. Rep.* 1. <https://doi.org/10.1038/srep00180>
- Hébert, J.M., McConnell, S.K., 2000. Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* 222, 296–306. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9732>
- Heckl, D., Kowalczyk, M.S., Yudovich, D., Belizaire, R., Puram, R. V., McConkey, M.E., Thielke, A., Aster, J.C., Regev, A., Ebert, B.L., 2014. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat. Biotechnol.* 32, 941–946. <https://doi.org/10.1038/nbt.2951>
- Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K., Östman, A., 2004. High interstitial fluid pressure - An obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 806–813. <https://doi.org/10.1038/nrc1456>
- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 23, 1515–1527. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2011.05.004>
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G.M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., Villanueva, A., 2014. Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 4, 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., Dennis, P.A., 2011. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models 11, 289–301.
- Horn, D.W., Vollmer, G., Deerberg, F., Schneider, M.R., 1993. The EnDA endometrial adenocarcinoma: an oestrogen-sensitive, metastasizing, in vivo tumour model of the rat. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119, 450–456. <https://doi.org/10.1007/BF01215924>
- Horn, H.F., Vousden, K.H., 2007. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306–1316. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210263>
- Horvath, P., Barrangou, R., 2010. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science (80-.)*. 327, 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>

- Houssami, N., Cuzick, J., Dixon, J.M., 2006. The prevention, detection, and management of breast cancer. *Med. J. Aust.* 184, 230–234. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00208.x>
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F., 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab/uterus.php Uterus [WWW Document]. URL http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab/uterus.php (accessed 5.15.22).
- Huang, C.C., Orvis, G.D., Wang, Y., Behringer, R.R., 2012. Stromal-to-epithelial transition during postpartum endometrial regeneration. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044285>
- Huijbers, I.J., Del Bravo, J., Bin Ali, R., Pritchard, C., Braumuller, T.M., Van Miltenburg, M.H., Henneman, L., Michalak, E.M., Berns, A., Jonkers, J., 2015. Using the GEMM-ESC strategy to study gene function in mouse models. *Nat. Protoc.* 10, 1755–1785. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.114>
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Kaini, P., Sander, J.D., Joung, J.K., Peterson, R.T., Yeh, J.R.J., 2013. Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068708>
- Ideno, N., Yamaguchi, H., Okumura, T., Huang, J., Brun, M.J., Ho, M.L., Suh, J., Gupta, S., Maitra, A., Ghosh, B., 2019. A pipeline for rapidly generating genetically engineered mouse models of pancreatic cancer using in vivo CRISPR-Cas9-mediated somatic recombination. *Lab. Investig.* 99, 1233–1244. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0171-z>
- Imboden, S., Nastic, D., Ghaderi, M., Rydberg, F., Rau, T.T., Mueller, M.D., Epstein, E., Carlson, J.W., 2019. Phenotype of POLE-mutated endometrial cancer. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0214318>
- Ioffe, O.B., Papadimitriou, J.C., Drachenberg, C.B., 1998. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum. Pathol.* 29, 1150–1159. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)90429-4](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)90429-4)
- Ipsaro, J.J., Shen, C., Arai, E., Xu, Y., Kinney, J.B., Joshua-Tor, L., Vakoc, C.R., Shi, J., 2017. Rapid generation of drug-resistance alleles at endogenous loci using CRISPR-Cas9 indel mutagenesis. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172177>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakamura, A., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Izumiya, M., Kato, S., Hippo, Y., 2021. Recent Advances in Implantation-Based Genetic Modeling of Biliary Carcinogenesis in Mice. *Cancers (Basel)*. 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13102292>
- Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P., 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2904–2909. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>
- Jain, R.K., Stylianopoulos, T., 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 653–664. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>
- Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C., Behringer, R.R., 2002. Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.* 32, 408–410. <https://doi.org/10.1038/ng1003>
- Janet R Albers, Sharon K Hull, Robert M Wesley, 2004. Abnormal uterine bleeding . *Am Fam Physician* . 69(8), 1915–1926.
- Janiec-Jankowska, A., Konopka, B., Goluda, C., Najmoaa, U., 2010. TP53 mutations in endometrial cancers relation to PTEN gene defects. *Int. J. Gynecol. Cancer* 20, 196–202. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181c83675>
- Jansen, R., Van Embden, J.D.A., Gaastra, W., Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575.

- <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Janzen, D.Y., Paik, D.Y., Rosales, M.A., Yep, B., Cheng, D., Witte, O.N., Kayadibi, H., Christopher, C.M., Jung, M.E., Faull, K., Memarzadeh, S., 2013. Low levels of circulating estrogen sensitize PTEN-null endometrial tumors to PARP inhibition in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2917–2928. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0572>
- Jardé, T., Kerr, G., Akhtar, R., Abud, H.E., 2018. Modelling intestinal carcinogenesis using in vitro organoid cultures. *Methods Mol. Biol.* 1725, 41–52. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7568-6_4
- Jeong, J.W., Hee, S.L., Lee, K.Y., White, L.D., Broaddus, R.R., Zhang, Y.W., Vande Woude, G.F., Giudice, L.C., Young, S.L., Lessey, B.A., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., 2009. Mig-6 modulates uterine steroid hormone responsiveness and exhibits altered expression in endometrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8677–8682. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903632106>
- Jiang, C., Lin, X., Zhao, Z., 2019. Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer. *Trends Mol. Med.* 25, 1039–1049. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.07.007>
- Jiang, C., Mei, M., Li, B., Zhu, X., Zu, W., Tian, Y., Wang, Q., Guo, Y., Dong, Y., Tan, X., 2017. A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *Cell Res.* 27, 440–443. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.16>
- Jiang, J., 2021. Cell-penetrating Peptide-mediated Nanovaccine Delivery. *Curr. Drug Targets* 22, 896–912. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210203193225>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L.A., 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Jin, N., Gilbert, J.L., Broaddus, R.R., Demayo, F.J., Jeong, J.W., 2007. Generation of a Mig-6 conditional null allele. *Genesis* 45, 716–721. <https://doi.org/10.1002/dvg.20348>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-.). 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J., 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E., Doudna, J.A., 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* (80-.). 343. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- Jo, D., Nashabi, A., Doxsee, C., Lin, Q., Unutmaz, D., Chen, J., Ruley, H.E., 2001. Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nat. Biotechnol.* 19, 929–933. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-929>
- Jo, J., Hong, S., Choi, W.Y., Lee, D.R., 2014. Cell-penetrating peptide (CPP)-conjugated proteins is an efficient tool for manipulation of human mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep04378>
- Joana D Amaral, Joana M Xavier, Clifford J Steer, Cecília M Rodrigues, 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov. Med.* 9(45), 145–152.
- Joerger, A.C., Fersht, A.R., 2010. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A000919>
- Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K., Singh, S.K., 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 269–283. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.546339>
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A., 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1864–1868. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>
- Jonkers, J., Meuwissen, R., Van der Gulden, H., Peterse, H., Van der Valk, M., Berns, A., 2001. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* 29, 418–425. <https://doi.org/10.1038/ng747>
- Joshi, A., Ellenson, L.H., 2011. Adenovirus mediated homozygous endometrial epithelial Pten deletion results in aggressive endometrial carcinoma. *Exp. Cell Res.* 317, 1580–9. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.006>

- Joshi, A., Wang, H., Jiang, G., Douglas, W., Chan, J.S.Y., Korach, K.S., Ellenson, L.H., 2012. Endometrial tumorigenesis in Pten +/- mice is independent of coexistence of estrogen and estrogen receptor α . *Am. J. Pathol.* 180, 2536–2547. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.006>
- Joshi, S.K., Hashimoto, K., Koni, P.A., 2002. Induced DNA recombination by Cre recombinase protein transduction. *Genesis* 33, 48–54. <https://doi.org/10.1002/gene.10089>
- Jung, P.S., Kim, D.Y., Kim, M.B., Lee, S.W., Kim, J.H., Kim, Y.M., Kim, Y.T., Hoffman, R.M., Nam, J.H., 2013. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. *Anticancer Res.* 33, 1029–1034.
- Kabukcuoglu, S., Ozalp, S.S., Yalcin, O.T., Colak, E., Abubakar, A.A., 2010. Comparison of histopathologic classification and surgical stage by cytokeratin 8 and cytokeratin 18 in endometrial cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 31, 641–644.
- Kadkhodayan, S., Jafarzade, B.S., Sadat, S.M., Motevalli, F., Agi, E., Bolhassani, A., 2017. Combination of cell penetrating peptides and heterologous DNA prime/protein boost strategy enhances immune responses against HIV-1 Nef antigen in BALB/c mouse model. *Immunol. Lett.* 188, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.06.003>
- Kakehashi, A., Tago, Y., Yoshida, M., Sokuza, Y., Wei, M., Fukushima, S., Wanibuchi, H., 2012. Hormonally active doses of isoflavone aglycones promote mammary and endometrial carcinogenesis and alter the molecular tumor environment in donryu rats. *Toxicol. Sci.* 126, 39–51. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs016>
- Kaku, T., Kamura, T., Hirakawa, T., Sakai, K., Amada, S., Kobayashi, H., Nakano, H., 1999. Endometrial carcinoma associated with hyperplasia—immunohistochemical study of angiogenesis and p53 expression. *Gynecol. Oncol.* 72, 51–55. <https://doi.org/10.1006/GYNO.1998.5230>
- Kang, Q., Sun, Z., Zou, Z., Wang, M., Li, Q., Hu, X., Li, N., 2018. Cell-penetrating peptide-driven Cre recombination in porcine primary cells and generation of marker-free pigs. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190690>
- Kang, Y.K., Kwon, K., Ryu, J.S., Lee, H.N., Park, C., Chung, H.J., 2017. Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjug. Chem.* 28, 957–967. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00676>
- Karekla, E., Liao, W.J., Sharp, B., Pugh, J., Reid, H., Le Quesne, J., Moore, D., Pritchard, C., MacFarlane, M., Pringle, J.H., 2017. Ex Vivo explant cultures of non-small cell lung carcinoma enable evaluation of primary tumor responses to anticancer therapy. *Cancer Res.* 77, 2029–2039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1121>
- Karlsson, S., Klinga-Levan, K., 2008. Expression analysis of human endometrial adenocarcinoma in an inbred rat model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 503–509. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_50
- Karro, K., Männik, T., Männik, A., Ustav, M., 2015. DNA transfer into animal cells using stearylated CPP based transfection reagent. *Cell-Penetrating Pept. Methods Protoc.* 435–445. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_29
- Kaspereit-Rittinghausen, J., Deerberg, F., Rapp, K., 1987. Mortality and incidence of spontaneous neoplasms in BDII/Han rats. *Z. Versuchstierkd.* 30, 209–216.
- Kato, S., Fushimi, K., Yabuki, Y., Maru, Y., Hasegawa, S., Matsuura, T., Kurotaki, D., Suzuki, A., Kobayashi, N., Yoneda, M., Higurashi, T., Enaka, M., Tamura, T., Hippo, Y., Nakajima, A., 2021. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 10, 33. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00322-1>
- Kato, T., Yamashita, H., Misawa, T., Nishida, K., Kurihara, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Oba, M., 2016. Plasmid DNA delivery by arginine-rich cell-penetrating peptides containing unnatural amino acids. *Bioorganic Med. Chem.* 24, 2681–2687. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.031>
- Katti, A., Diaz, B.J., Caragine, C.M., Sanjana, N.E., Dow, L.E., 2022. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 22, 259–279. <https://doi.org/10.1038/S41568-022-00441-W>
- Kaur, M., Cole, M.D., 2013. MYC acts via the PTEN tumor suppressor to elicit autoregulation and genome-wide gene repression by activation of the Ezh2 methyltransferase. *Cancer Res.* 73, 695–705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2522>
- Kavlashvili, T., Jia, Y., Dai, D., Meng, X., Thiel, K.W., Leslie, K.K., Yang, S., 2016. Inverse relationship between progesterone

- receptor and Myc in endometrial cancer. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148912>
- Kearns, N.A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R.M., Silverstein, N.J., Garber, M., Maehr, R., 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods* 12, 401–403. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3325>
- Kedar, R., Bourne, T.H., Collins, W.P., Campbell, S., Powles, T.J., Ashley, S., Cosgrove, D.O., 1994. Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention trial. *Lancet* 343, 1318–1321. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92466-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92466-X)
- Khafagy, E.S., Morishita, M., Isowa, K., Imai, J., Takayama, K., 2009. Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. *J. Control. Release* 133, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.076>
- Khan, S., Kumagai, T., Vora, J., Bose, N., Sehgal, I., Koeffler, P.H., Bose, S., 2004. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int. J. cancer* 112, 407–410. <https://doi.org/10.1002/IJC.20447>
- Khawar, I.A., Kim, J.H., Kuh, H.J., 2015. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. *J. Control. Release* 201, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.018>
- Kiisholts, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Porosk, L., Peters, M., Salumets, A., Langel, Ü., 2021. Cell-Penetrating Peptide and siRNA-Mediated Therapeutic Effects on Endometriosis and Cancer In Vitro Models. *Pharmaceutics* 13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101618>
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., Fang, S., 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* 34, 147–159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- Kim, M.P., Evans, D.B., Wang, H., Abbruzzese, J.L., Fleming, J.B., Gallick, G.E., 2009. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 4, 1670–1680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.171>
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J.S.J., Kim, J.S.J., 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>
- Kim, S.M., Shin, S.C., Kim, E.E., Kim, S.H., Park, K., Oh, S.J., Jang, M., 2018. Simple in vivo gene editing via direct self-assembly of Cas9 ribonucleoprotein complexes for cancer treatment. *ACS Nano* 12, 7750–7760. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01670>
- Kim, T. H., Franco, H.L., Jung, S.Y., Qin, J., Broaddus, R.R., Lydon, J.P., Jeong, J.W., 2010. The synergistic effect of Mig-6 and Pten ablation on endometrial cancer development and progression. *Oncogene* 29, 3770–3780. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.126>
- Kim, T.H., Lee, D.-K., Cho, S.-N., Orvis, G.D., Behringer, R.R., Lydon, J.P., Ku, B.J., McCampbell, A.S., Broaddus, R.R., Jeong, J.-W., 2013. Critical tumor suppressor function mediated by epithelial Mig-6 in endometrial cancer. *Cancer Res.* 73, 5090–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0241>
- Kim, Tae Hoon, Lee, D.K., Franco, H.L., Lydon, J.P., Jeong, J.W., 2010a. ERBB receptor feedback inhibitor 1 regulation of estrogen receptor activity is critical for uterine implantation in mice. *Biol. Reprod.* 82, 706–713. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.081307>
- Kim, Tae Hoon, Wang, J., Lee, K.Y., Franco, H.L., Broaddus, R.R., Lydon, J.P., Jeong, J.-W., Demayo, F.J., 2010b. The Synergistic Effect of Conditional Pten Loss and Oncogenic K-ras Mutation on Endometrial Cancer Development Occurs via Decreased Progesterone Receptor Action. *J. Oncol.* 2010, 139087. <https://doi.org/10.1155/2010/139087>
- Kim, T.H., Yoo, J.Y., Jeong, J.W., 2017. Mig-6 mouse model of endometrial cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 943, 243–259. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0_8
- Kim, T.H., Yoo, J.Y., Kim, H.I., Gilbert, J., Ku, B.J., Li, J., Mills, G.B., Broaddus, R.R., Lydon, J.P., Lim, J.M., Yoon, H.G., Jeong, J.W., 2014. Mig-6 suppresses endometrial cancer associated with Pten deficiency and ERK activation. *Cancer Res.* 74, 7371–7382. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0794>
- Kiyohara, Y., Yoshino, K., Kubota, S., Okuyama, H., Endo, H., Ueda, Y., Kimura, Toshihiro, Kimura, Tadashi, Kamiura, S., Inoue, M., 2016. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 107, 452–460. <https://doi.org/10.1111/cas.12898>
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Joung, J.K., 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9

- nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Knudson, A.G., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823. <https://doi.org/10.1073/PNAS.68.4.820>
- Kocak, D.D., Josephs, E.A., Bhandarkar, V., Adkar, S.S., Kwon, J.B., Gersbach, C.A., 2019. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat. Biotechnol.* 37, 657–666. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
- Kojima, T., Tanaka, T., Mori, H., 1994. Chemoprevention of Spontaneous Endometrial Cancer in Female Donryu Rats by Dietary Indole-3-carbinol. *Cancer Res.* 54, 1446–1449.
- Kondo, E., Iioka, H., Saito, K., 2021. Tumor-homing peptide and its utility for advanced cancer medicine. *Cancer Sci.* 112, 2118–2125. <https://doi.org/10.1111/cas.14909>
- Kossäi, M., Penault-Llorca, F., 2020. Role of Hormones in Common Benign Uterine Lesions: Endometrial Polyps, Leiomyomas, and Adenomyosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1242, 37–58. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38474-6_3
- Koul, A., Willén, R., Bendahl, P.O., Nilbert, M., Borg, Å., 2002. Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer* 94, 2369–2379. <https://doi.org/10.1002/CNCR.10498>
- Kriseman, M., Monsivais, D., Agno, J., Masand, R.P., Creighton, C.J., Matzuk, M.M., 2019. Uterine double-conditional inactivation of Smad2 and Smad3 in mice causes endometrial dysregulation, infertility, and uterine cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 3873–3882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806862116>
- Kühn, R., Torres, R.M., 2002. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol. Biol.* 180, 175–204. <https://doi.org/10.1385/1-59259-178-7:175>
- Kun, E.H.S., Tsang, Y.T.M., Lin, S., Pan, S., Medapalli, T., Malpica, A., Richards, J.A.S., Gershenson, D.M., Wong, K.K., 2020. Differences in gynecologic tumor development in Amhr2-Cre mice with KRAS G12D or KRAS G12V mutations. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77666-y>
- Kurnit, K.C., Previs, R.A., Soliman, P.T., Westin, S.N., Klopp, A.H., Fellman, B.M., Lu, K.H., Ramondetta, L.M., Fleming , 2019. Prognostic factors impacting survival in early stage uterine carcinosarcoma. *Gynecol. Oncol.* 152, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.YGYNO.2018.10.034>
- Kwanten, B., Neggers, J.E., Daelemans, D., 2022. Target Identification of Small Molecules Using Large-Scale CRISPR–Cas Mutagenesis Scanning of Essential Genes. *Methods Mol. Biol.* 2377, 43–67. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1720-5_3
- Kwon, D.Y., Zhao, Y.T., Lamonica, J.M., Zhou, Z., 2017. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15315>
- La Sociedad Americana Contra El Cancer Endometrial Cancer Symptoms | Signs of Endometrial Cancer [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html> (accessed 5.15.22).
- LaFontaine, J.S., Fathe, K., Smyth, H.D.C., 2015. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int. J. Pharm.* 494, 180–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.029>
- Landgraf, M., McGovern, J.A., Friedl, P., Huttmacher, D.W., 2018. Rational Design of Mouse Models for Cancer Research. *Trends Biotechnol.* 36, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.001>
- Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015A0>
- Langel, Ü., 2021. Cell-Penetrating Peptides and Transportan. *Pharmaceutics* 13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070987>
- Lao, Y.-H., Li, M., Gao, M.A., Shao, D., Chi, C.-W., Huang, D., Chakraborty, S., Ho, T.-C., Jiang, W., Wang, H.-X., Wang, S., Leong, K.W., 2018. HPV Oncogene Manipulation Using Nonvirally Delivered CRISPR/Cas9 or Natronobacterium gregoryi Argonaute. *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)* 5, 1700540. <https://doi.org/10.1002/advs.201700540>
- Lax, S.F., Kendall, B., Tashiro, H., Slebos, R.J.C.C., Ellenson, L.H., 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., Pizer, E.S., Ronnett, B.M., Kurman, R.J., 1998. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Hum. Pathol.* 29, 551–558. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)80002-6](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)80002-6)

