



Universitat de Lleida

Estudi del paper d'E2F-1 i Ciclina D1 en tumors sòlids deficients per PTEN i avaluació de teràpies dirigides

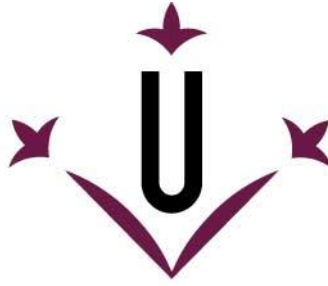
Maria Alba Dosil Garcia

<http://hdl.handle.net/10803/462062>

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

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

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



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**Estudi del paper d'E2F-1 i Ciclina D1 en tumors sòlids
deficients per PTEN i avaluació de teràpies dirigides**

Maria Alba Dosil Garcia

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

Directors

Xavier Matias-Guiu Guia
Xavier Dolcet Roca

Tutor

Xavier Dolcet Roca

Lleida, 2018

“Tot és camí des d’ara”

Miquel Martí i Pol

Als meus pares

RESUMS

Resum

PTEN és un dels gens més freqüentment mutats en càncers humans. Les mutacions en *PTEN* són relativament habituals en els carcinomes d'endometri, de pròstata, de tiroide i colorectals.

La pèrdua de *PTEN* condueix a la desregulació del cicle cel·lular, contribuint així a la inestabilitat genòmica, que és un dels trets característics del fenotip tumoral. Per aquest motiu, les proteïnes implicades en cicle cel·lular s'han presentat com a possibles dianes per al tractament de processos tumorals. En aquest context, el factor de transcripció E2F-1 és una proteïna intrigant, ja que presenta una funció dual, com a oncogen i gen supressor tumoral, en funció del context i del tipus cel·lular. Així doncs, en la actualitat, la rellevància clínica i la implicació de l'expressió d'E2F-1 en els processos tumorals continuen essent desconegudes. En la primera part d'aquest treball, s'ha estudiat el paper d'E2F-1 en tumors deficientes en *PTEN in vivo*. L'ablació d'ambdós gens no afecta la progressió ni dels tumors d'endometri ni de pròstata. No obstant això, i sorprenentment, la pèrdua monoal·lèlica i bial·lèlica d'E2F-1 induïx un increment de la incidència i de la progressió de la tumorigènesi a còlon induïda per la pèrdua de *PTEN*. A més, l'absència d'E2F-1 augmenta el nombre i la mida de les lesions observades.

En el context de la regulació del cicle cel·lular, s'ha descrit també que *PTEN* controla l'expressió de Ciclina D1 a través de diversos mecanismes. A més, la deficiència en *PTEN* promou l'acumulació de complexos del cicle cel·lular, com ara Ciclina D1-CDK4/6. Així doncs, en la segona part d'aquest treball, s'han avaluat els efectes antitumorals de l'ablació de Ciclina D1 en tumors induïts per pèrdua de *PTEN in vivo*. S'ha observat que la deficiència en Ciclina D1 dóna lloc a una reducció de les lesions endometrials, però no de les hiperplàsies de tiroide ni dels carcinomes de pròstata.

Finalment, s'ha estudiat el potencial terapèutic de dos inhibidors diferents en neoplàsies endometrials, de pròstata i tiroide induïdes per la pèrdua de *PTEN in vivo*. En primer lloc, i d'acord amb els resultats anteriors, la inhibició de CDK4/6 amb el tractament amb Palbociclib redueix només l'extensió dels carcinomes endometrials, sense afectar la progressió de les hiperplàsies de tiroide ni de les neoplàsies de pròstata. D'altra banda, el tractament amb l'inhibidor multiquinasa Regorafenib és capaç de reduir les lesions presents a la tiroide, però no les neoplàsies d'endometri i pròstata. A més, mentre que ambdós fàrmacs, Palbociclib i Regorafenib, frenen la progressió tumoral, cap d'ells elimina completament les malalties.

Resumen

PTEN es uno de los genes más frecuentemente mutados en cánceres humanos. Las mutaciones en *PTEN* son relativamente habituales en carcinomas de endometrio, próstata, tiroides y colorrectales.

La pérdida de *PTEN* conduce a la desregulación del ciclo celular, contribuyendo así a la inestabilidad genómica, rasgo característico del fenotipo tumoral. Por este motivo, las proteínas implicadas en ciclo celular se han presentado como posibles dianas para el tratamiento de procesos tumorales. En este contexto, el factor de transcripción E2F-1 es una proteína intrigante que presenta una función dual, como oncogen y gen supresor tumoral, en función del contexto y del tipo celular. En la actualidad, la relevancia clínica y la implicación de la expresión de E2F-1 en los procesos tumorales siguen siendo desconocidas. En la primera parte de este trabajo, se ha estudiado el papel de E2F-1 en tumores deficientes en *PTEN in vivo*. La ablación de ambos genes no afecta a la progresión ni de los tumores endometriales ni de próstata. Sin embargo, sorprendentemente, la pérdida monoalélica y bialélica de E2F-1 incrementa la incidencia y la progresión de la tumorigénesis en colon inducida por pérdida de *PTEN*. Además, la ausencia de E2F-1 aumenta el número y el tamaño de las lesiones observadas.

En el contexto de la regulación del ciclo celular, se ha descrito también que *PTEN* controla la expresión de Ciclina D1 a través de varios mecanismos. Además, la pérdida de *PTEN* promueve la acumulación de complejos del ciclo celular, tales como Ciclina D1-CDK4/6. En la segunda parte de este trabajo se han evaluado los efectos antitumorales de la ablación de Ciclina D1 en tumores inducidos por pérdida de *PTEN in vivo*. Se ha observado que la deficiencia en Ciclina D1 reduce las lesiones endometriales pero no las hiperplasias de tiroides ni los carcinomas de próstata.

Finalmente, se ha estudiado el potencial terapéutico de dos inhibidores diferentes en neoplasias endometriales, de próstata y tiroides inducidas por la pérdida de *PTEN in vivo*. En primer lugar, y de acuerdo con los resultados anteriores, la inhibición de CDK4/6 con el tratamiento con Palbociclib reduce sólo la extensión de las lesiones endometriales, sin afectar a la progresión de las hiperplasias de tiroides ni de las neoplasias de próstata. Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor multiquinasa Regorafenib es capaz de reducir las lesiones presentes en la tiroides, pero no las neoplasias de endometrio y próstata. Además, mientras que ambos fármacos, Palbociclib y Regorafenib, frenan la progresión tumoral, ninguno de ellos elimina completamente las enfermedades.

Abstract

PTEN is one of the most frequently mutated genes in human cancers. A significant proportion of human malignancies present *PTEN* deficiency, such as endometrium, prostate, thyroid and colorectal carcinomas.

Loss of *PTEN* leads to a dysregulation of cell cycle contributing to genomic instability, which is an important feature of the tumoral phenotype. For that reason, cell cycle proteins have been presented as key targets in the treatment of cancer. In this context, the transcription factor E2F-1 appears as intriguing protein because its dual function as oncogene and tumor suppressor gene depending on tissue-context. The clinical relevance and implication of E2F-1 expression in tumoral processes remain largely unknown at present time. Therefore, in the first part of this work, we have studied the role of E2F-1 in *PTEN* deficient tumors *in vivo*. Ablation of both genes does not affect the progression of endometrial, prostate and thyroid malignancies. However, surprisingly, monoallelic and biallelic deletion of E2F-1 induces an increment of the incidence and progression of colonic tumorigenesis driven by *PTEN* loss. In addition, absence of E2F-1 increases the number and the size of the colonic lesions.

In the context of cell cycle regulation, it has been also described that *PTEN* controls the expression of Cyclin D1 through various mechanisms. Furthermore, *PTEN* deficiency promotes the accumulation of cell cycle complexes, such as Cyclin D1-CDK4/6. In the second part of this work, we have assessed the antitumoral effects of Cyclin D1 ablation in *PTEN*-induced malignancies *in vivo*. We have observed that Cyclin D1 loss triggers shrinkage of *PTEN* deficient endometrial neoplasias, but not on thyroid hyperplasias and prostate carcinomas.

Finally, we have evaluated the therapeutic potential of two different inhibitors in endometrial, prostate and thyroid neoplasias induced by *PTEN* loss. First, and in accordance with previous results, inhibition of CDK4/6 with Palbociclib treatment only reduces the extent of *PTEN*-induced endometrial carcinoma *in vivo*, without affecting the progression of thyroid hyperplasias and prostate neoplasias. On the other hand, treatment with multikinase inhibitor Regorafenib was effective reducing thyroid lesions, but not endometrial and prostate neoplasms. While both drugs, Palbociclib and Regorafenib, slow down tumors progression, none of them eliminated the disease.

ÍNDEX

Índex

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ.....	13
1. El gen supressor tumoral <i>PTEN</i>.....	15
1.1 Estructura de <i>PTEN</i>	15
1.2 Funció molecular de <i>PTEN</i> a la via PI3K/AKT	16
1.3 Regulació de <i>PTEN</i>	20
1.4 Models murins per a l'estudi de <i>PTEN</i>	23
1.4.1 El model induïble CAG-Cre:ER ^T <i>PTEN</i> ^{f/f} per a l'estudi del paper de <i>PTEN</i> en el desenvolupament de neoplàsies endometrials i prostàtiques, i hiperplàsies de tiroide	28
2. Alteracions de <i>PTEN</i> en patologies oncològiques	33
2.1 <i>PTEN</i> en el càncer d'endometri.....	35
2.1.1 L'úter i l'endometri en condicions fisiològiques	35
2.1.2 El càncer d'endometri.....	38
2.2 <i>PTEN</i> en el càncer de pròstata	42
2.2.1 La pròstata en condicions fisiològiques	42
2.2.2 El càncer de pròstata	45
2.3 <i>PTEN</i> en el càncer de tiroide	48
2.3.1 La tiroide en condicions fisiològiques	48
2.3.2 El càncer de tiroide	49
2.4 Intestí gros i còlon.....	51
2.4.1 L'intestí gros i còlon en condicions fisiològiques.....	51
2.4.2 El càncer colorectal.....	54
3. El cicle cel·lular	59
3.1 Ciclina D1	61
3.1.1 Estructura de la Ciclina D1	61
3.1.2 Funció de la Ciclina D1	62
3.1.3 Regulació de la Ciclina D1	62
3.1.4 Models animals de Ciclina D1.....	64
3.1.5 Ciclina D1 i càncer.....	65
3.2 E2F-1	66
3.2.1 Estructura d'E2F-1	67

Índex

3.2.2	Funcions d'E2F-1.....	67
3.2.3	Regulació d'E2F-1.....	71
3.2.4	Models animals d'E2F-1.....	72
3.2.5	E2F-1 i càncer.....	72
3.3	Control del cicle cel·lular i de la integritat genòmica per PTEN.....	73
4.	Intervenció farmacològica en processos tumorals deficients en PTEN.....	77
4.1	Inhibició de CDK4/CDK6: Palbociclib.....	77
4.2	Inhibició de receptors tirosina quinasa: Regorafenib.....	79
OBJECTIUS.....		83
MATERIALS I MÈTODES.....		87
1.	Tècniques de Biologia Cel·lular.....	89
2.	Animals d'experimentació.....	95
3.	Histologia i Immunohistoquímica.....	103
4.	Tècniques de bioquímica i biologia molecular.....	107
RESULTATS.....		115
1.	Estudi de la implicació del factor de transcripció E2F-1 en processos tumorals induïts per la pèrdua de PTEN.....	117
2.	Estudi de la implicació de l'axis Ciclina D-CDK4/6 en les neoplàsies induïdes per la pèrdua de PTEN.....	137
3.	Avaluació de l'efecte de l'inhibidor multiquinasa Regorafenib en el tractament de tumors sòlids deficients per PTEN.....	171
DISCUSSIÓ.....		187
CONCLUSIONS.....		207
BIBLIOGRAFIA.....		211
ANNEX.....		239

ABREVIATURES

Llistat d'abreviatures

ATM	<i>Ataxia-telangiectasa mutated</i>
ATR	<i>Ataxia-telangiectasa and Rad3-related</i>
BACs	<i>Bacterial Artificial Chromosomes</i>
BAD	<i>BCL-2-associated agonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BIM	<i>BCL-2 interacting mediator of cell death</i>
BPH	<i>Benign prostatic hyperplasia</i>
BMP3	<i>Bone morphogenic protein 3</i>
CAG	<i>Chicken actin</i>
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>
CBF-1	<i>C-repeat binding factor 1</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CENP-C	<i>Centromere protein C</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CIMP	<i>CpG island methylation pathway</i>
CIN	<i>Chromosomal instability</i>
CKI	<i>CDK inhibitors</i>
CMV	<i>Citomegalovirus</i>
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i>
CycD1	<i>Ciclina D1</i>
CycD2	<i>Ciclina D2</i>
CRC	<i>Colorectal caner</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>

Abreviatures

EC	<i>Endometrial Carcinoma</i>
EEC	<i>Endometrioid endometrial carcinoma</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EIN	<i>Endometrial intraepithelial neoplàsia</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FoxO	<i>Forkhead box O transcription factors</i>
GF	<i>Growth factor</i>
GI	<i>Gastrointestinal tract</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
GSK-3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor-related 2</i>
hgPIN	<i>High grade PIN</i>
ID1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>
IGFR-1	<i>Insulin growth factor receptor 1</i>
IK	<i>Ishikawa</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrates</i>
ISCs	<i>Intestinal stem cells</i>

ITS	<i>Insulin-transferrin-sodium selenite</i>
Ki	<i>knock-in</i>
Ko	<i>Knock-out</i>
LEF/TCF	<i>Lymphoid enhancer factor/T cell factor</i>
IgPIn	<i>Low grade PIN</i>
LOH	<i>Loss of heterozigosity</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
micro-RNAs	<i>miRNAs</i>
MMAC1	<i>Mutated in multiple advanced cancer 1</i>
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
MSS	<i>Microsatellite stability</i>
MTC	<i>Medullary thyroid cancer</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>Mammalian target of rapamycin complex</i>
mTORC 2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
Mx-1	<i>Mx dynamin-like GTPase 1</i>
NDRG4	<i>N-Myc downstream-regulated gene 4</i>
NEEC	<i>Non-endometrioid endometrial carcinoma</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMTC	<i>Non-medullary thyroid cancers</i>
Pb	<i>Probasin</i>
PBD	<i>PIP₂ binding domain</i>
PCa	<i>Prostate càncer</i>
PCAF	<i>p300-CREB-binding protein-associated factor</i>