Le, D.T., Durham, J.N., Smith, K.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Aulakh, L.K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubner, B.S., Wong, F., Azad, N.S., Rucki, A.A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G.A., Crocenzi, T.S., Lee, J.J., Gretchen, T.F., Duffy, A.G., Ciombor, K.K., Eyring, A.D., Lam, B.H., Joe, A., Kang, S.P., Holdhoff, M., Danilova, L., Cope, L., Meyer, C., Zhou, S., Goldberg, R.M., Armstrong, D.K., Bever, K.M., Fader, A.N., Taube, J., Housseau, F., Spetzler, D., Xiao, N., Pardoll, D.M., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Eshleman, J.R., Vogelstein, B., Anders, R.A., Diaz, L.A., 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (80-.). 357, 409–413. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Lubner, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R.C., Zaheer, A., Fisher, G.A., Crocenzi, T.S., Lee, J.J., Duffy, S.M., Goldberg, R.M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhaijee, F., Huebner, T., Hruban, R.H., Wood, L.D., Cuka, N., Pardoll, D.M., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Zhou, S., Cornish, T.C., Taube, J.M., Anders, R.A., Eshleman, J.R., Vogelstein, B., Diaz, L.A., 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1500596>

Le Gallo, M., O'Hara, A.J., Rudd, M.L., Urlick, M.E., Hansen, N.F., O'Neil, N.J., Price, J.C., Zhang, S., England, B.M., Godwin, A.K., Sgroi, D.C., Hieter, P., Mullikin, J.C., Merino, M.J., Bell, D.W., 2012. Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. *Nat. Genet.* 44, 1310–1315. <https://doi.org/10.1038/NG.2455>

Le Gallo, M., Rudd, M.L., Urlick, M.E., Hansen, N.F., Zhang, S., Lozy, F., Sgroi, D.C., Vidal Bel, A., Matias-Guiu, X., Broaddus, R.R., Lu, K.H., Levine, D.A., Mutch, D.G., Goodfellow, P.J., Salvesen, H.B., Mullikin, J.C., Bell, D.W., 2017. Somatic mutation profiles of clear cell endometrial tumors revealed by whole exome and targeted gene sequencing. *Cancer* 123, 3261–3268. <https://doi.org/10.1002/CNCR.30745>

Lee, J., Snyder, E.R., Liu, Y., Gu, X., Wang, J., Flowers, B.M., Kim,

Y.J., Park, S., Szot, G.L., Hruban, R.H., Longacre, T.A., Kim, S.K., 2017. Reconstituting development of pancreatic intraepithelial neoplasia from primary human pancreas duct cells. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14686>

Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Cristofano, A. Di, Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., Pavletich, N.P., 1999. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323–334. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81663-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81663-3)

Lee, J.Y., Choi, Y.S., Suh, J.S., Kwon, Y.M., Yang, V.C., Lee, S.J., Chung, C.P., Park, Y.J., 2011. Cell-penetrating chitosan/doxorubicin/TAT conjugates for efficient cancer therapy. *Int. J. Cancer* 128, 2470–2480. <https://doi.org/10.1002/ijc.25578>

Lee, K., Conboy, M., Park, H.M., Jiang, F., Kim, H.J., Dewitt, M.A., Mackley, V.A., Chang, K., Rao, A., Skinner, C., Shobha, T., Mehdipour, M., Liu, H., Huang, W.-C., Lan, F., Bray, N.L., Li, S., Corn, J.E., Kataoka, K., Doudna, J.A., Conboy, I., Murthy, N., 2017. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat. Biomed. Eng.* 1, 889–901. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0137-2>

Lee, N.K., Cheung, M.K., Shin, J.Y., Husain, A., Teng, N.N., Berek, J.S., Kapp, D.S., Osann, K., Chan, J.K., 2007. Prognostic factors for uterine cancer in reproductive-aged women. *Obstet. Gynecol.* 109, 655–662. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000255980.88205.15>

Lee, S.Y., 2021. Tailored Therapy Based on Molecular Characteristics in Endometrial Cancer. *Biomed Res. Int.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2068023>

Lee, Y.R., Chen, M., Pandolfi, P.P., 2018. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 547–562. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0015-0>

Lehrer, S., Rheinstein, P.H., 2021a. Druggable genetic targets in endometrial cancer ☆☆☆. *Cancer Treat. Res. Commun.* 30. <https://doi.org/10.1016/J.CTARC.2021.100502>

Lehrer, S., Rheinstein, P.H., 2021b. Druggable genetic targets in endometrial cancer ☆☆☆. *Cancer Treat. Res. Commun.* 30, 100502. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100502>

- Lei, Y., Zhang, X., Su, J., Jeong, M., Gundry, M.C., Huang, Y.H., Zhou, Y., Li, W., Goodell, M.A., 2017. Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms16026>
- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X., Wu, H., 2002. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* 32, 148–149. <https://doi.org/10.1002/gene.10036>
- Leskela, S., Pérez-Mies, B., Rosa-Rosa, J.M., Cristobal, E., Biscuola, M., Palacios-Berraquero, M.L., Ong, S., Guia, X.M.G., Palacios, J., 2019. Molecular Basis of Tumor Heterogeneity in Endometrial Carcinosarcoma. *Cancers (Basel)*. 11.
- Leslie, K.K., Sill, M.W., Lankes, H.A., Fischer, E.G., Godwin, A.K., Gray, H., Schilder, R.J., Walker, J.L., Tewari, K., Hanjani, P., Abulafia, O., Rose, P.G., 2012. Lapatinib and potential prognostic value of EGFR mutations in a Gynecologic Oncology Group phase II trial of persistent or recurrent endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 127, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.127>
- Leslie, N.R., Kriplani, N., Hermida, M.A., Alvarez-Garcia, V., Wise, H.M., 2016. The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 273–278. <https://doi.org/10.1042/BST20150224>
- Lessard, S., Francioli, L., Alfoldi, J., Tardif, J.C., Ellinor, P.T., MacArthur, D.G., Lettre, G., Orkin, S.H., Canver, M.C., 2017. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E11257–E11266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714640114>
- Levine, A.J., Perry, M.E., Chang, A., Silver, A., Dittmer, D., Wu, M., Welsh, D., 1994. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 69, 409–416. <https://doi.org/10.1038/BJC.1994.76>
- Lewis, J.S., Jordan, V.C., 2005. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 591, 247–263. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.02.028>
- Li, A., Walling, J., Kotliarov, Y., Center, A., Steed, M.E., Ahn, S.J., Rosenblum, M., Mikkelsen, T., Zenklusen, J.C., Fine, H.A., 2008. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol. Cancer Res.* 6, 21–30. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0280>
- Li, B., Zeng, C., Dong, Y., 2018. Design and assessment of engineered CRISPR-Cpf1 and its use for genome editing. *Nat. Protoc.* 13, 899–914. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.004>
- Li, H.D., Lu, C., Zhang, H., Hu, Q., Zhang, J., Cuevas, I.C., Sahoo, S.S., Aguilar, M., Maurais, E.G., Zhang, S., Wang, X., Akbay, E.A., Li, G.M., Li, B., Koduru, P., Ly, P., Fu, Y.X., Castrillon, D.H., 2020. A PoleP286R mouse model of endometrial cancer recapitulates high mutational burden and immunotherapy response. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.138829>
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovannella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R., 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5308.1943>
- Li, L., He, Z.Y., Wei, X.W., Gao, G.P., Wei, Y.Q., 2015. Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors. *Hum. Gene Ther.* 26, 452–462. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.069>
- Li, L., Hu, S., Chen, X., 2018. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. *Biomaterials* 171, 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.031>
- Li, L., Song, L., Liu, X., Yang, X., Li, X., He, T., Wang, N., Yang, S., Yu, C., Yin, T., Wen, Y., He, Z., Wei, X., Su, W., Wu, Q., Yao, S., Gong, C., Wei, Y., 2017. Artificial Virus Delivers CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of Cells in Mice. *ACS Nano* 11, 95–111. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04261>
- Li, S.D., Huang, L., 2007. Non-viral is superior to viral gene delivery. *J. Control. Release* 123, 181–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004>
- Li, W., Cho, M.Y., Lee, S., Jang, M., Park, J., Park, R., 2019. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220860>
- Li, X.L., Zhou, J., Chen, Z.R., Chng, W.J., 2015. P53 mutations in

- colorectal cancer- Molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* 21, 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>
- Li, Y., Park, A.I., Mou, H., Colpan, C., Bizhanova, A., Akama-Garren, E., Joshi, N., Hendrickson, E.A., Feldser, D., Yin, H., Anderson, D.G., Jacks, T., Weng, Z., Xue, W., 2015. A versatile reporter system for CRISPR-mediated chromosomal rearrangements. *Genome Biol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0680-7>
- Li, Y., Wen, G., Wang, D., Zhang, Xia, Lu, Y., Wang, J., Zhong, L., Cai, H., Zhang, Xingmei, Wang, Y., 2014. A complementary strategy for enhancement of nanoparticle intracellular uptake. *Pharm. Res.* 31, 2054–2064. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1307-5>
- Liang, H., Cheung, L.W.T., Li, J., Ju, Z., Yu, S., Stemke-Hale, K., Dogruluk, T., Lu, Y., Liu, X., Gu, C., Guo, W., Scherer, S.E., Carter, H., Westin, S.N., Dyer, M.D., Verhaak, R.G.W., Zhang, F., Karchin, R., Liu, C.G., Lu, K.H., Broaddus, R.R., Scott, K.L., Hennessy, B.T., Mills, G.B., 2012. Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer. *Genome Res.* 22, 2120–2129. <https://doi.org/10.1101/gr.137596.112>
- Liang, J., Zhao, H., Diplas, B.H., Liu, S., Liu, J., Wang, D., Lu, Y., Zhu, Q., Wu, J., Wang, W., Yan, H., Zeng, Y.X., Wang, X., Jiao, Y., 2020. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen reveals selective vulnerability of ATRX-mutant cancers to WEE1 inhibition. *Cancer Res.* 80, 510–523. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3374>
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., Huang, J., 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 6, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
- Liang, F. Sen, Ho, W.Q., Crabtree, G.R., 2011. Engineering the ABA Plant stress pathway for regulation of induced proximity. *Sci. Signal.* 4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001449>
- Liang, X., Daikoku, T., Terakawa, J., Ogawa, Y., Joshi, A.R., Ellenson, L.H., Sun, X., Dey, S.K., 2018. The uterine epithelial loss of Pten is inefficient to induce endometrial cancer with intact stromal Pten. *PLoS Genet.* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007630>
- Liehr, J.G., 2001. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: Possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum. Reprod. Update* 7, 273–281. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.3.273>
- Liehr, J.G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr. Rev.* 21, 40–54. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.1.0386>
- Lima, A., Maddalo, D., 2021. SEMMs: Somatically Engineered Mouse Models. A New Tool for In Vivo Disease Modeling for Basic and Translational Research. *Front. Oncol.* 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.667189>
- Lin, A., Giuliano, C.J., Sayles, N.M., Sheltzer, J.M., 2017. CRISPR/Cas9 mutagenesis invalidates a putative cancer dependency targeted in on-going clinical trials. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.24179>
- Lin, Y., Cradick, T.J., Brown, M.T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B.M., Vertino, P.M., Stewart, F.J., Bao, G., 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 42, 7473–7485. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
- Lindgren, M., Langel, U., 2011. Classes and prediction of cell-penetrating peptides. *Methods Mol. Biol.* 683, 3–19. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-919-2_1
- Lindgren, M., Rosenthal-Aizman, K., Saar, K., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Sassian, M., Östlund, P., Hällbrink, M., Langel, Ü., 2006. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem. Pharmacol.* 71, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.048>
- Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P., Timlin, J.A., 2018. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 25, 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liu, B.Y., He, X.Y., Zhuo, R.X., Cheng, S.X., 2018. Tumor targeted genome editing mediated by a multi-functional gene vector for regulating cell behaviors. *J. Control. Release* 291, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.018>
- Liu, C., Luo, Q., Tu, Y., Wang, G., Liu, Y., Xie, Y., 2015. Drug-carrier interaction analysis in the cell penetrating peptide-modified liposomes for doxorubicin loading. *J. Microencapsul.* 32, 745–754.

<https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1073390>

Liu, C., Tai, L., Zhang, W., Wei, G., Pan, W., Lu, W., 2014. Penetratin, a potentially powerful absorption enhancer for noninvasive intraocular drug delivery. *Mol. Pharm.* 11, 1218–1227. <https://doi.org/10.1021/mp400681n>

Liu, F.S., 2007. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 46, 26–32. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60102-3](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60102-3)

Liu, J., Gaj, T., Patterson, J.T., Sirk, S.J., Barbas, C.F., 2014. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085755>

Liu, L., Jiang, H., Wang, Xiaoxin, Wang, Xin, Zou, L., 2020. STYX/FBXW7 axis participates in the development of endometrial cancer cell via Notch-mTOR signaling pathway. *Biosci. Rep.* 40. <https://doi.org/10.1042/BSR20200057>

Livasy, C.A., Reading, F.C., Moore, D.T., Boggess, J.F., Lininger, R.A., 2006. EGFR expression and HER2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma. *Gynecol. Oncol.* 100, 101–106. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2005.07.124>

Llobet, D., Eritja, N., Yeramian, A., Pallares, J., Sorolla, A., Domingo, M., Santacana, M., Gonzalez-Tallada, F.J., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2010. The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms. *Eur. J. Cancer* 46, 836–850. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.025>

Lo, Y.H., Kolahi, K.S., Du, Y., Chang, C.Y., Krokhotin, A., Nair, A., Sobba, W.D., Karlsson, K., Jones, S.J., Longacre, T.A., Mah, A.T., Tercan, B., Sockell, A., Xu, H., Seoane, J.A., Chen, J., Shmulevich, I., Weissman, J.S., Curtis, C., Califano, A., Fu, H., Crabtree, G.R., Kuo, C.J., 2021. A crispr/cas9-engineered arid1a-deficient human gastric cancer organoid model reveals essential and nonessential modes of oncogenic transformation. *Cancer Discov.* 11, 1562–1581. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1109>

Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2014. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* (80-). 1184–1188. <https://doi.org/10.1126/science.1254445>

Longoria-García, S., Sánchez-Domínguez, C.N., Gallardo-Blanco, H.L., 2022. Recent applications of cell-penetrating peptide guidance of nanosystems in breast and prostate cancer. *Oncol. Lett.* 23, 103. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13223>

Lorusso, D., Ferrandina, G., Colombo, N., Pignata, S., Pietragalla, A., Sonetto, C., Pisano, C., Lapresa, M.T., Savarese, A., Tagliaferri, P., Lombardi, D., Cinieri, S., Breda, E., Sabatucci, I., Sabbatini, R., Conte, C., Cecere, S.C., Maltese, G., Scambia, G., 2019. Carboplatin-paclitaxel compared to Carboplatin-Paclitaxel-Bevacizumab in advanced or recurrent endometrial cancer: MITO END-2 - A randomized phase II trial. *Gynecol. Oncol.* 155, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.10.013>

Lostalé-Seijo, I., Louzao, I., Juanes, M., Montenegro, J., 2017. Peptide/Cas9 nanostructures for ribonucleoprotein cell membrane transport and gene edition. *Chem. Sci.* 8, 7923–7931. <https://doi.org/10.1039/c7sc03918b>

Lu, K.H., Daniels, M., 2013. Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention. *Fam. Cancer* 12, 273–277. <https://doi.org/10.1007/S10689-013-9664-5>

Lukas Heukamp,, Michael Peitz,, Linda Diehl,, Ursula Rommerscheidt-Fuss,, Luisa Klotz,, Jens Hahne,, Frank Edenhofer,, Reinhard Buettner, 2007. In vivo use of recombinant TAT-CRE protein for sporadic lung cancer induction in a orthotopic mouse tumor model, *Cancer Research*.