Abreviatures

PCIS	<i>Prostate carcinoma in situ</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PDX	<i>Patient-derived tumor xenografts</i>
PDZ-BD	<i>PDZ binding domain</i>
PFS	<i>Progression free survival</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat phosphatase</i>
PHTS	<i>PTEN hamartoma tumor síndromes</i>
PIN	<i>Prostate intraepithelial neoplasia</i>
pIpC	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PIP₂	<i>Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate</i>
PIP₃	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PP2	<i>Protein phosphatase 2</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PRAS40	<i>Proline-rich AKT substrate of 40 kilodaltons</i>
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
p-RB	<i>phospho-Retinoblastoma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
PTENP1	<i>PTEN pseudogene 1</i>
PTMs	<i>Post-translational modifications</i>
p70-S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta 1</i>

p300/CBP	<i>p300/CREB-binding protein</i>
R'A	<i>R33327-5'A</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
RHEB	<i>Ras homologue enriched in brain</i>
RIP140	<i>Receptor interacting protein of 140 kDa</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SH2	<i>Scr-homology 2</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas Research Network</i>
TEP1	<i>TGF-β-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1</i>
TIE2	<i>Tyrosine kinase with immonoglobulin and epidermal growth factor homology domain 2</i>
Tmprss2	<i>Transmembrane Protease Serine 2</i>
TopBP1	<i>Topoisomerase II β-binding protein</i>
Top2A	<i>DNA topoisomerase IIα</i>
TPO	<i>Thyroid peroxidase</i>
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis 2</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
Vil 1	<i>Villin 1</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wt	<i>Wild-type</i>
4EBP1	<i>Eukariotic translation initiation factor binding protein 1</i>

INTRODUCCIÓ

1. El gen supressor tumoral *PTEN*

A finals de la dècada dels 90, *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) va ésser identificat com el possible gen supressor tumoral localitzat al cromosoma humà 10q23, una regió objecte de mutacions o delecions en nombrosos càncer humans primaris (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). Pocs mesos més tard, un tercer grup va corroborar i contribuir a aquest descobriment amb el seu treball (Li and Sun, 1997). Així, des de l'any 1997, *PTEN*, també anomenat *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancer 1*) o *TEP1* (*TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1*), ha estat extensament estudiat i s'ha establert com un dels gens supressors tumorals més importants de l'actualitat i com un destacat regulador de l'homeòstasi cel·lular en eucariotes (Pulido, 2015).

1.1 Estructura de *PTEN*

En humans, el gen *PTEN* es localitza a la regió 10q23 del cromosoma 10 i presenta una extensió de 105 kb, que inclouen 9 exons diferents (Hollander et al., 2011; Li et al., 1997; Steck et al., 1997). El gen codifica per una proteïna multifuncional de 47 KDa que conté 403 aminoàcids. L'estudi cristal·logràfic de *PTEN* va revelar que presenta dos dominis clau per a la seva activitat com a supressor tumoral: el domini fosfatasa i el domini C2. El primer domini, que s'estén entre els aminoàcids 14 i 185, és el responsable de l'activitat catalítica de la proteïna i conté el lloc actiu HCxxGxxR entre els aminoàcids 123 i 130. En segon lloc, el domini C2, que comprèn la regió des de l'aminoàcid 190 fins al 350, es correspon amb la zona d'unió a fosfolípids de membrana i permet orientar adequadament el domini fosfatasa en relació al seu substrat lipídic (Georgescu et al., 2000; Hollander et al., 2011; Lee et al., 1999). A més d'aquests dos dominis, *PTEN* posseeix també dues regions més en els extrems N i C-terminal. Per una banda, a l'extrem N-terminal s'hi localitza el domini d'unió a PIP₂ (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding domain*, PBD), que es troba situat entre els aminoàcids 7 i 13, i permet la unió de *PTEN* a la membrana, juntament amb el domini C2. Per l'altra banda, a l'extrem C-terminal, *PTEN* presenta una cua (aminoàcids 351-400) que posseeix seqüències de prolina-àcid glutàmic-serina-treonina (PEST), i que es troba seguida del domini d'unió a PDZ (*PDZ binding domain*, PDZ-BD), que s'estén entre els aminoàcids 401-403. Aquest extrem C-terminal regula l'estabilitat i l'activitat enzimàtica de la proteïna, i a més, la regió PDZ-BD permet la unió de *PTEN* a múltiples proteïnes que contenen aquest domini (Georgescu et al., 1999; Hollander et al., 2011; Worby and Dixon, 2014).

Introducció

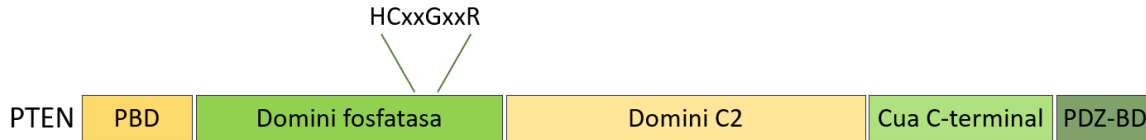


Figura 1: Estructura esquemàtica de la proteïna PTEN. PTEN està compost per 4 dominis funcionals diferents: PBD, domini fosfatasa, domini C2 i extrem carboxil, que engloba la cua C-terminal i el domini d'unió a PDZ (modificat de (Hollander et al., 2011)).

Recentment, diversos grups de recerca independents han identificat i validat l'existència de diverses isoformes de PTEN, encara que la proteïna de 403 aminoàcids és la més abundant. Aquestes isoformes es produeixen a partir del mateix mRNA canònic però, es generen a partir d'inicis de traducció alternatius. Fins al moment, s'han definit 4 variants traduccionals de PTEN (PTEN-L, PTEN-M, PTEN-N i PTEN-O), que presenten extrems N-terminals de diferent longitud, però sempre més llargs que la proteïna PTEN canònica. En concret, la proteoforma PTEN-M, que conté 146 aminoàcids addicionals, és la més abundant de les 4 variants traduccionals. No obstant, la forma PTEN-L, que presenta 173 aminoàcids més que la proteïna canònica, és la més estudiada. A més, la proteoforma PTEN-L pot ésser secretada i entrar en cèl·lules veïnes, on pot executar la seva funció habitual com un agent exogen. En l'actualitat, s'està treballant per tal d'intentar definir l'estructura, les propietats fisicoquímiques i la rellevància biològica d'aquestes noves proteoformes identificades ja que sembla possible que es comportin de manera diferent pel que fa a la seva funció i a la seva localització subcel·lular (Hopkins et al., 2013; Malaney et al., 2017; Tzani et al., 2016).

Finalment, és interessant remarcar que la seqüència aminoacídica de PTEN es troba altament conservada, especialment entre vertebrats. En ratolí, *Pten* es localitza al cromosoma 19 i codifica per una proteïna que presenta també una longitud de 403 aminoàcids. Ambdues proteïnes humana i murina difereixen només en un únic canvi aminoacídic d'una serina a una treonina, localitzat a la regió de la cua carboxil terminal, de manera que són idèntiques en un 99,75% de la seva seqüència (Leslie et al., 2016).

1.2 Funció molecular de PTEN a la via PI3K/AKT

Durant les dues darreres dècades, s'han destinat nombrosos esforços i recursos a la identificació i caracterització de les funcions de PTEN, especialment en un context patològic, però també en relació a la seva implicació en el manteniment de l'homeòstasi normal cel·lular. En aquest sentit, PTEN participa no només en diversos processos centrals per al desenvolupament del càncer, sinó també en

un ampli ventall de situacions biològiques que van més enllà de la supressió tumoral. A més, a nivell cel·lular, PTEN pot localitzar-se tant a nucli com a citosol, i la seva activitat també varia en funció de la seva localització subcel·lular (Pulido, 2015; Worby and Dixon, 2014).

PTEN és una fosfatasa dual no redundant que actua sobre substrats lipídics i proteics. La seva funció catalítica més ben caracteritzada és la seva activitat com a fosfatasa lipídica, que permet que actuï com a element regulador negatiu de la via PI3K/AKT (Stambolic et al., 1998; Wu et al., 1998). Aquesta via, conservada al llarg de l'evolució, regula diversos processos cel·lulars essencials, i la seva desregulació condueix al desenvolupament de diverses patologies, com diabetis i càncer, on la seva hiperactivació és especialment freqüent (Courtney et al., 2010; Vivanco and Sawyers, 2002).

Les PI3Ks (*phosphatidylinositol 3-kinases*) constitueixen una família de quinases lipídiques agrupades en tres classes diferents (I-III), que varien en estructura i en especificitat al substrat. Els enzims de la classe I s'activen per una gran varietat de receptors de membrana i es classifiquen en dos tipus. Per una banda, les molècules de la classe IA són heterodímers formats per una subunitat reguladora, p85 (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α o p55 γ), i una subunitat catalítica, p110 (p100 α , p100 β o p100 δ), de manera que cada isoforma de p85 és pot associar a qualsevol de les tres isoformes de p110. Per l'altra banda, la classe IB es troba constituïda per PI3Ks formades exclusivament per la subunitat catalítica p110 γ i una subunitat reguladora diferent, p101 o p87. Finalment, les classes II i III no estan tan ben caracteritzades i la seva implicació en càncer és més desconeguda. Per contra, es coneix que les molècules de classe IA es troben clarament implicades en processos tumorals (Courtney et al., 2010; Thorpe et al., 2015).

Les PI3Ks de la classe IA s'activen a partir de la unió d'un factor de creixement (*growth factor*, GF) o lligand al receptor tirosina quinasa (*receptor tyrosine kinase*, RTK) respectiu, en el seu domini extracel·lular. D'aquesta manera, es desencadena l'activació de la via PI3K/AKT. Entre els RTKs possibles s'inclouen l'EGFR (*human epidermal growth factor receptor*), el PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) i l'IGFR-1 (*insulin growth factor 1 receptor*). Després de la unió al lligand, els RTKs s'activen, es dimeritzen i s'autofosforilen, incrementant així, la seva activitat quinasa. En aquest context, la PI3K pot interaccionar amb el domini intracel·lular del receptor, a través de la seva subunitat reguladora. La subunitat p85 pot unir-se directament al RTK activat a partir de la interacció física del seu domini SH2 (*Scr-homology 2*) amb el residu fosfotirosina del receptor, o de manera indirecta, a través de fosfoproteïnes intermèdies, com IRS1 i IRS2 (*insulin receptor substrates*). Per tant, p85 és clau per a l'activació completa de la PI3K, no només perquè li serveix d'ancoratge al RTK

Introducció

i la condueix cap a la membrana plasmàtica, sinó també perquè la unió elimina l'efecte inhibitori de p85 sobre p110. Alternativament, la PI3K (p110 α i p110 γ), i en conseqüència, la via, també pot activar-se a través de la GTPasa RAS, que s'uneix directament a la subunitat p110 (Courtney et al., 2010; Pacold et al., 2000; Thorpe et al., 2015). Per altra banda, les subunitats p110 β i p110 γ poden estimular-se a través de receptors acoblats a proteïnes G (*G protein-coupled receptors*, GPCR) (Courtney et al., 2010; Guillermet-Guibert et al., 2008; Thorpe et al., 2015).

Un cop activa, la PI3K catalitza la fosforilació de PIP₂ (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*), transformant-lo a PIP₃ (*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). Aquests lípids són missatgers secundaris que propaguen la senyal intracel·lular mitjançant el reclutament a membrana de diverses proteïnes, a través de la unió directa als seus dominis PH (*pleckstrin homology*). En concret, permet el reclutament de les serina/treonina quinases PDK-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) i AKT, també coneguda com PKB (*protein kinase B*), atansant-les espacialment. De manera basal, l'AKT es manté en un estat inactiu mitjançant la interacció intramolecular dels seus dominis PH i quinasa. En canvi, quan interacciona amb PIP₃, a través del seu domini PH, experimenta un canvi conformacional que permet a PDK-1 fosforilar-la en la Thr308 del seu domini d'activació (Alessi et al., 1997), i al complex mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) (Sarbasov et al., 2005) i a la quinasa DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Bozulic et al., 2008; Surucu et al., 2008), en la Ser473 del motiu hidrofòbic del domini regulador. Aquestes fosforilacions en provoquen l'activació completa. En aquest punt, l'AKT es dissocia de la membrana i actua fosforilant múltiples proteïnes senyalitzadores al citosol, que tenen com a finalitat promoure proliferació, supervivència, creixement i metabolisme cel·lular, i angiogènesi, entre altres (Engelman, 2009; Hers et al., 2011; Vivanco and Sawyers, 2002).

Així doncs, les dianes de l'AKT són un gran varietat de proteïnes responsables de transmetre la senyal per múltiples processos cel·lulars. Per una banda, l'AKT promou la supervivència mitjançant la fosforilació inhibidora de proteïnes pro-apotòtiques com BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*) i BAD (*BCL-2-associated agonist of cell death*), i dels factor de transcripció FoxO (*forkhead box O transcription factors*), entre altres. A més, l'AKT pot fosforilar també a MDM2, permetent que la seva translocació a nucli sigui més eficient i pugui unir-se a p53 per induir la seva degradació. Per altra banda, l'AKT pot promoure també la proliferació cel·lular, impedit l'acumulació de p27, o potenciant la de Ciclina D1 a través de GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*). L'AKT també inactiva a TSC2 (*tuberous sclerosis 2*), induint així, l'activació de RHEB (*Ras homologue enriched in brain*), que al seu

torn estimula l'activitat fosfotransferra de mTOR. Pel contrari, quan TSC2 no es troba fosforilat, forma un complex amb TSC1 (*tuberous sclerosis 1*), inhibint a RHEB. Finalment, l'AKT pot activar també al complex mTORC1 per fosforilació inhibitòria de PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40 kilodaltons*), que és un regulador negatiu d'aquest complex. Així, el complex mTORC1 activa la traducció proteica per mitjà de la fosforilació activadora de p70-S6K (*ribosomal protein S6 kinase beta 1*) i inhibidora de 4EBP1 (*eukariotic translation initiation factor binding protein 1*), permetent, aquesta última, que s'alliberi eIF4E (*eukariotic translation initiation factor 4E*)(Hollander et al., 2011; Vivanco and Sawyers, 2002).