Luo, Y.D., Fang, L., Yu, H.Q., Zhang, J., Lin, X.T., Liu, X.Y., Wu, D., Li, G.X., Huang, D., Zhang, Y.J., Chen, S., Jiang, Y., Shuai, L., He, Y., Zhang, L. Da, Bie, P., Xie, C.M., 2021. p53 haploinsufficiency and increased mTOR signalling define a subset of aggressive hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 74, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.036>

M J Costa, J Vogelsan, L J Young, 1994. p53 gene mutation in female genital tract carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumors): a clinicopathologic study of 74 cases . *Mod Pathol* 6, 619–627.

M M Georgescu, K H Kirsch, P Kaloudis, H Yang, N P Pavletich, H Hanafusa, 2000. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor . *Cancer Res.* 60(24), 7033–8.

- Ma, D.X., Shi, N.Q., Qi, X.R., 2011. Distinct transduction modes of arginine-rich cell-penetrating peptides for cargo delivery into tumor cells. *Int. J. Pharm.* 419, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.001>
- Ma, S., Chang, J., Wang, X., Liu, Y., Zhang, J., Lu, W., Gao, J., Shi, R., Zhao, P., Xia, Q., 2014. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in *Bombyx mori*. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep04489>
- Ma, Y., Jia, Y., Chen, L., Ezeogu, L., Yu, B., Xu, N., Liao, D.J., 2015. Weaknesses and Pitfalls of Using Mice and Rats in Cancer Chemoprevention Studies. *J. Cancer* 6, 1058–65. <https://doi.org/10.7150/jca.12519>
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., Gräslund, A., 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* 2011, 414729. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>
- Maehama, T., Dixon, J.E., 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 13375–13378. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.22.13375>
- Mäger, I., Langel, K., Lehto, T., Eiríksdóttir, E., Langel, Ü., 2012. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.020>
- Maity, S.K., Stahl, P., Hensel, A., Knauer, S., Hirschhäuser, C., Schmuck, C., 2020. Cancer-Cell-Specific Drug Delivery by a Tumor-Homing CPP-Gossypol Conjugate Employing a Tracelessly Cleavable Linker. *Chem. - A Eur. J.* 26, 3010–3015. <https://doi.org/10.1002/chem.201905159>
- Major, F.J., Blessing, J.A., Silverberg, S.G., Morrow, C.P., Creasman, W.T., Currie, J.L., Yordan, E., Brady, M.F., 1993. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 71, 1702–1709. <https://doi.org/10.1002/CNCR.2820710440>
- Majumder, B., Baraneedharan, U., Thiyagarajan, S., Radhakrishnan, P., Narasimhan, H., Dhandapani, M., Brijwani, N., Pinto, D.D., Prasath, A., Shanthappa, B.U., Thayakumar, A., Surendran, R., Babu, G.K., Shenoy, A.M., Kuriakose, M.A., Bergthold, G., Horowitz, P., Loda, M., Beroukhim, R., Agarwal, S., Sengupta, S., Sundaram, M., Majumder, P.K., 2015. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat. Commun.* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7169>
- Mäkinen, N., Aavikko, M., Heikkinen, T., Taipale, M., Taipale, J., Koivisto-Korander, R., Bützow, R., Vahteristo, P., 2016. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. *PLoS Genet.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005850>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (80-.). 339, 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Manfredi, J.J., 2010. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev.* 24, 1580–1589. <https://doi.org/10.1101/GAD.1941710>
- Mao, J.H., Wu, D., Perez-Losada, J., Nagase, H., DelRosario, R., Balmain, A., 2003. Genetic interactions between Pten and p53 in radiation-induced lymphoma development. *Oncogene* 22, 8379–8385. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207083>
- Marbaix, E., Kokorine, I., Henriët, P., Donnez, J., Courtoy, P.J., Eeckhout, Y., 1995. The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem. J.* 305, 1027–1030. <https://doi.org/10.1042/bj3051027>
- Marciniak, R.A., Calnan, B.J., Frankel, A.D., Sharp, P.A., 1990. HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell* 63, 791–802. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90145-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90145-5)
- Maresch, R., Mueller, S., Veltkamp, C., Öllinger, R., Friedrich, M., Heid, I., Steiger, K., Weber, J., Engleitner, T., Barenboim, M., Klein, S., Louzada, S., Banerjee, R., Strong, A., Stauber, T., Gross, N., Geumann, U., Lange, S., Ringelhan, M., Varela, I., Unger, K., Yang, F., Schmid, R.M., Vassiliou, G.S., Braren, R., Schneider, G., Heikenwalder, M., Bradley, A., Saur, D., Rad, R., 2016. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10770>
- Marino, S., Vooijs, M., Van Der Gulden, H., Jonkers, J., Berns, A., 2000. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14, 994–1004. <https://doi.org/10.1101/gad.14.8.994>

- Marquardt, R.M., Kim, T.H., Shin, J.H., Jeong, J.W., 2019. Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: What goes wrong in endometriosis? *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20153822>
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J., 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.* 11, 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J., 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* (80-). 322, 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- Maru, Y., Hippo, Y., 2021. Two-Way Development of the Genetic Model for Endometrial Tumorigenesis in Mice: Current and Future Perspectives. *Front. Genet.* 12, 798628. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.798628>
- Maru, Y., Tanaka, N., Itami, M., Hippo, Y., 2019. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol. Oncol.* 154, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.05.005>
- Maru, Y., Tanaka, N., Tatsumi, Y., Nakamura, Y., Itami, M., Hippo, Y., 2021. Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis* 10, 46. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00337-8>
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., Sato, T., 2015. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.* 21, 256–262. <https://doi.org/10.1038/nm.3802>
- Matias-Guiu, X., Davidson, B., 2014. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch.* 464, 315–331. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1509-y>
- Matsuo, K., Takazawa, Y., Ross, M.S., Elishaev, E., Podzielinski, I., Yunokawa, M., Sheridan, T.B., Bush, S.H., Klobocista, M.M., Blake, E.A., Takano, T., Matsuzaki, S., Baba, T., Satoh, S., Shida, M., Nishikawa, T., Ikeda, Y., Adachi, S., Yokoyama, T., Takekuma, M., Fujiwara, K., Hazama, Y., Kadogami, D., Moffitt, M.N., Takeuchi, S., Nishimura, M., Iwasaki, K., Ushioda, N., Johnson, M.S., Yoshida, M., Hakam, A., Li, S.W., Richmond, A.M., Machida, H., Mhawech-Fauceglia, P., Ueda, Y., Yoshino, K., Yamaguchi, K., Oishi, T., Kajiwara, H., Hasegawa, K., Yasuda, M., Kawana, K., Suda, K., Miyake, T.M., Moriya, T., Yuba, Y., Morgan, T., Fukagawa, T., Wakatsuki, A., Sugiyama, T., Pejovic, T., Nagano, T., Shimoya, K., Andoh, M., Shiki, Y., Enomoto, T., Sasaki, T., Fujiwara, K., Mikami, M., Shimada, M., Konishi, I., Kimura, T., Post, M.D., Shahzad, M.M., Im, D.D., Yoshida, H., Omatu, K., Ueland, F.R., Kelley, J.L., Karabakhtsian, R.G., Roman, L.D., 2016. Significance of histologic pattern of carcinoma and sarcoma components on survival outcomes of uterine carcinosarcoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 27, 1257–1266. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW161>
- Matsuzaki, K., Sugishita, K.I., Miyajima, K., 1999. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 449, 221–224. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00443-3)
- Maurisse, R., De Semir, D., Emamekhoo, H., Bedayat, B., Abdolmohammadi, A., Parsi, H., Gruenert, D.C., 2010. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-9>
- McCarty, N.S., Graham, A.E., Studená, L., Ledesma-Amaro, R., 2020. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15053-x>
- McCluggage, W.G., 2002. Uterine Carcinosarcomas (Malignant Mixed Müllerian Tumours): A Review with Special Emphasis on the Controversies in Management 55, 321–325. <https://doi.org/10.1136/JCP.55.5.321>
- McCluggage, W.G., 2002. Malignant biphasic uterine tumours: carcinosarcomas or metaplastic carcinomas? *J Clin Pathol May;55(5):*
- McCluggage, W.G., Sumathi, V.P., Maxwell, P., 2001. CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology* 39, 273–278. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2559.2001.01215.X>
- McConechy, M.K., Anglesio, M.S., Kalloger, S.E., Yang, W., Senz, J., Chow, C., Heravi-Moussavi, A., Morin, G.B., Mes-Masson, A.M., Bowtell, D., Chenevix-Trench, G., DeFazio, A., Gertig, D., Green, A., Webb, P., Carey, M.S., McAlpine, J.N., Kwon, J.S., Prentice, L.M., Boyd, N., Shah, S.P., Gilks, C.B., Huntsman, D.G., 2011. Subtype-specific mutation of PPP2R1A in endometrial and ovarian carcinomas. *J. Pathol.* 223, 567–

573. <https://doi.org/10.1002/PATH.2848>

McConechy, M.K., Hoang, L.N., Chui, M.H., Senz, J., Yang, W., Rozenberg, N., Mackenzie, R., McAlpine, J.N., Huntsman, D.G., Clarke, B.A., Gilks, C.B., Lee, C.-H.H., 2015. In-depth molecular profiling of the biphasic components of uterine carcinosarcomas. *J. Pathol. Clin. Res.* 1.

McLellan, M.A., Rosenthal, N.A., Pinto, A.R., 2017. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>

McMaster, M.T., Teng, C.T., Dey, S.K., Andrews, G.K., 1992. Lactoferrin in the mouse uterus: Analyses of the preimplantation period and regulation by ovarian steroids. *Mol. Endocrinol.* 6, 101–111. <https://doi.org/10.1210/mend.6.1.1738363>

Mcmillin, D.W., Negri, J.M., Mitsiades, C.S., 2013. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 217–228. <https://doi.org/10.1038/NRD3870>

Megino-Luque, C., Sisó, P., Mota-Martorell, N., Navaridas, R., de la Rosa, I., Urdanibia, I., Albertí-Valls, M., Santacana, M., Pinyol, M., Bonifaci, N., Macià, A., Llobet-Navas, D., Gatiús, S., Matias-Guiu, X., Eritja, N., 2022. ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma. *Mol. Oncol.* <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13193>

Mehta, F.F., Son, J., Hewitt, S.C., Jang, E., Lydon, J.P., Korach, K.S., Chung, S.H., 2016. Distinct functions and regulation of epithelial progesterone receptor in the mouse cervix, vagina, and uterus. *Oncotarget* 7, 17455–17467. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8159>

Merritt, M.A., Cramer, D.W., 2011. Molecular pathogenesis of endometrial and ovarian cancer. *Cancer Biomarkers* 9, 287–305. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0167>

Merritt, M.A., Parsons, P.G., Newton, T.R., Martyn, A.C., Webb, P.M., Green, A.C., Papadimos, D.J., Boyle, G.M., 2009. Expression profiling identifies genes involved in neoplastic transformation of serous ovarian cancer. *BMC Cancer* 9, 378. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-378>

Messinis, I.E., Messini, C.I., Dafopoulos, K., 2014. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod. Biomed. Online* 28, 714–722.

<https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2014.02.003>

Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., Chambon, P., 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6991–6995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6991>

Michael M Braun, Erika A Overbeek-Wager, Robert J Grumbo, 2016. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician* 93(6), 468.

Michel, M., Kaps, L., Maderer, A., Galle, P.R., Moehler, M., 2021. The Role of p53 Dysfunction in Colorectal Cancer and Its Implication for Therapy. *Cancers (Basel)*. 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13102296>

Michels, B.E., Mosa, M.H., Streibl, B.I., Zhan, T., Menche, C., Abou-El-Ardat, K., Darvishi, T., Czlonka, E., Wagner, S., Winter, J., Medyouf, H., Boutros, M., Farin, H.F., 2020. Pooled In Vitro and In Vivo CRISPR-Cas9 Screening Identifies Tumor Suppressors in Human Colon Organoids. *Cell Stem Cell* 26, 782–792.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.04.003>

Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Incani, U.C., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., Nuzzo, C.M.A., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., Ciuffreda, L., 2015. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/FONC.2015.00024>

Miller, C., Sassoon, D.A., 1998. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development* 125, 3201–3211. <https://doi.org/10.1242/dev.125.16.3201>

Miller, J.B., Zhang, S., Kos, P., Xiong, H., Zhou, K., Perelman, S.S., Zhu, H., Siegwart, D.J., 2017. Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56, 1059–1063. <https://doi.org/10.1002/anie.201610209>

Milletti, F., 2012. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17, 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>

Mimitou, E.P., Cheng, A., Montalbano, A., Hao, S., Stoeckius, M., Legut, M., Roush, T., Herrera, A., Papalex, E., Ouyang, Z., Satija, R., Sanjana, N.E., Koralov, S.B., Smibert, P., 2019. Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells. *Nat. Methods* 16,

409–412. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0392-0>

Minchinton, A.I., Tannock, I.F., 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* 6, 583–592. <https://doi.org/10.1038/nrc1893>

Mirantes, C., Dosil, M.A., Hills, D., Yang, J., Eritja, N., Santacana, M., Gatus, S., Vilardell, F., Medvinsky, A., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2016. Deletion of Pten in CD45-expressing cells leads to development of T-cell lymphoblastic lymphoma but not myeloid malignancies. *Blood* 127, 1907–1911. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-09-669036>

Mirantes, C., Eritja, N., Dosil, M.A., Santacana, M., Pallares, J., Gatus, S., Bergadà, L., Maiques, O., Matias-Guiu, X., Dolcet, X., 2013a. An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias 6, 710–720.

Mirantes, C., Espinosa, I., Ferrer, I., Dolcet, X., Prat, J., Matias-Guiu, X., 2013b. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Hum. Pathol.* 44, 1973–1981. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2013.04.009>

Mittag, J., Winterhager, E., Bauer, K., Grümmer, R., 2007. Congenital hypothyroid female pax8-deficient mice are infertile despite thyroid hormone replacement therapy. *Endocrinology* 148, 719–725. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-1054>

Modzelewski, A.J., Chen, S., Willis, B.J., Lloyd, K.C.K., Wood, J.A., He, L., 2018. Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nat. Protoc.* 13, 1253–1274. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.012>

Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E., 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>

Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., Juez, G., 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36, 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>

Mojica, F.J.M., Juez, G., Rodríguez-Valera, F., 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* 9, 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2958.1993.tb01721.x

Monsivais, D., Matzuk, M.M., Pangas, S.A., 2017. The TGF- β family in the reproductive tract. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022251>

Monsivais, D., Peng, J., Kang, Y., Matzuk, M.M., 2019. Activin-like kinase 5 (ALK5) inactivation in the mouse uterus results in metastatic endometrial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 3883–3892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806838116>

Montagna, C., Petris, G., Casini, A., Maule, G., Franceschini, G.M., Zanella, I., Conti, L., Arnoldi, F., Burrone, O.R., Zentilin, L., Zacchigna, S., Giacca, M., Cereseto, A., 2018. VSV-G-Enveloped Vesicles for Traceless Delivery of CRISPR-Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 12, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.010>

Montagutelli, X., 2000. Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11. https://doi.org/10.1681/asn.v11suppl_2s101

Montrose, K., Yang, Y., Krissansen, G.W., 2014. The tetrapeptide core of the carrier peptide Xentry is cell-penetrating: Novel activatable forms of Xentry. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep04900>

Montrose, K., Yang, Y., Sun, X., Wiles, S., Krissansen, G.W., 2013. Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs. *Sci. Rep.* 3. <https://doi.org/10.1038/srep01661>

Moore, K., Brewer, M.A., 2017. Endometrial Cancer: Is This a New Disease? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. book. Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* 37, 435–442. https://doi.org/10.1200/EDBK_175666

Moore, M., McCluggage, W.G., 2020. Uterine endometrial stromal tumors with limited infiltration: First report of a case series indicating potential for malignant behavior. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 39, 221–226. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000593>

Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sánchez, C., Sarrió, D., Cassia, R., García-Rostán, G., Prat, J., Guo, M., Herman, J.G., Matías-Guiu, X., Esteller, M., Palacios, J., 2002. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21, 7981–7990. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205924>

- Morita, S., Noguchi, H., Horii, T., Nakabayashi, K., Kimura, M., Okamura, K., Sakai, A., Nakashima, H., Hata, K., Nakashima, K., Hatada, I., 2016. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat. Biotechnol.* 34, 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/nbt.3658>
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., Divita, G., 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 2730–2736. <https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2730>
- Morton, C.L., Houghton, P.J., 2007. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 2, 247–250. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>
- Morton, J.J., Bird, G., Refaeli, Y., Jimeno, A., 2016. Humanized mouse xenograft models: Narrowing the tumor-microenvironment gap. *Cancer Res.* 76, 6153–6158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1260>
- Moschos, S.A., Jones, S.W., Perry, M.M., Williams, A.E., Erjefalt, J.S., Turner, J.J., Barnes, P.J., Sproat, B.S., Gait, M.J., Lindsay, M.A., 2007. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug. Chem.* 18, 1450–1459. <https://doi.org/10.1021/bc070077d>
- Mota, A., Oltra, S.S., Selenica, P., Moiola, C.P., Casas-Arozamena, C., López-Gil, C., Diaz, E., Gatiús, S., Ruiz-Miro, M., Calvo, A., Rojo-Sebastián, A., Hurtado, P., Piñeiro, R., Colas, E., Gil-Moreno, A., Reis-Filho, J.S., Muínelo-Romay, L., Abal, M., Matias-Guiu, X., Weigelt, B., Moreno-Bueno, G., 2022. Intratumor genetic heterogeneity and clonal evolution to decode endometrial cancer progression. *Oncogene* 41, 1835–1850. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02221-0>
- Mout, R., Ray, M., Lee, Y.W., Scaletti, F., Rotello, V.M., 2017a. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjug. Chem.* 28, 880–884. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00057>
- Mout, R., Ray, M., Yesilbag Tonga, G., Lee, Y.W., Tay, T., Sasaki, K., Rotello, V.M., 2017b. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano* 11, 2452–2458. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b07600>
- Mout, R., Rotello, V.M., 2017. Cytosolic and Nuclear Delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for Gene Editing Using Arginine Functionalized Gold Nanoparticles. *Bio-protocol* 7. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2586>
- Murali, R., Soslow, R.A., Weigelt, B., 2014. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet. Oncol.* 15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6)
- Muratovska, A., Eccles, M.R., 2004. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* 558, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01505-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01505-9)
- Murray, R.G., Murray, A.S., Pizzo, A., 1965. The fine structure of mitosis in rat thymic lymphocytes. *J. Cell Biol.* 26, 601–619. <https://doi.org/10.1083/JCB.26.2.601>
- Mutter, G.L., Lin, M.C., Fitzgerald, J.T., Kum, J.B., Baak, J.P.A., Lees, J.A., Weng, L.P., Eng, C., 2000. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 924–931. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.11.924>
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, N., Luo, L., 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse 45, 593–605.
- Nagaoka, T., Onodera, H., Hayashi, Y., Maekawa, A., 1995. Influence of high-fat diets on the occurrence of spontaneous uterine endometrial adenocarcinomas in rats. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 15, 167–177. <https://doi.org/10.1002/TCM.1770150403>
- Nagaoka, T., Onodera, H., Matsushima, Y., Todate, A., Shibusaki, M., Ogasawara, H., Maekawa, A., 1990. Spontaneous uterine adenocarcinomas in aged rats and their relation to endocrine imbalance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116, 623–628. <https://doi.org/10.1007/BF01637084>
- Nagaoka, T., Takegawa, K., Takeuchi, M., Maekawa, A., 2000. Effects of reproduction on spontaneous development of endometrial adenocarcinomas and mammary tumors in Donryu rats. *Japanese J. Cancer Res.* 91, 375–382. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00955.x>
- Nagaoka, T., Takeuchi, M., Onodera, H., Matsushima, Y., Ando, J., Maekawa, A., 1994. Sequential Observation of Spontaneous Endometrial Adenocarcinoma Development in Donryu Rats. *Toxicol. Pathol.* 22, 261–269. <https://doi.org/10.1177/019262339402200304>