En conjunt, la cascada PI3K/AKT s'encarrega de regular múltiples funcions cel·lulars essencials. Per aquest motiu, és necessari un control rigorós de la senyalització per aquesta via. Així, per una banda, la senyalització per l'AKT finalitza quan la Thr308 i la Ser473 són defosforilades per les fosfatases PP2 (*protein phosphatase 2*)(Andjelković et al., 1996) i PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*)(Brognard et al., 2007; Gao et al., 2005), respectivament. No obstant, l'element regulador negatiu per excel·lència de la via és PTEN. PTEN actua com una fosfatasa lipídica dels lípids de membrana, generant PIP₂ a partir de la defosforilació de PIP₃. Així doncs, presenta activitat antagònica a la PI3K, evita l'activació de l'AKT, i en conseqüència, condueix a una disminució de la fosforilació dels seus substrats(Hers et al., 2011; Maehama and Dixon, 1998).

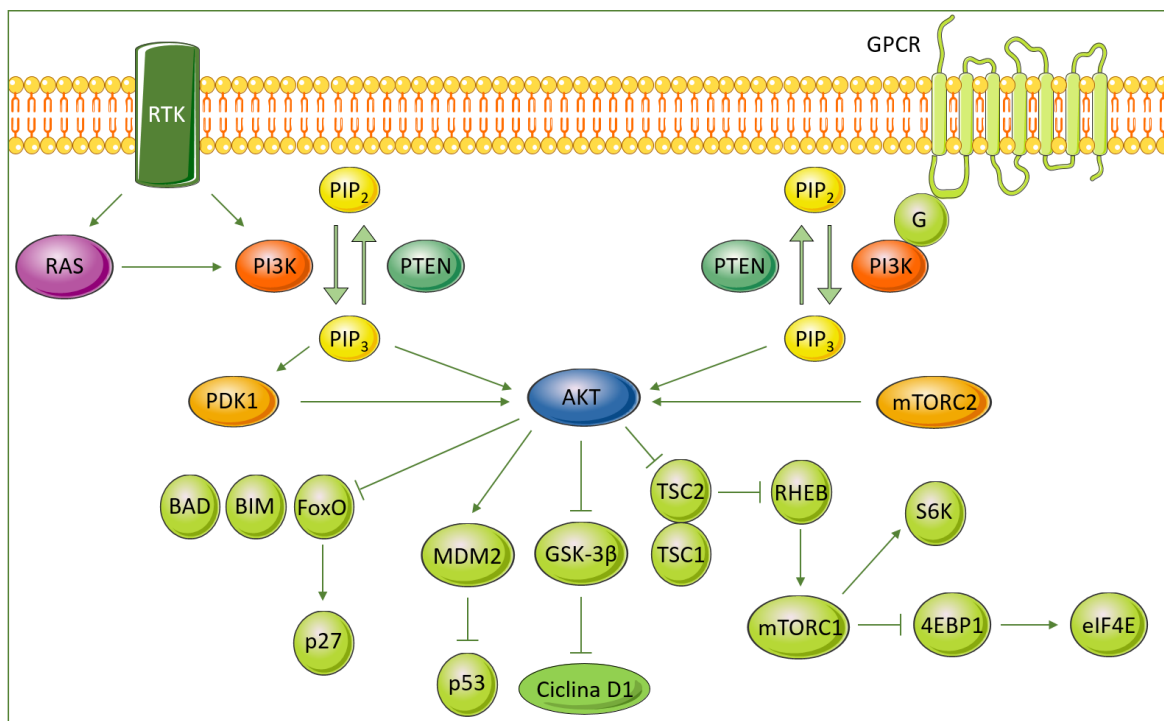


Figura 2: Esquema de la via de senyalització PI3K/AKT (modificat de (Engelman, 2009)).

Introducció

A més de la seva participació en la via PI3K/AKT com a fosfatasa lipídica a citoplasma, PTEN també pot actuar com a fosfatasa proteica i a nucli, encara que aquestes funcions són menys conegudes (Hollander et al., 2011). Per exemple, la funció fosfatasa proteica de PTEN va quedar demostrada *in vitro* en observar que era capaç de defosforilar diversos fosfopèptids (Myers et al., 1997). A més, gràcies a aquesta propietat, PTEN pot actuar en les adhesions focals, amb conseqüències sobre la migració cel·lular. En aquest sentit, s'ha descrit que un dels seus substrats és la tirosina quinasa SRC (*proto-oncogen tyrosine-protein kinase scr*). Així, la inactivació de PTEN com fosfatasa proteica provoca l'activació de SRC, conferint resistència als inhibidors d'HER2 (*human epidermal growth factor receptor-related 2*), com el trastuzumab, en cèl·lules de càncer de mama (Zhang et al., 2011). Finalment, el propi PTEN pot també ésser diana de la seva activitat fosfatasa proteica (Tibarewal et al., 2012). Per tant, sembla clar que totes aquestes funcions no canòniques poden ser també rellevants per a la seva activitat com a supressor tumoral. En un apartat posterior d'aquesta tesi es descriuen les funcions de PTEN nuclear.

1.3 Regulació de *PTEN*

Degut al paper que desenvolupa com a gen supressor tumoral, l'expressió i l'activitat de *PTEN* estan regulades de manera estricta a múltiples nivells i emprant diversos mecanismes moleculars, que inclouen tant la modulació transcripcional com les modificacions post-traduccionals. A més, la localització cel·lular de PTEN, citoplasmàtica i nuclear, i les interaccions amb altres proteïnes també contribueixen a la regulació de la seva funció tant positiva com negativament. Gràcies a tots aquests mecanismes és possible mantenir una activitat robusta i apropiada de PTEN, regular el contingut cel·lular de PIP₃ i restringir així, una possible proliferació i supervivència cel·lular aberrant promoguda per la senyalització mitjançada per la PI3K (Song et al., 2012; Tamguney and Stokoe, 2007; Worby and Dixon, 2014).

Inicialment, es pensava que *PTEN* s'expressava de manera ubiqua i constitutivament. No obstant, més endavant, es va observar que la transcripció del gen es modula positivament per diversos factors transcripcionals (Milella et al., 2015), com per exemple EGR1 (*early growth response protein 1*) i PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) (Patel et al., 2001; Virolle et al., 2001), entre altres. A més, PTEN i p53 comparteixen un complex sistema de regulació. Per una banda, p53 s'uneix al promotor de *PTEN*, de manera que potencia la seva expressió. Conseqüentment, PTEN pot estabilitzar p53 a través de mecanismes dependents i independents de la seva activitat fosfatasa. Pel que fa a la

primera situació, la inhibició de la via PI3K/AKT per PTEN dóna lloc a la inactivació de MDM2, de manera que s'evita la degradació de p53. En el segon context, PTEN s'associa físicament a p53, l'estabilitza i potencia la seva unió a DNA (Freeman et al., 2003; Stambolic et al., 2001). Pel contrari, SNAIL (Escrivà et al., 2008), ID1 (*inhibitor of DNA binding 1*) (Lee et al., 2009), c-JUN (Hettinger et al., 2007) i NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Vasudevan et al., 2004; Xia et al., 2007), entre altres, regulen negativament la transcripció de *PTEN*. Finalment, la via de senyalització NOTCH1 actua com a regulador negatiu i positiu de la transcripció de *PTEN* a través de la interacció amb CBF-1 (*c-repeat binding factor 1*) (Whelan et al., 2007; Whelan et al., 2009) i MYC (Kaur and Cole, 2013), respectivament.

Un altre mecanisme de regulació transcripcional negativa de *PTEN* és el silenci epigenètic, que juga un paper fonamental en els processos tumorals, mitjançant la metilació del promotor del gen (Milella et al., 2015; Song et al., 2012). Diversos estudis han demostrat la presència d'illes CpG hipermetilades al promotor de *PTEN* en casos de càncer colorrectal (Yazdani et al., 2016), endometrial (Salvesen et al., 2001), de tiroide (Alvarez-Nuñez et al., 2006), de mama (Khan et al., 2004), de pròstata (Rennie and Nelson, 1998) o de pulmó (Soria et al., 2002). A més, també s'ha descrit un processament alternatiu del missatger de *PTEN*, que dóna lloc a variants que mantenen regions dels introns 3 i 5, i que s'han detectat en casos de càncer de mama (Agrawal and Eng, 2006). Se suggereix que ambdós fenòmens juguen un paper clau en processos tumorals (Song et al., 2012).

En conjunt, la modulació transcripcional de *PTEN* és un procés altament regulat que depèn d'una complexa xarxa de proteïnes interrelacionades que necessàriament han de conservar-se en equilibri per tal d'assegurar el manteniment de la homeòstasi del sistema (Song et al., 2012).

A nivell post-transcripcional, determinats micro-RNAs (miRNAs) poden contribuir a la regulació de l'expressió de *PTEN*. S'ha descrit que, en un context tumoral, molts miRNAs es troben sobreexpressats, i que aquest increment correlaciona amb una reducció dels nivells del mRNA i de la proteïna de *PTEN*. Així, per exemple, entre els miRNAs identificats com a reguladors de *PTEN* destaquen miR-17 (Xiao et al., 2008), miR-19 (Jia et al., 2013; Liu et al., 2017), miR-21 (Meng et al., 2007), miR-25 (Poliseno et al., 2010a), miR-200a (Li et al., 2016) i miR-205 (Cai et al., 2013), entre altres. A més, recentment s'ha descrit l'existència d'un pseudogèn conegut com *PTENP1* (*PTEN pseudogene 1*) que permet també regular l'expressió de *PTEN*. El producte de la transcripció de *PTENP1* presenta una gran homologia de seqüència amb el mRNA de *PTEN*, concretament en la zona diana dels miRNAs. El pseudogèn permet incrementar els nivells proteics de *PTEN* ja que s'encarrega de segrestar els

Introducció

miRNAs que en regulen negativament la traducció. Per tant, pot considerar-se un regulador positiu del gen. La rellevància d'aquest mecanisme de regulació s'ha demostrat en mostres de càncer de mama i còlon on la pèrdua genòmica del locus del pseudogèn correlaciona amb una disminució dels nivells de PTEN (Poliseno et al., 2010b; Song et al., 2012).

Finalment, PTEN pot experimentar múltiples modificacions post-traduccionals (PTMs) que en regulen l'activitat catalítica, l'estabilitat, la localització subcel·lular i les interaccions amb altres proteïnes. Concretament, PTEN és susceptible de fosforilació, ubiquitinització, oxidació, acetilació i sumoïlació (Milella et al., 2015; Worby and Dixon, 2014). La fosforilació permet regular l'estabilitat de PTEN, augmentar o disminuir la seva activitat fosfatasa, en funció del lloc de fosforilació i de la quinasa responsable, i modificar la seva localització. Concretament, PTEN pot ésser fosforilat en múltiples residus del domini C2 i de la cua C-terminal. Les fosforilacions que tenen lloc al domini C2 potencien l'activitat i estabilitat de la proteïna, ja que faciliten la localització de PTEN a la membrana i en redueixen la degradació per poliubiquitinització. Per contra, les fosforilacions a la cua carboxil terminal en disminueixen l'activitat ja que condueixen a un canvi conformacional que limita l'associació de PTEN a la membrana però en potencia l'estabilitat. A més, impedeixen les interaccions amb proteïnes que contenguin el domini PDZ. L'autodefosforilació reverteix aquesta conformació (Torres and Pulido, 2001; Vazquez et al., 2001; Worby and Dixon, 2014; Zhang et al., 2012). A més, la GSK-3 β pot també fosforilar a PTEN i promoure la seva localització nuclear (Patel et al., 2013). Un altre mecanisme que està implicat en la regulació de PTEN és la ubiquitinització, que controla la degradació de la proteïna. En alguns tipus de càncers, com al carcinoma pulmonar de cèl·lules petites, la degradació de PTEN per ubiquitinització és un dels principals mecanismes que condueixen a la seva pèrdua. A més, i tot i que aquesta modificació post-traduccional és important per controlar els nivells de la proteïna, també en regula la localització. Així, la monoubiquitinització promou la translocació de PTEN a nucli, mentre que la desubiquitinització condueix a l'exclusió nuclear (Amodio et al., 2010; Maddika et al., 2011; Trotman et al., 2007). L'activitat catalítica de PTEN també pot controlar-se a través de l'oxidació i de l'acetilació. Concretament, les espècies reactives d'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS) poden oxidar PTEN i reduir la seva activitat, de manera reversible, mitjançant la formació de ponts disulfur entre els residus C71 i C124 del domini catalític fosfatasa (Lee et al., 2002). L'acetilació també disminueix l'activitat catalítica de PTEN i altera la seva interacció amb proteïnes que contenen el domini PDZ (Okumura et al., 2006). Per acabar, també s'han descrit que PTEN és susceptible de sumoïlació. Aquesta modificació post-traduccional sembla que pot també alterar la localització nuclear de PTEN i regular la seva funció en resposta al dany al DNA (Bassi

et al., 2013). Finalment, és important remarcar que algunes d'aquestes PTMs actuen com a primers esdeveniments per a futures modificacions (Malaney et al., 2017).

1.4 Models murins per a l'estudi de PTEN

El desenvolupament de models murins genèticament modificats ha estat crucial per estudiar els mecanismes moleculars que governen i promouen els processos tumorals, així com per identificar noves i millors estratègies terapèutiques i de diagnòstic. En termes generals, els models de ratolí modificats genèticament emprats per a l'estudi del càncer inclouen ratolins que sobreexpressen un transgen, models *knock-in* (Ki) per a mutacions puntuals i *knock-out* (Ko) complets i condicionals emprant el sistema Cre-LoxP (Carver and Pandolfi, 2006).