- Nagendra, D.C., Burke, J., Maxwell, G.L., Risinger, J.I., 2012. PPP2R1A mutations are common in the serous type of endometrial cancer. *Mol. Carcinog.* 51, 826–831. <https://doi.org/10.1002/MC.20850>
- Nagy, A., 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B)
- Nain, V., Sahi, S., Verma, A., 2010. CPP-ZFN: A potential DNA-targeting anti-malarial drug. *Malar. J.* 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-258>
- Nakase, I., Tanaka, G., Futaki, S., 2013. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* 9, 855–861. <https://doi.org/10.1039/c2mb25467k>
- Nakasone, E.S., Askautrud, H.A., Kees, T., Park, J.H., Plaks, V., Ewald, A.J., Fein, M., Rasch, M.G., Tan, Y.X., Qiu, J., Park, J., Sinha, P., Bissell, M.J., Frengen, E., Werb, Z., Egeblad, M., 2012. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell* 21, 488–503. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.02.017>
- Nakata, A., Amemura, M., Makino, K., 1989. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* 171, 3553–3556. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989>
- Nakayama, M., Oshima, M., 2019. Mutant p53 in colon cancer. *J. Mol. Cell Biol.* 11, 267–276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
- Nakayama, T., Fish, M.B., Fisher, M., Oomen-Hajagos, J., Thomsen, G.H., Grainger, R.M., 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis* 51, 835–843. <https://doi.org/10.1002/dvg.22720>
- NCBI Trp53-ps transformation related protein 53, pseudogene [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22060> (accessed 5.15.22).
- NCT00451256 Safety and Efficacy Study of AVI-5126 When Used on Vein Grafts Before Use in Heart by-Pass Graft Surgery (CABG) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00451256> (accessed 5.15.22).
- NCT00802425 Efficacy of AM-111 in Patients With Acute Sensorineural Hearing Loss - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00802425> (accessed 5.15.22).
- NCT01015235 Safety and Efficacy Study of KAI-1678 to Treat Subjects With Postoperative Pain - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01015235> (accessed 5.15.22).
- NCT01135108 Safety and Efficacy Study of KAI-1678 to Treat Pain in Subjects With Spinal Cord Injury - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01135108> (accessed 5.15.22).
- NCT02235272 Efficacy and Safety of XG-102 in Reduction of Post-cataract Surgery Intraocular Inflammation - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document]. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02235272> (accessed 5.15.22).
- Nelson, C.E., Wu, Y., Gemberling, M.P., Oliver, M.L., Waller, M.A., Bohning, J.D., Robinson-Hamm, J.N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R.M., Collier, J.H., Asokan, A., Gersbach, C.A., 2019. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 25, 427–432. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0344-3>
- Newbold, R.R., Bullock, B.C., McLachlan, J.A., 1990. Uterine Adenocarcinoma in Mice following Developmental Treatment with Estrogens: A Model for Hormonal Carcinogenesis. *Cancer Res.* 50, 7677–7681.
- Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Burgos, E., Bullock, B.C., 1997. Uterine carcinoma in mice treated neonatally with Tamoxifen. *Carcinogenesis* 18, 2293–2298. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.12.2293>
- Newbold, R.R., Liehr, J.G., 2000. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res.* 60, 235–237.
- Newbold, R.R., Padilla Banks, E., Bullock, B., Jefferson, W.N., 2001. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with

genistein. *Cancer Res.* 61, 4325–4328.

Ngô, C., Brugier, C., Plancher, C., De La Rochefordière, A., Alran, S., Féron, J.G., Malhaire, C., Scholl, S., Sastre, X., Rouzier, R., Fourchotte, V., Institut Curie, 2014. Clinico-pathology and prognosis of endometrial cancer in patients previously treated for breast cancer, with or without tamoxifen: a comparative study in 363 patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* 40, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.05.007>

Ni, N., Li, Q., 2017. TGF β superfamily signaling and uterine decidualization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0303-0>

Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O., 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156, 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>

Niwa, K., Hashimoto, M., Morishita, S., Yokoyama, Y., Lian, Z., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T., 2000. Preventive effects of danazol on endometrial carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 158, 133–139. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00497-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00497-3)

Niwa, K., Murase, T., Furui, T., Morishita, S., Mori, Hidehiro, Tanaka, T., Mori, Hideki, Tamaya, T., 1993. Enhancing Effects of Estrogens on Endometrial Carcinogenesis Initiated by N-Methyl-N-nitrosourea in ICR Mice. *Japanese J. Cancer Res.* 84, 951–955. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1993.tb00183.x>

Niwa, K., Tanaka, T., Mori, Hideki, Yokoyama, Y., Furui, T., Mori, Hidehiro, Teruhiko, T., 1991. Rapid Induction of Endometrial Carcinoma in ICR Mice Treated with N-Methyl-N-nitrosourea and 17 β -Estradiol. *Japanese J. Cancer Res.* 82, 1391–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1991.tb01811.x>

Nordlander, C., Samuelson, E., Klinga-Levan, K., Behboudi, A., 2008. Recurrent chromosome 10 aberrations and Tp53 mutations in rat endometrial adenocarcinomas. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 519–525. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_52

Noureddine, A., Maestas-Olguin, A., Saada, E.A., LaBauve, A.E., Agola, J.O., Baty, K.E., Howard, T., Sabo, J.K., Espinoza, C.R.S., Doudna, J.A., Schoeniger, J.S., Butler, K.S., Negrete, O.A., Brinker, C.J., Serda, R.E., 2020. Engineering of monosized lipid-coated mesoporous silica nanoparticles for CRISPR delivery. *Acta Biomater.* 114, 358–368.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.027>

Nucci, M.R., O'Connell, J.T., Huettner, P.C., Cviko, A., Sun, D., Quade, B.J., 2001. h-Caldesmon expression effectively distinguishes endometrial stromal tumors from uterine smooth muscle tumors 25, 455–463. <https://doi.org/10.1097/00000478-200104000-00004>

Nyen, T. Van, Moiola, C.P., Colas, E., Annibali, D., Amant, F., 2018. Modeling endometrial cancer: Past, present, and future. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082348>

Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., Bienert, M., 1998. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1414, 127–139. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00161-8)

Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., Arifin, N., Nakamura, S., Wada, K., Gurumurthy, C.B., 2018. I-GONAD: A robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* 19. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1400-x>

Okada, M., Chikuma, S., Kondo, T., Hibino, S., Machiyama, H., Yokosuka, T., Nakano, M., Yoshimura, A., 2017. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. *Cell Rep.* 20, 1017–1028. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.027>

Okuda, T., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Nagatsuka, M., Morioka, M., Hayashi, M., Okai, T., 2010. Genetics of endometrial cancers. *Obstet. Gynecol. Int.* 2010, 984013. <https://doi.org/10.1155/2010/984013>

Oliva, E., Young, R.H., Amin, M.B., Clement, P.B., 2002. An immunohistochemical analysis of endometrial stromal and smooth muscle tumors of the uterus: a study of 54 cases emphasizing the importance of using a panel because of overlap in immunoreactivity for individual antibodies 26, 403–412. <https://doi.org/10.1097/00000478-200204000-00001>

Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P., 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.

Onogi, K., Niwa, K., Tang, L., Yun, W.U., Mori, H., Tamaya, T., 2006. Inhibitory effects of Hochu-ekki-to on endometrial carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and 17 β -

- estradiol in mice. *Oncol. Rep.* 16, 1343–1348. <https://doi.org/10.3892/or.16.6.1343>
- Opolskiene, G., Sladkevicius, P., Valentin, L., 2007. Ultrasound assessment of endometrial morphology and vascularity to predict endometrial malignancy in women with postmenopausal bleeding and sonographic endometrial thickness \geq 4.5 mm. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 30, 332–340. <https://doi.org/10.1002/UOG.4104>
- Osterman-Golkar, S., 1974. Reaction kinetics of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 24, 219–226. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(74\)90170-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(74)90170-5)
- Ott, P.A., Bang, Y.J., Berton-Rigaud, D., Elez, E., Pishvaian, M.J., Rugo, H.S., Puzanov, I., Mehnert, J.M., Aung, K.L., Lopez, J., Carrigan, M., Saraf, S., Chen, M., Soria, J.C., 2017. Safety and antitumor activity of pembrolizumab in advanced programmed death ligand 1–positive endometrial cancer: Results from the KEYNOTE-028 study. *J. Clin. Oncol.* 35, 2535–2541. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.5952>
- Oza, A.M., Elit, L., Tsao, M.S., Kamel-Reid, S., Biagi, J., Provencher, D.M., Gotlieb, W.H., Hoskins, P.J., Ghatage, P., Tonkin, K.S., Mackay, H.J., Mazurka, J., Sederias, J., Ivy, P., Dancey, J.E., Eisenhauer, E.A., 2011. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: A trial of the NCIC Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 29, 3278–3285. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1578>
- Ozguldez, H.O., Fan, R., Bedzhov, I., 2020. Placental gene editing via trophectoderm-specific Tat-Cre/loxP recombination. *Dev.* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.190371>
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., Stayton, P.S., 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 581–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1775>
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., Williams, R.L., 2000. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 103, 931–944. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00196-3)
- Palanikumar, L., Al-Hosani, S., Kalmouni, M., Saleh, H.O., Magzoub, M., 2020. Hexokinase II-Derived Cell-Penetrating Peptide Mediates Delivery of MicroRNA Mimic for Cancer-Selective Cytotoxicity. *Biochemistry* 59, 2259–2273. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00141>
- Pan, J., Cheng, L., Bi, X., Zhang, X., Liu, S., Bai, X., Li, F., Zhao, A.Z., 2015. Elevation of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Attenuates PTEN-deficiency Induced Endometrial Cancer Development through Regulation of COX-2 and PGE2 Production. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/SREP14958>
- Pan, M., Ganjoo, K., Karam, A., 2021. Rapid Response of a BRCA2/TP53/PTEN-Deleted Metastatic Uterine Leiomyosarcoma to Olaparib: A Case Report. *Perm. J.* 25. <https://doi.org/10.7812/TPP.20.251>
- Papa, A., Wan, L., Bonora, M., Salmena, L., Song, M.S., Hobbs, R.M., Lunardi, A., Webster, K., Ng, C., Newton, R.H., Knoblauch, N., Guarnerio, J., Ito, K., Turka, L.A., Beck, A.H., Pinton, P., Bronson, R.T., Wei, W., Pandolfi, P.P., 2014. Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell* 157, 595–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.027>
- Park, A., Hong, P., Won, S.T., Thibault, P.A., Vigant, F., Oguntuyo, K.Y., Taft, J.D., Lee, B., 2016. Sendai virus, an RNA virus with no risk of genomic integration, delivers CRISPR/Cas9 for efficient gene editing. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16057. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.57>
- Park, J., Lim, K., Kim, J.S., Bae, S., 2017. Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics* 33, 286–288. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW561>
- Parkes, C., Kamal, A., Valentijn, A.J., Alnafakh, R., Gross, S.R., Barraclough, R., Moss, D., Kirwan, J., Hapangama, D.K., 2018. Assessing Estrogen-Induced Proliferative Response in an Endometrial Cancer Cell Line Using a Universally Applicable Methodological Guide. *Int. J. Gynecol. Cancer* 28, 122–133. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001121>
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C.P., Smith, S.A., Macphee, C.H., 2001. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr. Biol.* 11, 764–768. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00225-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00225-1)
- Patel, L.N., Zaro, J.L., Shen, W.C., 2007. Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* 24, 1977–1992. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9303-7>

- Pauli, C., Hopkins, B.D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L., Rosati, R., McNary, T.J., Churakova, Y., Cheung, C., Triscott, J., Pisapia, D., Rao, R., Mosquera, J.M., Robinson, B., Faltas, B.M., Emerling, B.E., Gadi, V.K., Bernard, B., Elemento, O., Beltran, H., Demichelis, F., Kemp, C.J., Grandori, C., Cantley, L.C., Rubin, M.A., 2017. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discov.* 7, 462–477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>
- Pavel-Dinu, M., Wiebking, V., Dejene, B.T., Srifa, W., Mantri, S., Nicolas, C.E., Lee, C., Bao, G., Kildebeck, E.J., Punjya, N., Sindhu, C., Inlay, M.A., Saxena, N., DeRavin, S.S., Malech, H., Roncarolo, M.G., Weinberg, K.I., Porteus, M.H., 2019. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09614-y>
- Peña, C.G., Nakada, Y., Saatcioglu, H.D., Aloisio, G.M., Cuevas, I., Zhang, S., Miller, D.S., Lea, J.S., Wong, K.K., DeBerardinis, R.J., Amelio, A.L., Brekken, R.A., Castrillon, D.H., 2015. LKB1 loss promotes endometrial cancer progression via CCL2-dependent macrophage recruitment. *J. Clin. Invest.* 125, 4063–4076. <https://doi.org/10.1172/JCI82152>
- Peng, H., Tang, J., Zheng, R., Guo, G., Dong, A., Wang, Y., Yang, W., 2017. Nuclear-Targeted Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Photothermal Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* 6. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601289>
- Peng, J., Monsivais, D., You, R., Zhong, H., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., 2015. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5098–E5107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514498112>
- Peng, S., Cai, J., Bao, S., 2021. CMBs carrying PTX and CRISPR/Cas9 targeting C-erbB-2 plasmids interfere with endometrial cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 24. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12470>
- Perets, R., Wyant, G.A., Muto, K.W., Bijron, J.G., Poole, B.B., Chin, K.T., Chen, J.Y.H., Ohman, A.W., Stepule, C.D., Kwak, S., Karst, A.M., Hirsch, M.S., Setlur, S.R., Crum, C.P., Dinulescu, D.M., Drapkin, R., 2013. Transformation of the Fallopian Tube Secretory Epithelium Leads to High-Grade Serous Ovarian Cancer in Brca;Tp53;Pten Models. *Cancer Cell* 24, 751–765. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.013>
- Petit, F.G., Jamin, S.P., Kurihara, I., Behringer, R.R., DeMayo, F.J., Tsai, M.J., Tsai, S.Y., 2007. Deletion of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in uterus leads to placental deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6293–6298. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702039104>
- Peyrou, M., Bourgoin, L., Foti, M., 2010. PTEN in liver diseases and cancer. *World J. Gastroenterol.* 16, 4627–4633. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i37.4627>
- Pezzicoli, G., Moscaritolo, F., Silvestris, E., Silvestris, F., Cormio, G., Porta, C., D'Oronzo, S., 2021. Uterine carcinosarcoma: An overview. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 163. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103369>
- Phillips, T.J., Hen, R., Crabbe, J.C., 1999. Complications associated with genetic background effects in research using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 147, 5–7. <https://doi.org/10.1007/s002130051128>
- Pilarski, R., Burt, R., Kohlman, W., Pho, L., Shannon, K.M., Swisher, E., 2013. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: Systematic review and revised diagnostic criteria. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1607–1616. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt277>
- Pineda, M.J., Lu, Z., Cao, D., Kim, J.J., 2015. Influence of Cancer-Associated Endometrial Stromal Cells on Hormone-Driven Endometrial Tumor Growth. *Horm. Cancer* 6, 131–141. <https://doi.org/10.1007/s12672-015-0223-4>
- Piotrowski-Daspit, A.S., Glaze, P.M., Saltzman, W.M., 2018. Debugging the genetic code: non-viral in vivo delivery of therapeutic genome editing technologies. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 7, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.08.002>
- Pitt, J.A., Feng, L., Abbott, B.D., Schmid, J., Batt, R.E., Costich, T.G., Koury, S.T., Bofinger, D.P., 2001. Expression of AhR and ARNT mRNA in cultured human endometrial explants exposed to TCDD. *Toxicol. Sci.* 62, 289–298. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.289>
- Piulats, J.M., Guerra, E., Gil-Martín, M., Roman-Canal, B., Gatiús, S., Sanz-Pamplona, R., Velasco, A., Vidal, A., Matias-Guiu, X., 2017. Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 145, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.12.015>
- Planchon, S.M., Waite, K.A., Eng, C., 2008. The nuclear affairs of PTEN. *J. Cell Sci.* 121, 249–253. <https://doi.org/10.1242/JCS.022459>

- Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., Dahlman, J.E., Parnas, O., Eisenhaure, T.M., Jovanovic, M., Graham, D.B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R.J., Langer, R., Anderson, D.G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., Sharp, P.A., Zhang, F., 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159, 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>
- Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Lin, B., Hong, A.W., Chun, J. V., Guan, K.L., 2016. Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol. Cell* 64, 993–1008. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.034>
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., Parsons, R., 1999. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1563–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1563>
- Politi, K., Szabolcs, M., Fisher, P., Kljuic, A., Ludwig, T., Efstratiadis, A., 2004. A Mouse Model of Uterine Leiomyosarcoma. *Am. J. Pathol.* 164, 325–336. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63122-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63122-7)
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., Langel, U., 1998. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12, 67–77. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.1.67>
- Poola, P.K., Afzal, M.I., Yoo, Y., Kim, K.H., Chung, E., 2019. Light sheet microscopy for histopathology applications. *Biomed. Eng. Lett.* 9, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s13534-019-00122-y>
- Poppleton, H.M., Edwin, F., Jaggar, L., Ray, R., Johnson, L.R., Patel, T.B., 2004. Sprouty regulates cell migration by inhibiting the activation of Rac1 GTPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.070>
- Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G., 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Pradip, D., Jennifer, A., Nandini, D., 2021. Cancer-associated fibroblasts in conversation with tumor cells in endometrial cancers: A partner in crime. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22179121>
- Protein atlas The human pathology proteome - The Human Protein Atlas [WWW Document]. URL <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/pathology> (accessed 5.15.22).
- Pulido, R., 2015. PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods* 77–78, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.009>
- Puria, R., Sahi, S., Nain, V., 2012. HER21 breast cancer therapy: By CPP-ZFN mediated targeting of mTOR? *Technol. Cancer Res. Treat.* 11, 175–180. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500247>
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., Lim, W.A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Qin, P., Parlak, M., Kuscu, C., Bandaria, J., Mir, M., Szlachta, K., Singh, R., Darzacq, X., Yildiz, A., Adli, M., 2017. Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14725>
- R L Arnett-Mansfield, A deFazio, G V Wain, R C Jaworski, K Byth, P A Mote, C L Clarke, 2001. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res.* 61(11), 4576–4582.
- Rádis-Baptista, G., 2021. Cell-Penetrating Peptides Derived from Animal Venoms and Toxins. *Toxins (Basel)*. 13. <https://doi.org/10.3390/toxins13020147>
- Rádis-Baptista, G., Campelo, I.S., Morlighem, J.É.R.L., Melo, L.M., Freitas, V.J.F., 2017. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis. *J. Biotechnol.* 252, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.002>
- Radisky, E.S., Radisky, D.C., 2010. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 201–212. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9177-x>
- Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A.B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S.K., Kim, H., 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 24, 1020–1027.

<https://doi.org/10.1101/gr.171264.113>

Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E. V., Sharp, P.A., Zhang, F., 2015. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature* 520, 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F., 2013a. XDouble nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013b. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Rangarajan, A., Weinberg, R.A., 2003. Comparative biology of mouse versus human cells: Modelling human cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* 3, 952–959. <https://doi.org/10.1038/nrc1235>

Rayner, E., Van Gool, I.C., Palles, C., Kearsey, S.E., Bosse, T., Tomlinson, I., Church, D.N., 2016. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 71–81. <https://doi.org/10.1038/NRC.2015.12>

Reardon, S.N., King, M.L., II, J.A.M.L., Mann, J.L., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Hayashi, K., 2012. Cdh1 is essential for endometrial differentiation, gland development, and adult function in the mouse uterus. *Biol. Reprod.* 86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.098871>

Regberg, J., Jonas Eriksson, N.K., Langel, U., 2013. Cell-penetrating peptides: From Cell cultures to in vivo applications. *Front. Biosci. - Elit.* 5 E, 509–516. <https://doi.org/10.2741/e632>

Regberg, J., Srimanee, A., Langel, U., 2012. Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 5, 991–1007. <https://doi.org/10.3390/ph5090991>

Rennie, P.S., Nelson, C.C., 1998. Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 401–409. <https://doi.org/10.1023/A:1006121219097>

Reske, J.J., Wilson, M.R., Holladay, J., Siwicki, R.A., Skalski, H., Harkins, S., Adams, M., Risinger, J.I., Hostetter, G., Lin, K.,

Chandler, R.L., 2021. Co-existing TP53 and ARID1A mutations promote aggressive endometrial tumorigenesis 17.

Reviewed by R Vajpeyi, 2005. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *J. Clin. Pathol.* 58.

Riopel, J., Plante, M., Renaud, M.C., Roy, M., Têtu, B., 2005. Lymph node metastases in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Gynecol. Oncol.* 96, 402–406. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2004.10.021>

Risinger, J., Risinger, J.I., Hayes, A.K., Berchuck, A., Barrett, J.C., 1997. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers.

Risinger, J.I., Berchuck, A., Kohler, M.F., Watson, P., Lynch, H.T., Boyd1, J., 1993. Genetic Instability of Microsatellites in Endometrial Carcinoma. *CANCER Res.* 53, 5100–5103.

Rodriguez, A., Tripurani, S.K., Burton, J.C., Clementi, C., Larina, I., Pangas, S.A., 2016. SMAD signaling is required for structural integrity of the female reproductive tract and uterine function during early pregnancy in mice. *Biol. Reprod.* 95. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139477>

Rodriguez, A.C., Vahrenkamp, J.M., Berrett, K.C., Clark, K.A., Guillen, K.P., Scherer, S.D., Yang, C.H., Welm, B.E., Janat-Amsbury, M.M., Graves, B.J., Gertz, J., 2020. ETV4 is necessary for estrogen signaling and growth in endometrial cancer cells. *Cancer Res.* 80, 1234–1245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1382>

Rogers, Z.N., McFarland, C.D., Winters, I.P., Naranjo, S., Chuang, C.H., Petrov, D., Winslow, M.M., 2017. A quantitative and multiplexed approach to uncover the fitness landscape of tumor suppression in vivo. *Nat. Methods* 14, 737–742. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4297>

Rogers, Z.N., McFarland, C.D., Winters, I.P., Seoane, J.A., Brady, J.J., Yoon, S., Curtis, C., Petrov, D.A., Winslow, M.M., 2018. Mapping the in vivo fitness landscape of lung adenocarcinoma tumor suppression in mice. *Nat. Genet.* 50, 483–486. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0083-2>

Rosenblum, D., Gutkin, A., Kedmi, R., Ramishetti, S., Veiga, N., Jacobi, A.M., Schubert, M.S., Friedmann-Morvinski, D., Cohen, Z.R., Behlke, M.A., Lieberman, J., Peer, D., 2020. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci. Adv.* 6. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9450>

- Roshani, L., Mallon, P., Sjostrand, E., Wedekind, D., Szpirer, J., Szpirer, C., Hedrich, H.J., Klinga-Levan, K., 2005. Genetic analysis of susceptibility to endometrial adenocarcinoma in the BDII rat model. *Cancer Genet. Cytogenet.* 158, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.08.034>
- Ross, K.A., Brenza, T.M., Binnebose, A.M., Phanse, Y., Kanthasamy, A.G., Gendelman, H.E., Salem, A.K., Bartholomay, L.C., Bellaire, B.H., Narasimhan, B., 2015. Nano-enabled delivery of diverse payloads across complex biological barriers. *J. Control. Release* 219, 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.039>
- Ross, M.H., Pawlina W., 2020. ROSS Histología. Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular y Celular, 8th ed.
- Roura, L.C., Cabrillo Rodríguez, E., Bajo Arenas, J.M., Ramoneda, J.C.C.A.V., Armengol, E.D., Fabré González, E., Gil Moreno, A., Herruzo Nalda, A., Izquierdo, F., Zamarrigo Crespo, J., 2014. Vol. 1: Ginecología y medicina de la reproducción. *Tratado Ginecol. y Obstet.* 1–165.
- Rudolph, C., Plank, C., Lausier, J., Schillinger, U., Müller, R.H., Rosenecker, J., 2003. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem.* 278, 11411–11418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211891200>
- Ruhul Quddus, M., Sung, C.J., Cunxian Zhang, Dwayne Lawrence, W., 2010. Minor serous and clear cell components adversely affect prognosis in “mixed-type” endometrial carcinomas: a clinicopathologic study of 36 stage-I cases. *Reprod. Sci.* 17, 673–678. <https://doi.org/10.1177/1933719110368433>
- Rui, Y., Wilson, D.R., Choi, J., Varanasi, M., Sanders, K., Karlsson, J., Lim, M., Green, J.J., 2019. Carboxylated branched poly(β -amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* 5. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3255>
- Sahoo, S.S., Zhang, X.D., Hondermarck, H., Tanwar, P.S., 2018. The Emerging Role of the Microenvironment in Endometrial Cancer. *Cancers* (Basel). 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10110408>
- Saito, F., Tashiro, H., To, Y., Ohtake, H., Ohba, T., Suzuki, A., Katabuchi, H., 2011. Mutual contribution of Pten and estrogen to endometrial carcinogenesis in a Pten loxP/loxP mouse model. *Int. J. Gynecol. Cancer* 21, 1343–1349. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31822d2a8a>
- Saito, F., Tashiro, H., Yamaguchi, M., Honda, R., Ohba, T., Suzuki, A., Katabuchi, H., 2016. Development of a mouse model for testing therapeutic agents: the anticancer effect of dienogest on endometrial neoplasms. *Gynecol. Endocrinol.* 32, 403–407. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1124411>
- Sales, K.J., Boddy, S.C., Williams, A.R.W., Anderson, R.A., Jabbour, H.N., 2007. F-prostanoid receptor regulation of fibroblast growth factor 2 signaling in endometrial adenocarcinoma cells. *Endocrinology* 148, 3635–3644. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1517>
- Sales, K.J., Grant, V., Cook, I.H., Maldonado-Pérez, D., Anderson, R.A., Williams, A.R.W., Jabbour, H.N., 2010. Interleukin-11 in endometrial adenocarcinoma is regulated by prostaglandin F2alpha-F-prostanoid receptor interaction via the calcium-calciueurin-nuclear factor of activated T cells pathway and negatively regulated by the regulator of calciueurin-1. *Am. J. Pathol.* 176, 435–45. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090403>
- Salvatore, L., Calegari, M.A., Loupakis, F., Fassan, M., Di Stefano, B., Bensi, M., Bria, E., Tortora, G., 2019. PTEN in colorectal cancer: Shedding light on its role as predictor and target. *Cancers* (Basel). 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11111765>
- Samarnthai, N., Hall, K., Yeh, I.-T., 2010. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstet. Gynecol. Int.* 2010, 162363. <https://doi.org/10.1155/2010/162363>
- Samuelson, E., Hedberg, C., Nilsson, S., Behboudi, A., 2009. Molecular classification of spontaneous endometrial adenocarcinomas in BDII rats. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 99–111. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0185>
- Samuelson, E., Levan, K., Adamovic, T., Levan, G., Horvath, G., 2008a. Recurrent gene amplifications in human type I endometrial adenocarcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 181, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2007.11.006>
- Samuelson, E., Nordlander, C., Levan, G., Behboudi, A., 2008b. Amplification studies of MET and cdk6 in a rat endometrial tumor model and their correlation to human type I endometrial carcinoma tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 511–517. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_51

- Sánchez-Rivera, F.J., Jacks, T., 2015. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* 15, 387–395. <https://doi.org/10.1038/nrc3950>
- Sanchez-Rivera, F.J., Papagiannakopoulos, T., Romero, R., Tammela, T., Bauer, M.R., Bhutkar, A., Joshi, N.S., Subbaraj, L., Bronson, R.T., Xue, W., Jacks, T., 2014. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature* 516, 428–431. <https://doi.org/10.1038/nature13906>
- Sander, J.D., Joung, J.K., 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32, 347–350. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Sanderson, P.A., Critchley, H.O.D., Williams, A.R.W., Arends, M.J., Saunders, P.T.K., 2017. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum. Reprod. Update* 23, 232–254. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMW042>
- Sanjana, N.E., Shalem, O., Zhang, F., 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 11, 783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>
- Sanson, K.R., Hanna, R.E., Hegde, M., Donovan, K.F., Strand, C., Sullender, M.E., Vaimberg, E.W., Goodale, A., Root, D.E., Piccioni, F., Doench, J.G., 2018. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07901-8>
- Santaballa, A., Matías-Guiu, X., Redondo, A., Carballo, N., Gil, M., Gómez, C., Gorostidi, M., Gutierrez, M., González-Martín, A., 2018. SEOM clinical guidelines for endometrial cancer (2017). *Clin. Transl. Oncol.* 20, 29–37. <https://doi.org/10.1007/S12094-017-1809-9>
- Santin, A.P., Furlanetto, T.W., 2011. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J. Thyroid Res.* 2011, 875125. <https://doi.org/10.4061/2011/875125>
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1106148>
- Sasaki, H., Yoshida, K., Hozumi, A., Sasakura, Y., 2014. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 56, 499–510. <https://doi.org/10.1111/dgd.12149>
- Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T., Ohta, Y. Apoptotic Cell Death During the Estrous Cycle in the Rat Uterus and Vagina. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199705\)248:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199705)248:1)
- Savariar, E.N., Felsen, C.N., Nashi, N., Jiang, T., Ellies, L.G., Steinbach, P., Tsien, R.Y., Nguyen, Q.T., 2013. Real-time in Vivo molecular detection of primary tumors and metastases with ratiometric activatable cell-penetrating peptides. *Cancer Res.* 73, 855–864. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2969>
- Sawada, M., Tsuda, H., Kimura, M., Okamoto, S., Kita, T., Kasamatsu, T., Yamada, T., Kikuchi, Y., Honjo, H., Matsubara, O., 2003. Different expression patterns of KIT, EGFR, and HER-2 (c-erbB-2) oncoproteins between epithelial and mesenchymal components in uterine carcinosarcoma. *Cancer Sci.* 94, 986–991. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2003.TB01389.X>
- Sawant, R., Torchilin, V., 2010. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol. Biosyst.* 6, 628–640. <https://doi.org/10.1039/b916297f>
- Schaefer, I.M., Hornick, J.L., Sholl, L.M., Quade, B.J., Nucci, M.R., Parra-Herran, C., 2017. Abnormal p53 and p16 staining patterns distinguish uterine leiomyosarcoma from inflammatory myofibroblastic tumour. *Histopathology* 70, 1138–1146. <https://doi.org/10.1111/his.13176>
- Schäfer, W.R., Fischer, L., Roth, K., Jüllig, A.K., Stuckenschneider, J.E., Schwartz, P., Weimer, M., Orłowski-Volk, M., Hanjalic-Beck, A., Kranz, I., Deppert, W.R., Zahradnik, H.P., 2011. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: A molecular approach. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 255–265. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq095>
- Scharenberg, A., Duchateau, P., Smith, J., 2013. Genome Engineering with TAL-Effector Nucleases and Alternative Modular Nuclease Technologies. *Curr. Gene Ther.* 13, 291–303. <https://doi.org/10.2174/15665232113139990026>
- Schmid-Burgk, J.L., Gao, L., Li, D., Gardner, Z., Strecker, J., Lash, B., Zhang, F., 2020. Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. *Mol. Cell* 78, 794–800.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.023>
- Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G.H., Wong, G.C.L., 2010. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett.* 584, 1806–1813. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.046>

- Schuh, R.S., de Carvalho, T.G., Giugliani, R., Matte, U., Baldo, G., Teixeira, H.F., 2018. Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 122, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.017>
- Schultheis, A.M., Martelotto, L.G., De Filippo, M.R., Piscuglio, S., Ng, C.K.Y., Hussein, Y.R., Reis-Filho, J.S., Soslow, R.A., Weigelt, B., 2016. TP53 Mutational Spectrum in Endometrioid and Serous Endometrial Cancers. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 35, 289–300. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000243>
- Scott, C.L., Mackay, H.J., Haluska, P., 2014. Patient-Derived Xenograft Models in Gynecologic Malignancies. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* e258–e266. https://doi.org/10.14694/edbook_am.2014.34.e258
- Segovia, N., Dosta, P., Cascante, A., Ramos, V., Borrós, S., 2014. Oligopeptide-terminated poly(β -amino ester)s for highly efficient gene delivery and intracellular localization. *Acta Biomater.* 10, 2147–2158. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.054>
- Seino, T., Kawasaki, S., Shimokawa, M., Tamagawa, H., Toshimitsu, K., Fujii, M., Ohta, Y., Matano, M., Nanki, K., Kawasaki, K., Takahashi, S., Sugimoto, S., Iwasaki, E., Takagi, J., Itoi, T., Kitago, M., Kitagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., 2018. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell* 22, 454–467.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.009>
- Semczuk, A., Berbeć, H., Kostuch, M., Cybulski, M., Wojcierowski, J., Baranowski, W., 1998. K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 695–700. <https://doi.org/10.1007/S004320050234>
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica Cáncer de endometrio-útero - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [WWW Document]. URL [https://seom.org/171-Información al Público - Patologías/cancer-de-endometrio-utero](https://seom.org/171-Información%20al%20Público%20-%20Patologías/cancer-de-endometrio-utero) (accessed 5.15.22).
- Sergi Fernández-González ; Manuela Amorós, Stella Maris Arroyuelo, Dib Barazi ; Marta Cararach J. Fernández ; Lluís Fernández de Castillo, Laia Jofre, Laia Pallares ; Marta Palau, M^a Jesús Rodríguez-Domingo Mejora coste efectiva en diagnóstico de cáncer endometrial con la incorporación del análisis molecular GynEC[®]-Dx - Dialnet.
- Sgolastra, F., Kuksin, C.A., Gonzalez-Perez, G., Minter, L.M., Tew, G.N., 2018. Enhanced TAT-Cre Protein Transduction for Efficient Gene Recombination in T cells. *ACS Appl. bio Mater.* 1, 444–451. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00153>
- Shai, A., Segev, Y., Narod, S.A., 2014. Genetics of endometrial cancer. *Fam. Cancer* 13, 499–505. <https://doi.org/10.1007/s10689-014-9722-7>
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., Zhang, F., 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science (80-.)*. 343, 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Zhang, F., 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 16, 299–311. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>
- Shao, X., Somlo, S., Igarashi, P., 2002. Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1837–1846. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000016444.90348.50>
- Sharma, M.M., Shubert, D.E., Sharma, M.M., Lewis, J., McGarrigle, B.P., Bofinger, D.P., Olson, J.R., 2003. Biotransformation of tamoxifen in a human endometrial explant culture model. *Chem. Biol. Interact.* 146, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2003.06.002>
- Sharma, S. V., Haber, D.A., Settleman, J., 2010. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents 10, 241–253.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., Skarnes, W.C., 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods* 11, 399–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., Yin, Y., 2007. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157–170. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.11.042>
- Sherman, M.E., Bur, M.E., Kurman, R.J., 1995. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for