A finals dels 90, tres grups independents van desenvolupar ratolins *knock-out* de *Pten*, que van permetre demostrar la seva funció com a gen supressor tumoral (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000; Suzuki et al., 1998). En els tres models, la mutació en homozigosi que dóna lloc a la pèrdua bial·lèlica de *Pten* provoca letalitat embrionària. Així, els ratolins *Pten*^{-/-} no són viables i moren entre E6,5 i E9,5, en funció del model, a causa de defectes durant el desenvolupament embrionari i malformacions en el tub neural (Di Cristofano et al., 1998; Freeman et al., 2006; Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998). Malgrat aquest inconvenient, l'estudi dels ratolins heterozigots (*Pten*^{+/-}) en totes tres publicacions va resultar de gran utilitat i va permetre concloure que la pèrdua d'un únic al·lel de *Pten* és suficient per induir el desenvolupament de diferents tipus tumorals. Així, per exemple, els ratolins *Pten*^{+/-} poden desenvolupar neoplàsies d'endometri, pròstata i mama, tumors de glàndula adrenal, hiperplàsies gastrointestinals i limfomes. No obstant això, el fenotip tumoral varia d'un model a l'altre, ja que no tots els models desenvolupen les mateixes lesions, ni amb la mateixa freqüència ni a la mateixa edat (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000; Suzuki et al., 1998). Aquestes diferències poden ser degudes, en primer lloc, a la estratègia emprada per generar el Ko de *Pten*. Cada model presenta una escissió diferent entre els exons 3-6, encara que coincideixen amb la deleció de l'exó 5, que codifica per al domini fosfatasa de la proteïna. Però, i més important, s'ha demostrat que les variacions en l'espectre tumoral, en les freqüències descrites i en el moment d'aparició de les diferents alteracions histològiques depenen especialment del fons genètic en què s'estableix la colònia (Freeman et al., 2006). No obstant, tot i les diferències reportades, aquests tres treballs en conjunt demostren de

Introducció

manera concloent que PTEN és important a nivell de desenvolupament embrionari i que, a més, juga un paper clau en l'origen de diversos processos neoplàsics(Hollander et al., 2011).

Més endavant, es van generar sèries de ratolins mutants que expressaven un al·lel hipomòrfic de *Pten* (*Pten^{hy/+}* o *Pten^{hy/-}*), de manera que l'expressió d'aquest disminueix seqüencial i progressivament: *Pten^{+/+}*>*Pten^{hy/+}*>*Pten^{+/-}*>*Pten^{hy/-}*. Aquests treballs van mostrar que el nivell d'expressió de PTEN és un factor clau per a la progressió tumoral i que, fins i tot, una petita reducció d'un 20% en l'expressió del gen (*Pten^{hy/+}*) pot donar lloc al desenvolupament d'un ampli espectre de tumors. També es va poder comprovar que l'al·lel hipomòrfic de *Pten* no és suficient per rescatar completament la letalitat embrionària(Alimonti et al., 2010; Trotman et al., 2003).

Finalment, en dos treballs independents, es van generar ratolins *knock-in* de *Pten* per a quatre mutacions puntuals del gen(Papa et al., 2014; Wang et al., 2010). La primera d'aquestes alteracions és una mutació sense sentit, *Pten^{Δ4-5}*, que dóna lloc a la pèrdua dels exons 4 i 5 del gen, a diferència dels altres tres casos, en què les mutacions puntuals es deuen a substitucions aminoacídiques, PTEN C124S, PTEN C124R i PTEN G129E. Les mutacions C124S i C124R generen una variant de PTEN sense activitat catalítica, que n'elimina completament l'activitat fosfatasa proteica i lipídica, mentre que la forma G129E suprimeix selectivament la funció fosfatasa lipídica, però manté l'activitat sobre els fosfopèptids. La caracterització d'aquests ratolins Ki va permetre descriure en primer lloc que, de manera anàloga al ratolins Ko de *Pten*, les quatre mutacions en homozigosi són letals a nivell embrionari, ja que condueixen a defectes durant el desenvolupament. A més, els ratolins heterozigots per a les diferents mutacions presenten variacions pel que fa al fenotip tumoral, que afecten tant a la incidència de les lesions, com a la severitat i el moment d'aparició(Papa et al., 2014; Wang et al., 2010). A més, el treball realitzat al laboratori del Dr. Pandolfi va permetre concloure també que els ratolins Ki heterozigots per a les formes mutades de PTEN C124S i G129E presenten un increment de la tumorigènesi en comparació amb els ratolins *Pten^{+/-}*, ja que exerceixen un efecte de dominant negatiu *in vivo*. S'ha observat que aquestes formes mutades de PTEN poden formar estructures heterodimèriques amb la proteïna *wild-type* (wt), interferint així, amb la seva funció normal. Per tant, la presència de mutacions puntuals de *PTEN* pot resultar en un fenotip tumoral exacerbat en comparació amb la pèrdua total d'un dels dos al·lells del gen(Papa et al., 2014).

Malgrat que aquests models resulten d'utilitat per demostrar l'activitat supressora de tumors de *PTEN*, presenten una sèrie de inconvenients. En primer lloc, la letalitat embrionària causada per l'excisió bial·lèlica de *Pten* limita l'estudi de l'efecte de l'ablació completa del gen en el

desenvolupament de processos tumorals. En segon lloc, com que els ratolins $Pten^{+/-}$ desenvolupen múltiples neoplàsies en diverses localitzacions és difícil determinar la influència de $PTEN$ en un òrgan en concret i estudiar aquelles neoplàsies que es desenvolupen més tard en el temps. Totes aquestes limitacions s'han superat gràcies a la generació dels models animals *knock-out* condicionals, en què els dos al·lels de $Pten$ es troben flanquejats per seqüències LoxP que permeten eliminar l'exó 5 del gen ($Pten^{floxed/floxed}$, $Pten^{f/f}$) (Lesche et al., 2002). En aquest cas, per aconseguir la deleció de $Pten$, els animals $Pten^{f/f}$ es creuen amb soques de ratolí que expressen la recombinasa Cre, que reconeix i actua específicament sobre les seqüències diana LoxP. La recombinasa Cre pot expressar-se sota el control de promotors específics de teixits, de manera que es pot dur a terme un control espacial de la deleció selectiva del gen. A més, emprant un sistema induïble és possible controlar també, el moment en què té lloc la deleció. Finalment, combinant les dues estratègies, l'ús del sistema Cre-LoxP possibilita controlar de manera espacial i temporal la deleció del gen diana.