- diverse pathways of tumorigenesis. *Hum. Pathol.* 26, 1268–1274. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90204-X](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90204-X)
- Shimshek, D.R., Kim, J., Hübner, M.R., Spergel, D.J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A.F., Seeburg, P.H., Sprengel, R., 2002. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* 32, 19–26. <https://doi.org/10.1002/gene.10023>
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
- Shultz, L.D., Brehm, M.A., Victor Garcia-Martinez, J., Greiner, D.L., 2012. Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 786–798. <https://doi.org/10.1038/nri3311>
- Silverberg, S.G., Major, F.J., Blessing, J.A., Fetter, B., Askin, F.B., Liao, S.Y., Miller, A., 1990. Carcinosarcoma (malignant mixed mesodermal tumor) of the uterus. A Gynecologic Oncology Group pathologic study of 203 cases. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1097/00004347-199001000-00001>
- Singh G, Puckett Y. Endometrial Hyperplasia .
- Singh, S., Resnick, K.E., 2017. Lynch syndrome and endometrial cancer. *South. Med. J.* 110, 265–269. <https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000000633>
- Siolas, D., Hannon, G.J., 2013. Patient-derived tumor xenografts: Transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res.* 73, 5315–5319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1069>
- Skotland, T., Iversen, T.G., Torgersen, M.L., Sandvig, K., 2015. Cell-penetrating peptides: Possibilities and challenges for drug delivery in vitro and in vivo. *Molecules* 20, 13313–13323. <https://doi.org/10.3390/molecules200713313>
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., Zhang, F., 2016. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* (80-). 351, 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
- Slomovitz, B.M., Broaddus, R.R., Burke, T.W., Sneige, N., Soliman, P.T., Wu, W., Sun, C.C., Munsell, M.F., Gershenson, D.M., Lu, K.H., 2004. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 22, 3126–3132. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.154>
- Slomovitz, B.M., Lu, K.H., Johnston, T., Coleman, R.L., Munsell, M., Broaddus, R.R., Walker, C., Ramondetta, L.M., Burke, T.W., Gershenson, D.M., Wolf, J., 2010. A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer* 116, 5415–5419. <https://doi.org/10.1002/cncr.25515>
- Smith, L., 2011. Good planning and serendipity: Exploiting the Cre/Lox system in the testis. *Reproduction* 141, 151–161. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0404>
- Smurnyy, Y., Cai, M., Wu, H., McWhinnie, E., Tallarico, J.A., Yang, Y., Feng, Y., 2014. DNA sequencing and CRISPR-Cas9 gene editing for target validation in mammalian cells. *Nat. Chem. Biol.* 10, 623–625. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1550>
- Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P., 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 283–296. <https://doi.org/10.1038/NRM3330>
- Sonsteng, K.M., Prigge, J.R., Talago, E.A., June, R.K., Schmidt, E.E., 2014. Hydrodynamic delivery of Cre protein to lineage-mark or time-stamp mouse hepatocytes in situ. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091219>
- Soriano, P., 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [1]. *Nat. Genet.* 21, 70–71. <https://doi.org/10.1038/5007>
- Soslow, R.A., Tornos, C., Park, K.J., Malpica, A., Matias-Guiu, X., Oliva, E., Parkash, V., Carlson, J., Glenn McCluggage, W., Blake Gilks, C., 2019. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 38 Suppl 1, S64–S74. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000518>
- Soyal, S.M., Mukherjee, A., Lee, K.Y.S., Li, J., Li, H., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., 2005. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis* 41, 58–66. <https://doi.org/10.1002/gene.20098>
- Spel, L., Nieuwenhuis, J., Haarsma, R., Stickel, E., Bleijerveld, O.B., Altelaar, M., Boelens, J.J., Brummelkamp, T.R., Nierkens, S., Boes, M., 2018. Nedd4-binding protein 1 and TNFAIP3-interacting protein 1 control MHC-1 display in neuroblastoma. *Cancer Res.* 78, 6621–6631. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0545>

- Staff, S., Aaltonen, M., Huhtala, H., Pylvänäinen, K., Mecklin, J.P., Mäenpää, J., 2016. Endometrial cancer risk factors among Lynch syndrome women: a retrospective cohort study. *Br. J. Cancer* 115, 375–381. <https://doi.org/10.1038/BJC.2016.193>
- Stalmans, S., Bracke, N., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., Burvenich, C., Polis, I., De Spiegeleer, B., 2015. Cell-Penetrating Peptides Selectively Cross the Blood-Brain Barrier *In Vivo*. *PLoS One* 10, e0139652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139652>
- Stambolic, V., Suzuki, A., De la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., Mak, T.W., 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81780-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81780-8)
- Stambolic, V., Tsao, M.S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W.B., Mak, T.W., 2000. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten(+/-) mice. *Cancer Res.* 60, 3605–3611.
- Stavreus-Evers, A., Hovatta, O., Eriksson, H., Landgren, B.M., 2003. Development and characterization of an endometrial tissue culture system. *Reprod. Biomed. Online* 7, 243–249. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61759-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61759-2)
- Stavropoulos, A., Varras, M., Vasilakaki, T., Varra, V.-K., Tsavari, A., Varra, F.-N., Nonni, A., Kavantzias, N., Lazaris, A.C., 2019. Expression of p53 and PTEN in human primary endometrial carcinomas: Clinicopathological and immunohistochemical analysis and study of their concomitant expression. *Oncol. Lett.* 17, 4575–4589. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10093>
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K.A., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H.F., Tavtigian, S. V., 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356–362. <https://doi.org/10.1038/NG0497-356>
- Stelloo, E., Bosse, T., Nout, R.A., Mackay, H.J., Church, D.N., Nijman, H.W., Leary, A., Edmondson, R.J., Powell, M.E., Crosbie, E.J., Kitchener, H.C., Mileschkin, L., Pollock, P.M., Smit, V.T., Creutzberg, C.L., 2015. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. *Mod. Pathol.* 28, 836–844. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2015.43>
- Stoddard, B.L., 2011. Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure* 19, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.003>
- Stodden, G.R., Lindberg, M.E., King, M.L., Paquet, M., Maclean, J.A., Mann, J.L., Demayo, F.J., Lydon, J.P., Hayashi, K., 2015. Loss of Cdh1 and Trp53 in the uterus induces chronic inflammation with modification of tumor microenvironment. *Oncogene* 34, 2471–2482. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.193>
- Straessler, K.M., Jones, K.B., Hu, H., Jin, H., van de Rijn, M., Capecchi, M.R., 2013. Modeling Clear Cell Sarcomagenesis in the Mouse: Cell of Origin Differentiation State Impacts Tumor Characteristics. *Cancer Cell* 23, 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.019>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, W., Ji, W., Hall, J.M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C.L., Gu, Z., 2015. Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 12029–12033. <https://doi.org/10.1002/anie.201506030>
- Sung, K.E., Yang, N., Pehlke, C., Keely, P.J., Eliceiri, K.W., Friedl, A., Beebe, D.J., 2011. Transition to invasion in breast cancer: A microfluidic in vitro model enables examination of spatial and temporal effects. *Integr. Biol.* 3, 439–450. <https://doi.org/10.1039/c0ib00063a>
- Sung, Y.H., Kim, J.M., Kim, H.T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., Choi, J.H., Ban, Y.H., Ha, S.J., Kim, C.H., Lee, H.W., Kim, J.S., 2014. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Res.* 24, 125–131. <https://doi.org/10.1101/gr.163394.113>
- Suresh, B., Ramakrishna, S., Kim, H., 2017. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA for genome editing. *Methods Mol. Biol.* 1507, 81–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6518-2_7
- Surucu, B., Bozucic, L., Hynx, D., Parcellier, A., Hemmings, B.A., 2008. In vivo analysis of protein kinase B (PKB)/Akt regulation in DNA-PKcs-null mice reveals a role for PKB/Akt in DNA

- damage response and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 30025–30033. <https://doi.org/10.1074/JBC.M803053200>
- Suryo Rahmanto, Y., Shen, W., Shi, X., Chen, X., Yu, Y., Yu, Z.C., Miyamoto, T., Lee, M.H., Singh, V., Asaka, R., Shimberg, G., Vitolo, M.I., Martin, S.S., Wirtz, D., Drapkin, R., Xuan, J., Wang, T.L., Shih, I.M., 2020. Inactivation of Arid1a in the endometrium is associated with endometrioid tumorigenesis through transcriptional reprogramming. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16416-0>
- Suzuki, A., De La Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., Del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., Fukumoto, M., Mak, T.W., 1998. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.* 8, 1169–1178. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00488-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00488-5)
- T Enomoto, M Inoue, A O Perantoni, N Terakawa, O Tanizawa, J M Rice, 1990. K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract. *Cancer Res.* 50(19), 6139–6145.
- Tahara, S., Nojima, S., Ohshima, K., Hori, Y., Kurashige, M., Wada, N., Ikeda, J. ichiro, Morii, E., 2016. S100A4 accelerates the proliferation and invasion of endometrioid carcinoma and is associated with the “MELF” pattern. *Cancer Sci.* 107, 1345–1352. <https://doi.org/10.1111/cas.12999>
- Tahara, S., Nojima, S., Ohshima, K., Hori, Y., Kurashige, M., Wada, N., Motoyama, Y., Okuzaki, D., Ikeda, J. ichiro, Morii, E., 2019. Serum deprivation-response protein regulates aldehyde dehydrogenase 1 through integrin-linked kinase signaling in endometrioid carcinoma cells. *Cancer Sci.* 110, 1804–1813. <https://doi.org/10.1111/cas.14007>
- Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Murakami, M., Tanaka, K.F., Iino, M., Kasai, H., Sasaoka, T., Kobayashi, K., Miyazono, K., Morii, E., Isa, T., Fukayama, M., Kakita, A., Ueda, H.R., 2018. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.* 24, 2196–2210.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.056>
- Takahashi, M., Shimomoto, T., Miyajima, K., Iizuka, S., Watanabe, T., Yoshida, M., Kurokawa, Y., Maekawa, A., 2002. Promotion, but not progression, effects of tamoxifen on uterine carcinogenesis in mice initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 23, 1549–1555. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.9.1549>
- Takahashi, M., Shimomoto, T., Miyajima, K., Yoshida, M., Katashima, S., Uematsu, F., Maekawa, A., Nakae, D., 2004. Effects of estrogens and metabolites on endometrial carcinogenesis in young adult mice initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Lett.* 211, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.029>
- Takeda, T., Banno, K., Okawa, R., Yanokura, M., Iijima, M., Iriekunitomi, H., Nakamura, K., Iida, M., Adachi, M., Umene, K., Nogami, Y., Masuda, K., Kobayashi, Y., Tominaga, E., Aoki, D., 2016. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). *Oncol. Rep.* 35, 607–613. <https://doi.org/10.3892/OR.2015.4421>
- Talwar, A., Behera, P., Ahuja, A., Sarkar, B., Phulwara, R.H., 2021. Endometrial Serous Carcinoma Arising From Adenomyosis: A Clinico-Pathological Insight. *J. Fam. Reprod. Heal.* 15, 125–129. <https://doi.org/10.18502/jfrh.v15i2.6454>
- Tamguney, T., Stokoe, D., 2007. New insights into PTEN. *J. Cell Sci.* 120, 4071–4079. <https://doi.org/10.1242/JCS.015230>
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S.I., Parsons, R., Yamada, K.M., 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280, 1614–1617. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5369.1614>
- Tan, Y.F., Li, F.X., Piao, Y.S., Sun, X.Y., Wang, Y.L., 2003. Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction* 126, 171–182. <https://doi.org/10.1530/REP.0.1260171>
- Tang, T.H., Bachellerie, J.P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M.L., Huber, H., Drungowski, M., Elge, T., Brosius, J., Hüttenhofer, A., 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7536–7541. <https://doi.org/10.1073/pnas.112047299>
- Tang, W., Ramasamy, K., Pillai, S.M.A., Santhamma, B., Konda, S., Pitta Venkata, P., Blankenship, L., Liu, J., Liu, Z., Altwegg, K.A., Ebrahimi, B., Pratap, U.P., Li, X., Valente, P.T., Kost, E., Sareddy, G.R., Vadlamudi, R.K., Nair, H.B., Tekmal, R.R., Viswanadhapalli, S., 2021. LIF/LIFR oncogenic signaling is a novel therapeutic target in endometrial cancer. *Cell death Discov.* 7, 216. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00603-z>
- Tanoguchi, K., Yaegashi, N., Jiko, K., Maekawa, A., Sato, S., Yajima, A., 1999. K-Ras point mutations in spontaneously occurring endometrial adenocarcinomas in the Donryu rat.

- Tohoku J. Exp. Med. 189, 87–93. <https://doi.org/10.1620/tjem.189.87>
- Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., Cho, K.R., Bose, S., Wang, S.I., Li, J., Parsons, R., Ellenson, L.H., 1997. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* 57, 3935–3940.
- TAVASSOLI, F.A., NORRIS, H.J., 1981. Mesenchymal tumours of the uterus. VII. A clinicopathological study of 60 endometrial stromal nodules. *Histopathology* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1981.tb01761.x>
- Taylor, M.H., Lee, C.H., Makker, V., Rasco, D., Dutcus, C.E., Wu, J., Stepan, D.E., Shumaker, R.C., Motzer, R.J., 2020. Phase Ib/II trial of lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced renal cell carcinoma, endometrial cancer, and other selected advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 38, 1154–1163. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01598>
- Taylor, N.P., Zigelboim, I., Huettner, P.C., Powell, M.A., Gibb, R.K., Rader, J.S., Mutch, D.G., Edmonston, T.B., Goodfellow, P.J., 2006. DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis 19, 1333–1338.
- Temblador, A., Topalis, D., Andrei, G., Snoeck, R., 2019. CRISPR/Cas9 Editing of the Polyomavirus Tumor Antigens Inhibits Merkel Cell Carcinoma Growth In Vitro. *Cancers (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11091260>
- Teng, C.T., Beard, C., Gladwell, W., 2002. Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biol. Reprod.* 67, 1439–1449. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002089>
- Teng, K., Ford, M.J., Harwalkar, K., Li, Y.Q., Pacis, A.S., Farnell, D., Yamanaka, N., Wang, Y.C., Badescu, D., Nu, T.N.T., Ragoussis, J., Huntsman, D.G., Arseneau, J., Yamanaka, Y., 2021. Modeling High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Using a Combination of in Vivo Fallopian Tube Electroporation and CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Cancer Res.* 81, 5147–5160. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1518>
- Tentler, J.J., Tan, A.C., Weekes, C.D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T.M., Arcaroli, J.J., Messersmith, W.A., Eckhardt, S.G., 2012. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.61>
- Ter-Avetisyan, G., Tünnemann, G., Nowak, D., Nitschke, M., Hermann, A., Drab, M., Cardoso, M.C., 2009. Cell entry of arginine-rich peptides is independent of endocytosis. *J. Biol. Chem.* 284, 3370–3378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805550200>
- Thiel, F.C., Halmen, S., 2018. Low-Grade Endometrial Stromal Sarcoma - a Review. *Oncol. Res. Treat.* 41, 687–692. <https://doi.org/10.1159/000494225>
- Thomson, R.B., Igarashi, P., Biemesderfer, D., Kim, R., Abu-Alfa, A., Soleimani, M., Aronson, P.S., 1995. Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J. Biol. Chem.* 270, 17594–17601. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17594>
- Thomson, R.B., Ward, D.C., Quaggin, S.E., Igarashi, P., Muckler, Z.E., Aronson, P.S., 1998. cDNA cloning and chromosomal localization of the human and mouse isoforms of Ksp-cadherin. *Genomics* 51, 445–451. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5402>
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J., 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* 15, 7–24. <https://doi.org/10.1038/NRC3860>
- Timin, A.S., Muslimov, A.R., Lepik, K. V., Epifanovskaya, O.S., Shakirova, A.I., Mock, U., Riecken, K., Okilova, M. V., Sergeev, V.S., Afanasyev, B. V., Fehse, B., Sukhorukov, G.B., 2018. Efficient gene editing via non-viral delivery of CRISPR–Cas9 system using polymeric and hybrid microcarriers. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.001>
- Tirodkar, T.S., Budiou, R.A., Elishaev, E., Zhang, L., Mony, J.T., Brozick, J., Edwards, R.P., Vlad, A.M., 2014. MUC1 positive, Kras and Pten driven mouse gynecologic tumors replicate human tumors and vary in survival and nuclear grade based on anatomical location. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102409>
- Tolman, N.G., Balasubramanian, R., Macalinao, D.G., Kearney, A.L., MacNicol, K.H., Montgomery, C.L., de Vries, W.N., Jackson, I.J., Cross, S.H., Kizhatil, K., Nair, K.S., John, S.W.M., 2021. Genetic background modifies vulnerability to glaucoma-related phenotypes in Lmx1b mutant mice. *DMM Dis. Model. Mech.* 14. <https://doi.org/10.1242/dmm.046953>
- Tomoda, H., Kishimoto, Y., Lee, Y.C., 1989. Temperature effect

- on endocytosis and exocytosis by rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 15445–15450. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84849-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84849-4)
- Tong, G.X., Devaraj, K., Hamele-Bena, D., Yu, W.M., Turk, A., Chen, X., Wright, J.D., Greenebaum, E., 2011. Pax8: A marker for carcinoma of Müllerian origin in serous effusions. *Diagn. Cytopathol.* 39, 562–566. <https://doi.org/10.1002/dc.21426>
- Torchilin, V.P., 2014. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Torres, M.L., Weaver, A.L., Kumar, S., Uccella, S., Famuyide, A.O., Cliby, W.A., Dowdy, S.C., Gostout, B.S., Mariani, A., 2012. Risk factors for developing endometrial cancer after benign endometrial sampling. *Obstet. Gynecol.* 120, 998–1004. <https://doi.org/10.1097/AOG.0B013E31826B9FEF>
- Torres, R., Martin, M.C., Garcia, A., Cigudosa, J.C., Ramirez, J.C., Rodriguez-Perales, S., 2014. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4964>
- Trabulo, S., Cardoso, A.L., Mano, M., De Lima, M.C.P., 2010. Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*. 3, 961–993. <https://doi.org/10.3390/ph3040961>
- Tran, A.Q., Gehrig, P., 2017. Recent Advances in Endometrial Cancer. *F1000Research* 6. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.10020.1/DOI>
- Trédan, O., Galmarini, C.M., Patel, K., Tannock, I.F., 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1441–1454. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
- Treuting, P.M., Dintzis, S.M., Montine, K.S., 2018. Comparative Anatomy And Histology: A Mouse, Rat, And Human Atlas Second Edition 543.
- Trevino, A.E., Zhang, F., 2014. Genome editing using cas9 nickases. *Methods Enzymol.* 546, 161–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8>
- Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J.L., Naidu, S., Wei, G., Sharma, S.M., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., Gurcan, M.N., Weinstein, M.B., Barsky, S.H., Yee, L., Rosol, T.J., Stromberg, P.C., Robinson, M.L., Pepin, F., Hallett, M., Park, M., Ostrowski, M.C., Leone, G., 2009. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 461, 1084–1091. <https://doi.org/10.1038/nature08486>
- Tripathi, P.P., Arami, H., Banga, I., Gupta, J., Gandhi, S., 2018. Cell penetrating peptides in preclinical and clinical cancer diagnosis and therapy. *Oncotarget* 9, 37252–37267. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26442>
- Trotman, L.C., Pandolfi, P.P., 2003. PTEN and p53: who will get the upper hand? *Cancer Cell* 3, 97–99. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00022-9)
- Turco, M.Y., Gardner, L., Hughes, J., Cindrova-Davies, T., Gomez, M.J., Farrell, L., Hollinshead, M., Marsh, S.G.E., Brosens, J.J., Critchley, H.O., Simons, B.D., Hemberger, M., Koo, B.K., Moffett, A., Burton, G.J., 2017. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat. Cell Biol.* 19, 568–577. <https://doi.org/10.1038/ncb3516>
- Unno, K., Ono, M., Winder, A.D., Maniar, K.P., Paintal, A.S., Yu, Y., Wei, J.J., Lurain, J.R., Kim, J.J., 2014. Establishment of human patient-derived endometrial cancer xenografts in NOD scid gamma mice for the study of invasion and metastasis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116064>
- Urick, M.E., Bell, D.W., 2018. In vitro effects of FBXW7 mutation in serous endometrial cancer: Increased levels of potentially druggable proteins and sensitivity to SI-2 and dinaciclib. *Mol. Carcinog.* 57, 1445–1457. <https://doi.org/10.1002/mc.22867>
- Urick, M.E., Yu, E.J., Bell, D.W., 2021. High-risk endometrial cancer proteomic profiling reveals that FBXW7 mutation alters L1CAM and TGM2 protein levels. *Cancer* 127, 2905–2915. <https://doi.org/10.1002/cncr.33567>
- Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., Gregory, P.D., 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636–646. <https://doi.org/10.1038/nrg2842>
- Ute M Moll, Oleksi Petrenko, 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 14, 1001–1008.
- Vakulskas, C.A., Dever, D.P., Rettig, G.R., Turk, R., Jacobi, A.M.,

- Collingwood, M.A., Bode, N.M., McNeill, M.S., Yan, S., Camarena, J., Lee, C.M., Park, S.H., Wiebking, V., Bak, R.O., Gomez-Ospina, N., Pavel-Dinu, M., Sun, W., Bao, G., Porteus, M.H., Behlke, M.A., 2018. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* 24, 1216–1224. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
- Vale, N., Duarte, D., Silva, S., Correia, A.S., Costa, B., Gouveia, M.J., Ferreira, A., 2020. Cell-penetrating peptides in oncologic pharmacotherapy: A review. *Pharmacol. Res.* 162. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105231>
- VanderLaan, P.A., Rangachari, D., Mockus, S.M., Spotlow, V., Reddi, H. V., Malcolm, J., Huberman, M.S., Joseph, L.J., Kobayashi, S.S., Costa, D.B., 2017. Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers: Correlation with clinical outcomes. *Lung Cancer* 106, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.01.011>
- Vanoli, F., Tomishima, M., Feng, W., Lamribet, K., Babin, L., Brunet, E., Jasin, M., 2017. CRISPR-Cas9-guided oncogenic chromosomal translocations with conditional fusion protein expression in human mesenchymal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 3696–3701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700622114>
- Vassilev, V., Pretto, C.M., Cornet, P.B., Delvaux, D., Eeckhout, Y., Courtoy, P.J., Marbaix, E., Henriët, P., 2005. Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5848–5857. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0762>
- Verissimo, C.S., Overmeer, R.M., Ponsioen, B., Drost, J., Mertens, S., Verlaan-Klink, I., Van Gerwen, B., Van Der Ven, M., Van De Wetering, M., Egan, D.A., Bernards, R., Clevers, H., Bos, J.L., Snippert, H.J., 2016. Targeting mutant RAS in patient-derived colorectal cancer organoids by combinatorial drug screening. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18489>
- Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birlle, D., Mercola, D., Mustelin, T., De Belle, I., 2001. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 1124–1128. <https://doi.org/10.1038/NCB1201-1124>
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501. <https://doi.org/10.1038/NRC839>
- Vivès, E., Brodin, P., Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
- Vollmer, G., 2003. Endometrial cancer: Experimental models useful for studies on molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 23–42. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100023>
- Vosse, M., Renard, F., Coibion, M., Neven, P., Nogaret, J.M., Hertens, D., 2002. Endometrial disorders in 406 breast cancer patients on tamoxifen: The case for less intensive monitoring. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 101, 58–63. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(01\)00516-4](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(01)00516-4)
- Wadia, J., Dowdy, S., 2005. Modulation of Cellular Function by TAT Mediated Transduction of Full Length Proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 97–104. <https://doi.org/10.2174/1389203033487289>
- Wadia, J.S., Stan, R. V., Dowdy, S.F., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* 10, 310–315. <https://doi.org/10.1038/nm996>
- Wallace, J.A., Li, F., Leone, G., Ostrowski, M.C., 2011. Pten in the breast tumor microenvironment: Modeling tumor-stroma coevolution. *Cancer Res.* 71, 1203–1207. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3263>
- Walrath, J.C., Hawes, J.J., Van Dyke, T., Reilly, K.M., 2010. Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Research. *Adv. Cancer Res.* 106, 113–164. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06004-5)
- Wan, T., Niu, D., Wu, C., Xu, F.J., Church, G., Ping, Y., 2019. Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: Current status and future outlook. *Mater. Today* 26, 40–66. <https://doi.org/10.1016/J.MATTOD.2018.12.003>
- Wang, H., Douglas, W., Lia, M., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Podsypanina, K., Parsons, R., Ellenson, L.H., 2002. DNA mismatch repair deficiency accelerates endometrial tumorigenesis in Pten heterozygous mice 160, 1481–1486. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62573-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62573-4)

- Wang, H., Karikomi, M., Naidu, S., Rajmohan, R., Caserta, E., Chen, H.Z., Rawahneh, M., Moffitt, J., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., Weinstein, M., Wang, D., Sadee, W., La Perle, K., Stromberg, P., Rosol, T.J., Eng, C., Ostrowski, M.C., Leone, G., 2010. Allele-specific tumor spectrum in Pten knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5142–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912524107>
- Wang, H., Tang, Z., Li, T., Liu, M., Li, Y., Xing, B., 2019. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of ARID1A promotes primary progesterone resistance by downregulating progesterone receptor B in endometrial cancer cells. *Oncol. Res.* 27, 1051–1060. <https://doi.org/10.3727/096504019X15561873320465>
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- Wang, H.X., Li, M., Lee, C.M., Chakraborty, S., Kim, H.W., Bao, G., Leong, K.W., 2017. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chem. Rev.* 117, 9874–9906. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00799>
- Wang, H.X., Song, Z., Lao, Y.H., Xu, X., Gong, J., Cheng, D., Chakraborty, S., Park, J.S., Li, M., Huang, D., Yin, L., Cheng, J., Leong, K.W., 2018. Nonviral gene editing via CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4903–4908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712963115>
- Wang, L., Zheng, W., Liu, S., Li, B., Jiang, X., 2019. Delivery of CRISPR/Cas9 by Novel Strategies for Gene Therapy. *ChemBioChem* 20, 634–643. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800629>
- Wang, P., Zhang, L., Xie, Y., Wang, N., Tang, R., Zheng, W., Jiang, X., 2017. Genome Editing for Cancer Therapy: Delivery of Cas9 Protein/sgRNA Plasmid via a Gold Nanocluster/Lipid Core-Shell Nanocarrier. *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)* 4, 1700175. <https://doi.org/10.1002/adv.201700175>
- Wang, P., Zhang, L., Zheng, W., Cong, L., Guo, Z., Xie, Y., Wang, L., Tang, R., Feng, Q., Hamada, Y., Gonda, K., Hu, Z., Wu, X., Jiang, X., 2018. Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57, 1491–1496. <https://doi.org/10.1002/anie.201708689>
- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S., 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science (80-.)* 343, 80–84. <https://doi.org/10.1126/science.1246981>
- Wang, X., Huang, H., Young, K.H., 2015. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany, NY)* 7, 1032–1049. <https://doi.org/10.18632/aging.100855>
- Wang, X., Wendel, J.R.H., Emerson, R.E., Broaddus, R.R., Creighton, C.J., Rusch, D.B., Buechlein, A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Hawkins, S.M., 2020. Pten and Dicer1 loss in the mouse uterus causes poorly differentiated endometrial adenocarcinoma. *Oncogene* 39, 6286–6299. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01434-5>
- Wang, Y., Li, J., Xiang, J., Wen, B., Mu, H., Zhang, W., Han, J., 2016. Highly efficient generation of biallelic reporter gene knock-in mice via CRISPR-mediated genome editing of ESCs. *Protein Cell* 7, 152–156. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0228-3>
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., Zhou, B., 2014. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 963–972. <https://doi.org/10.2174/15680096113136660102>
- Wang, Y., Yang, D., Cogdell, D., Hu, L., Xue, F., Broaddus, R., Zhang, W., 2010. Genomic characterization of gene copy-number aberrations in endometrial carcinoma cell lines derived from endometrioid-type endometrial adenocarcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* 9, 179–189. <https://doi.org/10.1177/153303461000900207>
- Wang, Z., Liu, P., Inuzuka, H., Wei, W., 2014. Roles of F-box proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 233–247. <https://doi.org/10.1038/NRC3700>
- Waning, D.L., Lehman, J.A., Batuello, C.N., Mayo, L.D., 2010. Controlling the Mdm2-Mdmx-p53 Circuit. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 1576–1593. <https://doi.org/10.3390/PH3051576>
- Wanzel, M., Visedydyk, J.B., Gittler, M.P., Gremke, N., Seiz, J.R., Hefter, M., Noack, M., Savai, R., Mernberger, M., Charles, J.P., Schneikert, J., Bretz, A.C., Nist, A., Stiewe, T., 2016. CRISPR-Cas9-based target validation for p53-reactivating model compounds. *Nat. Chem. Biol.* 12, 22–28. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1965>

- Wei, T., Cheng, Q., Min, Y.L., Olson, E.N., Siegart, D.J., 2020. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17029-3>
- Weigelt, B., Warne, P.H., Lambros, M.B., Reis-Filho, J.S., Downward, J., 2013. PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 19, 3533–3544. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3815>
- Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Sander, C., Stuart, J.M., Chang, K., Creighton, C.J., Davis, C., Donehower, L., Drummond, J., Wheeler, D., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y.S.N., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.J.E., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, M., Hirst, C., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Lee, D., Li, H.I., Marra, M.A., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Robertson, A.G., Schein, J.E., Sipahimalani, P., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R.J., Beroukhir, R., Bhatt, A.S., Brooks, A.N., Cherniack, A.D., Freeman, S.S., Gabriel, S.B., et al., 2013. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113–1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Wells, D.J., 2004. Gene therapy progress and prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Ther.* 11, 1363–1369. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302337>
- Whelan, J.T., Forbes, S.L., Bertrand, F.E., 2007. CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* 6, 80–84. <https://doi.org/10.4161/CC.6.1.3648>
- WHO 2020, 2020. Publication of the WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 4: Female Genital Tumours – IARC.
- Wierzbicki, P.M., Kogut-Wierzbicka, M., Ruczynski, J., Siedlecka-Kroplewska, K., Kaszubowska, L., Rybarczyk, A., Alenowicz, M., Rekowski, P., Kmiec, Z., 2014. Protein and siRNA delivery by transportan and transportan 10 into colorectal cancer cell lines. *Folia Histochem. Cytobiol.* 52, 270–280. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2014.0035>
- Wilbie, D., Walther, J., Mastrobattista, E., 2019. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Acc. Chem. Res.* 52, 1555–1564. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00106>
- Wild, P.J., Ikenberg, K., Fuchs, T.J., Rechsteiner, M., Georgiev, S., Fankhauser, N., Noske, A., Roessle, M., Caduff, R., Dellas, A., Fink, D., Moch, H., Krek, W., Frew, I.J., 2012. p53 suppresses type II endometrial carcinomas in mice and governs endometrial tumour aggressiveness in humans 4, 808–824.
- Williams, J.A., Wang, Z.R., Parrish, R.S., Hazlett, L.J., Smith, S.T., Young, S.R., 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of HER-2/neu, c-myc, and p53 in endometrial cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 67, 135–143. <https://doi.org/10.1006/EXMP.1999.2289>
- Willson, C.J., Herbert, R.A., Cline, J.M., 2015. Hormone Receptor Expression in Spontaneous Uterine Adenocarcinoma in Fischer 344 Rats. *Toxicol. Pathol.* 43, 865–871. <https://doi.org/10.1177/0192623315591839>
- Wilson, M.R., Reske, J.J., Holladay, J., Wilber, G.E., Rhodes, M., Koeman, J., Adams, M., Johnson, B., Su, R.W., Joshi, N.R., Patterson, A.L., Shen, H., Leach, R.E., Teixeira, J.M., Fazleabas, A.T., Chandler, R.L., 2019. ARID1A and PI3-kinase pathway mutations in the endometrium drive epithelial transdifferentiation and collective invasion. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11403-6>
- Winder, A., Unno, K., Yu, Y., Lurain, J., Kim, J.J., 2017. The allosteric AKT inhibitor, MK2206, decreases tumor growth and invasion in patient derived xenografts of endometrial cancer. *Cancer Biol. Ther.* 18, 958–964. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1281496>
- Winuthayanon, W., Hewitt, S.C., Orvis, G.D., Behringer, R.R., Korach, K.S., 2010. Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19272–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013226107>
- Wirtzfeld, D.A., Petrelli, N.J., Rodriguez-Bigas, M.A., 2001. Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Ann. Surg. Oncol.* 8, 319–327.
- Wong, G.W., Knowles, G.C., Mak, T.W., Ferrando, A.A., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2012. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCR β -selected mouse thymocytes. *Blood* 120, 1439–1448. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-12-395319>
- Wonodirekso, S., Au, C.L., Hadisaputrat, W., Affandi, B., Rogers, P.A.W., 1993. Cytokeratins 8, 18 and 19 in endometrial

- epithelial cells during the normal menstrual cycle and in women receiving Norplant®. *Contraception* 48, 481–493. [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(93\)90137-V](https://doi.org/10.1016/0010-7824(93)90137-V)
- Worby, C.A., Dixon, J.E., 2014. PTEN. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 641–669. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-082411-113907>
- Wright, J.D., Bansal, N., Herzog, T.J., Seshan, V.E., Schiff, P.B., Burke, W.M., Cohen, C.J., 2008. Uterine carcinosarcomas and grade 3 endometrioid cancers: evidence for distinct tumor behavior. *Obstet. Gynecol.* 112, 64–70. <https://doi.org/10.1097/AOG.0B013E318176157C>
- Wu, W., Lu, Z., Li, F., Wang, W., Qian, N., Duan, J., Zhang, Y., Wang, F., Chen, T., 2017. Efficient in vivo gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 1660–1665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614775114>
- Wu, X., Mao, S., Ying, Y., Krueger, C.J., Chen, A.K., 2019. Progress and Challenges for Live-cell Imaging of Genomic Loci Using CRISPR-based Platforms. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 17, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.10.001>
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E., Sawyers, C.L., 1998. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15587–15591. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.26.15587>
- Wu, Y., Zeng, J., Roscoe, B.P., Liu, P., Yao, Q., Lazzarotto, C.R., Clement, K., Cole, M.A., Luk, K., Baricordi, C., Shen, A.H., Ren, C., Esrick, E.B., Manis, J.P., Dorfman, D.M., Williams, D.A., Biffi, A., Brugnara, C., Biasco, L., Brendel, C., Pinello, L., Tsai, S.Q., Wolfe, S.A., Bauer, D.E., 2019. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 25, 776–783. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0401-y>
- Wu, Y., Zhou, H., Fan, X., Zhang, Y., Zhang, M., Wang, Y., Xie, Z., Bai, M., Yin, Q., Liang, D., Tang, W., Liao, J., Zhou, C., Liu, W., Zhu, P., Guo, H., Pan, H., Wu, C., Shi, H., Wu, L., Tang, F., Li, J., 2015. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res.* 25, 67–79. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.160>
- Xiao, S., Coppeta, J.R., Rogers, H.B., Isenberg, B.C., Zhu, J., Olalekan, S.A., McKinnon, K.E., Dokic, D., Rashedi, A.S., Haisenleder, D.J., Malpani, S.S., Arnold-Murray, C.A., Chen, K., Jiang, M., Bai, L., Nguyen, C.T., Zhang, J., Laronda, M.M., Hope, T.J., Maniar, K.P., Pavone, M.E., Avram, M.J., Sefton, E.C., Getsios, S., Burdette, J.E., Kim, J.J., Borenstein, J.T., Woodruff, T.K., 2017. A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14584>
- Xie, K., Yang, Y., 2013. RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant* 6, 1975–1983. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>
- Xing, D., Scangas, G., Nitta, M., He, L., Xu, A., Ioffe, Y.J.M., Aspuria, P.J., Hedvat, C.Y., Anderson, M.L., Oliva, E., Karlan, B.Y., Mohapatra, G., Orsulic, S., 2009. A role for BRCA1 in uterine leiomyosarcoma. *Cancer Res.* 69, 8231–8235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2543>
- Xu, C., Lu, Z., Luo, Y., Liu, Y., Cao, Z., Shen, S., Li, H., Liu, J., Chen, K., Chen, Z., Yang, X., Gu, Z., Wang, J., 2018. Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06522-5>
- Xu, C.F., Chen, G.J., Luo, Y.L., Zhang, Y., Zhao, G., Lu, Z.D., Czarna, A., Gu, Z., Wang, J., 2021. Rational designs of in vivo CRISPR-Cas delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 168, 3–29. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.11.005>
- Xu, C.F., Iqbal, S., Shen, S., Luo, Y.L., Yang, X., Wang, J., 2019. Development of “CLAN” Nanomedicine for Nucleic Acid Therapeutics. *Small* 15. <https://doi.org/10.1002/sml.201900055>
- Xu, C.L., Ruan, M.Z.C., Mahajan, V.B., Tsang, S.H., 2019. Viral delivery systems for crispr. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11010028>
- Xu, Y., Liu, S., Yu, G., Chen, J.J., Chen, J.J., Xu, X., Wu, Y., Zhang, A., Dowdy, S.F., Cheng, G., 2008. Excision of selectable genes from transgenic goat cells by a protein transducible TAT-Cre recombinase. *Gene* 419, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.020>
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., Zhang, F., Anderson, D.G., Sharp, P.A., Jacks, T., 2014. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 514, 380–384. <https://doi.org/10.1038/nature13589>

- Yang, H., Bailey, P., Pilarsky, C., 2019. CRISPR Cas9 in Pancreatic Cancer Research. *Front. cell Dev. Biol.* 7, 239. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00239>
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., Jaenisch, R., 2013. XOne-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* 154, 1370. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.022>
- Yazdani, Y., Farazmandfar, T., Azadeh, H., Zekavatian, Z., 2016. The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *J. Biomed. Sci.* 23. <https://doi.org/10.1186/S12929-016-0228-5>
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T.J., Qi, Z., Chang, J.C., Bao, G., Muench, M.O., Yu, J., Levy, J.A., Kan, Y.W., 2014. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9591–9596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407473111>
- Yeh, C.H., Bellon, M., Nicot, C., 2018. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers 17.
- Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., Anderson, D.G., 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- Yin, H., Kauffman, K.J., Anderson, D.G., 2017. Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 387–399. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.280>
- Yin, H., Song, C.Q., Suresh, S., Kwan, S.Y., Wu, Q., Walsh, S., Ding, J., Bogorad, R.L., Zhu, L.J., Wolfe, S.A., Kotliansky, V., Xue, W., Langer, R., Anderson, D.G., 2018. Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. *Nat. Chem. Biol.* 14, 311–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2559>
- Yin, H., Xue, W., Anderson, D.G., 2019. CRISPR–Cas: a tool for cancer research and therapeutics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 281–295. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0166-8>
- Yoo, J.Y., Kang, H.B., Broaddus, R.R., Risinger, J.I., Choi, K.C., Kim, T.H., 2018. MIG-6 suppresses endometrial epithelial cell proliferation by inhibiting phospho-AKT. *BMC Cancer* 18. <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4502-7>
- Yoshida, A., Newbold, R.R., Dixon, D., 2000. Abnormal cell differentiation and p21 expression of endometrial epithelial cells following developmental exposure to Diethylstilbestrol (DES). *Toxicol. Pathol.* 28, 237–245. <https://doi.org/10.1177/019262330002800203>
- Yoshida, M., Katashima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D., Maekawa, A., 2004. Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism. *Carcinogenesis* 25, 2257–2264. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh225>
- Yoshida, M., Katsuda, S.I., Tanimoto, T., Asai, S., Nakae, D., Kurokawa, Y., Taya, K., Maekawa, A., 2002. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octyphenol for different periods. *Carcinogenesis* 23, 1745–1750. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.10.1745>
- Yoshida, M., Watanabe, G., Suzuki, T., Inoue, K., Takahashi, M., Maekawa, A., Taya, K., Nishikawa, A., 2009. Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats. *J. Reprod. Dev.* 55, 105–109. <https://doi.org/10.1262/jrd.20026>
- Yoshida, T., Okuyama, H., Endo, H., Inoue, M., 2018. Spheroid cultures of primary urothelial cancer cells: Cancer tissue-originated spheroid (CTOS) method. *Methods Mol. Biol.* 1655, 145–153. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7234-0_12
- Yoshioka, T., Yogosawa, S., Yamada, T., Kitawaki, J., Sakai, T., 2013. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS. *Gynecol. Oncol.* 129, 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.02.008>
- Yu, W., Mookherjee, S., Chaitankar, V., Hiriyanna, S., Kim, J.W., Brooks, M., Ataeijannati, Y., Sun, X., Dong, L., Li, T., Swaroop, A., Wu, Z., 2017. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14716>
- Yu, Y., Hall, T., Eathiraj, S., Wick, M.J., Schwartz, B., Abbadessa, G., 2017. In-vitro and in-vivo combined effect of ARQ 092, an AKT inhibitor, with ARQ 087, a FGFR inhibitor. *Anticancer. Drugs* 28, 503–513. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000486>

- Yuan, T.L., Cantley, L.C., 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497–5510. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.245>
- Yue, H., Zhou, X., Cheng, M., Xing, D., 2018. Graphene oxide-mediated Cas9/sgRNA delivery for efficient genome editing. *Nanoscale* 10, 1063–1071. <https://doi.org/10.1039/c7nr07999k>
- Zatsepin, T., Turner, J., Oretskaya, T., Gait, M., 2005. Conjugates of Oligonucleotides and Analogues with Cell Penetrating Peptides as Gene Silencing Agents. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3639–3654. <https://doi.org/10.2174/138161205774580769>
- Zhang, B., 2021. CRISPR/Cas gene therapy. *J. Cell. Physiol.* 236, 2459–2481. <https://doi.org/10.1002/jcp.30064>
- Zhang, D., Wang, J., Xu, D., 2016. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *J. Control. Release* 229, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.020>
- Zhang, L., Wang, P., Feng, Q., Wang, N., Chen, Z., Huang, Y., Zheng, W., Jiang, X., 2017. Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy. *NPG Asia Mater.* 2017 910 9, e441–e441. <https://doi.org/10.1038/am.2017.185>
- Zhang, P., Sun, Y., Ma, L., 2015. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 14, 481–487. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006048>
- Zhang, Q., Chen, Z., Wang, F., Zhang, S., Chen, H., Gu, X., Wen, F., Jin, J., Zhang, X., Huang, X., Shen, B., Sun, B., 2021. Efficient DNA interrogation of SpCas9 governed by its electrostatic interaction with DNA beyond the PAM and protospacer. *Nucleic Acids Res.* 49, 12433–12444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1139>
- Zhang, S., Huang, W.C., Li, P., Guo, H., Poh, S.B., Brady, S.W., Xiong, Y., Tseng, L.M., Li, S.H., Ding, Z., Sahin, A.A., Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N., Yu, D., 2011. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat. Med.* 17, 461–469. <https://doi.org/10.1038/NM.2309>
- Zhang, S., Shen, J., Li, D., Cheng, Y., 2020. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* 11, 614–648. <https://doi.org/10.7150/thno.47007>
- Zhang, W., Liu, Y., Zhou, X., Zhao, R., Wang, H., 2020. Applications of CRISPR-Cas9 in gynecological cancer research. *Clin. Genet.* 97, 827–834. <https://doi.org/10.1111/cge.13717>
- Zhang, X., Xu, C., Gao, S., Li, P., Kong, Y., Li, T., Li, Y., Xu, F.-J., Du, J., 2019. CRISPR/Cas9 Delivery Mediated with Hydroxyl-Rich Nanosystems for Gene Editing in Aorta. *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)* 6, 1900386. <https://doi.org/10.1002/advs.201900386>
- Zhang, Y., Iaffaldano, B., Qi, Y., 2021. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants. *Plant Commun.* 2. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100168>
- Zhang, Z., Wan, T., Chen, Yuxuan, Chen, Yu, Sun, H., Cao, T., Songyang, Z., Tang, G., Wu, C., Ping, Y., Xu, F.J., Huang, J., 2019. Cationic Polymer-Mediated CRISPR/Cas9 Plasmid Delivery for Genome Editing. *Macromol. Rapid Commun.* 40. <https://doi.org/10.1002/marc.201800068>
- Zhao, S., Bellone, S., Lopez, S., Thakral, D., Schwab, C., English, D.P., Black, J., Cocco, E., Choi, J., Zammataro, L., Predolini, F., Bonazzoli, E., Bi, M., Buza, N., Hui, P., Wong, S., Abu-Khalaf, M., Ravaggi, A., Bignotti, E., Bandiera, E., Romani, C., Todeschini, P., Tassi, R., Zanotti, L., Odicino, F., Pecorelli, S., Donzelli, C., Ardighieri, L., Facchetti, F., Falchetti, M., Silasi, D.A., Ratner, E., Azodi, M., Schwartz, P.E., Mane, S., Angioli, R., Terranova, C., Quick, C.M., Edraki, B., Bilgüvar, K., Lee, M., Choi, M., Stiegler, A.L., Boggan, T.J., Schlessinger, J., Lifton, R.P., Santin, A.D., 2016. Mutational landscape of uterine and ovarian carcinosarcomas implicates histone genes in epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12238–12243.
- Zheng, Y., Yang, Xiaohui, Wang, C., Zhang, S., Wang, Z., Li, M., Wang, Y., Wang, X., Yang, Xingsheng, 2020. HDAC6, modulated by miR-206, promotes endometrial cancer progression through the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-60271-4>
- Zhou, S., da Silva, S.D., Siegel, P.M., Philip, A., 2019. CD109 acts as a gatekeeper of the epithelial trait by suppressing epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cells in vitro. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50694-z>

Zhou, S., Watanabe, K., Koide, S., Kitamatsu, M., Ohtsuki, T., 2021. Minimization of apoptosis-inducing CPP-Bim peptide. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 36. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127811>

Zhou, W., Cui, H., Ying, L., Yu, X.F., 2018. Enhanced Cytosolic Delivery and Release of CRISPR/Cas9 by Black Phosphorus Nanosheets for Genome Editing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57, 10268–10272. <https://doi.org/10.1002/anie.201806941>

Zierau, O., Helle, J., Schadyew, S., Morgenroth, Y., Bentler, M., Hennig, A., Chittur, S., Tenniswood, M., Kretzschmar, G., 2018. Role of miR-203 in estrogen receptor-mediated signaling in the rat uterus and endometrial carcinoma. *J. Cell. Biochem.* 119, 5359–5372. <https://doi.org/10.1002/jcb.26675>

Zierau, O., O'Sullivan, J., Morrissey, C., McDonald, D., Wünsche, W., Schneider, M.R., Tenniswood, M.P., Vollmer, G., 2004. Tamoxifen exerts agonistic effects on clusterin and complement C3 gene expression in RUCA-I primary xenografts and metastases but not normal uterus. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 823–830. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00842>

Zorko, M., Langel, Ü., 2005. Cell-penetrating peptides: Mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 529–545. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.10.010>

Zuris, J.A., Thompson, D.B., Shu, Y., Guilinger, J.P., Bessen, J.L., Hu, J.H., Maeder, M.L., Joung, J.K., Chen, Z.Y., Liu, D.R., 2015. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* 33, 73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>



ANEXO

"Las personas curiosas no se aburren nunca, y su vida es un estudio constante de la alegría"

Tony Robbins

PUBLICACIONES

- **M-CSF as a therapeutic target in BRAFV600E melanoma resistant to BRAF inhibitors.**

C. Barceló, P. Sisó, I. de la Rosa, C. Megino-Luque, **R. Navaridas**, O. Maiques, I. Urdanibia, N. Eritja, X. Soria, M. Potrony, N. Calbet-Llopart, S. Puig, X. Matías-Guiu, R. M. Martí, A. Macià. Br J Cancer. 2022 Jun. doi: 10.1038/s41416-022-01886-4.

- **ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma.**

Megino-Luque C, Sisó P, Mota-Martorell N, **Navaridas R**, de la Rosa I, Urdanibia I, Albertí-Valls M, Santacana M, Pinyol M, Bonifaci N, Macià A, Llobet-Navas D, Gatius S, Matias-Guiu X, Eritja N. Mol Oncol. 2022 Feb 15. doi: 10.1002/1878-0261.13193.

- **Endometrial PTEN Deficiency Leads to SMAD2/3 Nuclear Translocation.**

Eritja N, **Navaridas R**, Ruiz-Mitjana A, Vidal-Sabanés M, Egea J, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X. Cancers (Basel). 2021 Oct 5;13(19):4990. doi: 10.3390/cancers13194990.

- **ENDOG Impacts on Tumor Cell Proliferation and Tumor Prognosis in the Context of PI3K/PTEN Pathway Status.**

Barés G, Beà A, Hernández L, **Navaridas R**, Felip I, Megino C, Blasco N, Nadeu F, Campo E, Llovera M, Dolcet X, Sanchis D. Cancers (Basel). 2021 Jul 28;13(15):3803. doi: 10.3390/cancers13153803.

- **T-Type Calcium Channels as Potential Therapeutic Targets in Vemurafenib-Resistant BRAFV600E Melanoma.**

Barceló C, Sisó P, Maiques O, García-Mulero S, Sanz-Pamplona R, **Navaridas R**, Megino C, Felip I, Urdanibia I, Eritja N, Soria X, Piulats JM, Penin RM, Dolcet X, Matías-Guiu X, Martí RM, Macià A. J Invest Dermatol. 2020 Jun;140(6):1253-1265. doi: 10.1016/j.jid.2019.11.014. Epub 2019 Dec 23.

- **Involvement of the mitochondrial nuclease EndoG in the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species.**

Blasco N, Beà A, Barés G, Girón C, **Navaridas R**, Irazoki A, López-Lluch G, Zorzano A, Dolcet X, Llovera M, Sanchis D. *Redox Biol.* 2020 Oct; 37:101736. doi: 10.1016/j.redox.2020.101736. Epub 2020 Sep 24.

- **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.

- **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.

- **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.

PUBLICACIONES EN REVISIÓN:

- **Transient, DNA-free in vivo CRISPR/Cas9 genome edition for flexible modelling of endometrial carcinogenesis.**

Raúl Navaridas, Maria Vidal-Sabanés, Anna Ruiz-Mitjana, Aida Perramon-Güell, Cristina Megino-Luque, David Llobet-Navas, Joaquim Egea, Mario Encinas, Lúdia Bardia, Julien Colombelli, Xavier Dolcet. Nature Communication.

- **Netrin-1 blockade induces tumor growth inhibition and EMT reversion in endometrial cancer.**

Philippe Cassier , **Raúl Navaridas** , Nicolas Rama , Benjamin Ducarouge , Jean-Pierre Delord, Melanie Bellina, Andrea Paradisi, Gwenaëlle Garin, Hanane Gheit , David Neves , Remy Jelin, Nicolas Gadot, Sophie Leon, Cyril Degletagne, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Eliane Mey-Lamarque, David Pérol, Xavi Dolcet, Isabelle Ray-Coquard, Agnes Bernet, Patrick Mehlen. NATURE.

- **Oxidative stress-induced FAK activation contributes to Uterine Serous Carcinoma (USC) aggressiveness.**

Isabel C. Lopez-Mejia, Jordi Pijuan, **Raúl Navaridas**, Maria Santacana, Sònia Gatius, Ana Velasco, Gerard Castellà, Anaïs Panosa, Elisa Cabiscol, Mario Encinas, Miquel Pinyol, Laura Coll, Núria Bonifaci, Laura Plata-Peña, August Vidal, Alberto Villanueva, Eloi Gari, David Llobet-Navàs, Lluís Fajas, Xavier Matias-Guiu, Andrée Yeramian. Oncogenesis.

- **Lack of extracellular matrix switches TGF- β -induced apoptosis of endometrial cells to Epithelial-to-Mesenchymal transition through AKT, ERK and SMAD2/3-dependent mechanisms.**

Anna Ruiz-Mitjana, **Raúl Navaridas**, Maria Vidal-Sabanés, Aida Perramon-Güell, Isidre Felip, Núria Eritja, Joaquim Egea, Mario Encinas, Xavier Matias-Guiu, Xavier Dolcet. Scientific Reports.

- **Antitumor effects of Ral-GTPases downregulation in glioblastoma.**

Tània Cemeli, Marta Guasch-Vallés, Marina Ribes-Santolaria, Eva Ibars, **Raúl Navaridas**, Xavier Dolcet, Neus Pedraza, Neus Colomina, Jordi Torres-Rosell, Francisco Ferrezuelo, Judit Herreros, Eloi Garí. Cancers (Basels).