Fent ús del sistema Cre-LoxP s'han generat diversos models animals en els quals l'ablació bial·lèlica de $Pten$ té lloc a diferents òrgans o tipus cel·lulars selectivament (Knobbe et al., 2008; Suzuki et al., 2008), com a glàndula adrenal (Korpershoek et al., 2009), mama (Li et al., 2002), hepatòcits (Horie et al., 2004) o astròcits (Fraser et al., 2004), entre altres. Així, per exemple, la deleció específica de $Pten$ a endometri, tant en cèl·lules epitelials com de l'estroma, dona lloc al desenvolupament d'hiperplàsia epitelial quan les femelles tenen només 10 dies de vida, i de carcinoma endometrial a partir de les tres setmanes d'edat. Finalment, més enllà dels 3 mesos, es pot observar invasió miometrial (Daikoku et al., 2008). Pel que fa al cas de la pròstata, existeixen múltiples models, però bàsicament, en tots ells es mimetitzava el curs de la formació i progressió del càncer de pròstata humana, començant per les lesions de tipus PIN (*prostate intraepithelial neoplasia*), que acaben progressant a adenocarcinomes invasius i metastàtics. No obstant, existeixen certes diferències fenotípiques entre aquests models, sobretot pel que fa l'edat dels ratolins en què es detecten les lesions. Aquestes variacions entre models poden atribuir-se tant al fons genètic en què s'estableixen les colònies de ratolins com a l'ús de diferents promotors, que poden diferir en la seva especificitat cel·lular i en el grau d'activitat (Backman et al., 2004; Ma et al., 2005; Trotman et al., 2003; Wang et al., 2003). D'altra banda, la deleció específica de $Pten$ a les cèl·lules fol·liculars de la tiroide provoca l'aparició d'hiperplàsies fol·liculars que progressen a carcinomes fol·liculars, en alguns casos invasius i metastàtics (Antico-Arciuch et al., 2010; Tiozzo et al., 2012; Yeager et al., 2007). Finalment, pel que fa al tracte gastrointestinal, concretament intestí prim i gros, s'han desenvolupat una gran multitud de models diferents, que han generat varietat de resultats. En qualsevol cas, sembla que la pèrdua

Introducció

La inactivació de *Pten* a tracte gastrointestinal pot donar lloc a l'aparició d'adenomes i adenocarcinomes a intestí prim o intestí gros, però després de períodes de latència molt llargs. No obstant, altres treballs conclouen que la inactivació de *Pten* específicament a l'epiteli intestinal no és suficient per iniciar la tumorigènesi intestinal encara que sí potencia el fenotip tumoral desencadenat per la pèrdua d'*Apc*. A més, sembla que les cèl·lules mare intestinals (ISCs) deficientes per PTEN són les responsables de l'inici de la poliposi intestinal (Byun et al., 2011; Campbell et al., 1996; el Marjou et al., 2004; He et al., 2007; Ireland et al., 2004; Kühn et al., 1995; Langlois et al., 2009; Marsh Durban et al., 2014; Marsh et al., 2008; Schneider et al., 2003). En qualsevol cas, en alguns d'aquests models l'especificitat no és completa i és possible detectar recombinacions mitjançades per les diferents recombinases Cre en altres òrgans o tipus cel·lulars. No obstant, tots aquests treballs posen de manifest que la pèrdua exclusiva de *PTEN* és suficient per promoure l'aparició de tumors en determinats òrgans, mentre que en altres localitzacions no causa tumorigènesi però sí coopera en el desenvolupament de processos tumorals quan es produeixen altres alteracions genètiques addicionals (Hollander et al., 2011).

El control temporal de la deleció bial·lèlica de *Pten* s'ha aconseguit creuant els ratolins *Pten^{fl/fl}* amb la línia transgènica de ratolí que expressa una recombinasa Cre induïble per Tamoxifè (Cre:ER^T) sota el control del promotor Rosa26 (Lu et al., 2007). En aquest model, l'administració de Tamoxifè dona lloc a la pèrdua de PTEN en una gran varietat de tipus cel·lulars, provocant així, el desenvolupament de múltiples tumors. Per exemple, els ratolins mascles mutants desenvolupen càncer de pròstata, càncer intestinal, carcinoma de cèl·lules escamoses i limfomes, mentre que les femelles, càncer d'endometri i també, carcinoma de cèl·lules escamoses i limfomes.

La Cre induïble és un proteïna de fusió entre la recombinasa Cre i una forma mutada del domini d'unió a lligand del receptor d'estrògens (*estrogen receptor*, ER). Aquesta mutació evita la unió de la proteïna de fusió al lligand natural del ER, és a dir, els estrògens endògens del ratolí, a concentracions fisiològiques, però sí permet la unió a Tamoxifè. En absència de l'agent inductor, la Cre:ER^T es troba segregada al citosol per Hsp90, de manera que s'evita la recombinació nuclear. Pel contrari, la unió a Tamoxifè causa la disrupció de la interacció amb Hsp90, permetent així, la translocació de la Cre:ER^T a nucli i l'inici de la recombinació (Feil et al., 1996; Metzger et al., 1995). A més, el sistema Cre-LoxP induïbles permeten controlar de manera espacial la deleció del gen diana quan la recombinasa Cre s'expressa sota el control de promotors específics de teixit.

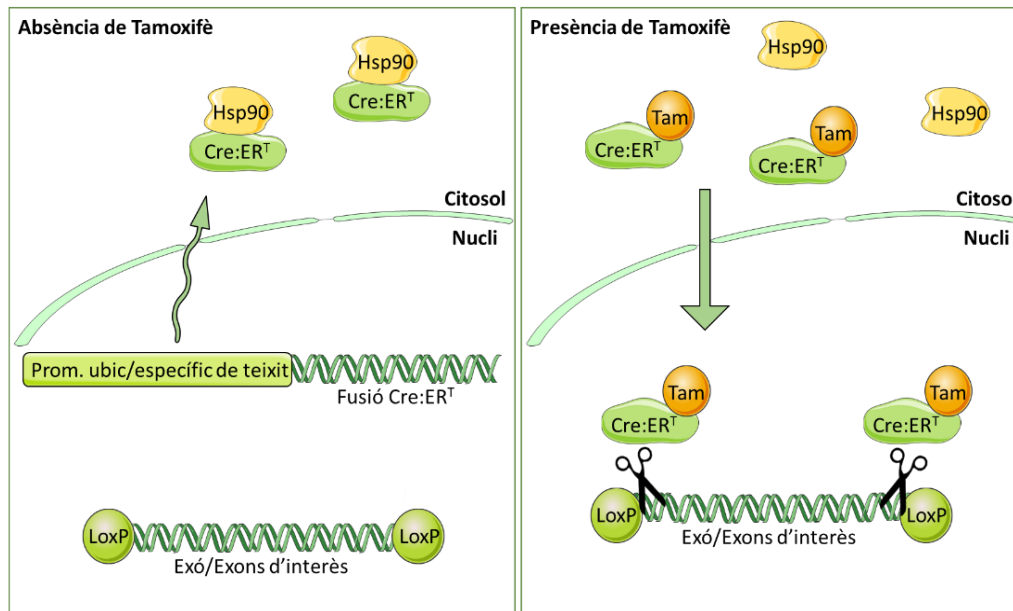


Figura 3: Esquema del funcionament del sistema Cre-LoxP induïble per Tamoxifè. L'expressió de la recombinasa Cre es controla amb promotors ubics o específics de teixits. En absència de Tamoxifè (Tam), la proteïna de fusió Cre:ER^T es manté segrestada al citosol per Hsp90, de manera que no té lloc la recombinació. En administrar el Tamoxifè, la Cre:ER^T és alliberada i pot translocar a nucli, on reconeix les seqüències LoxP que flanquegen el gen d'interès i duu a terme la recombinació (modificat de (McLellan et al., 2017)).

Malgrat que s'han establert i caracteritzat una gran quantitat de models murins *knock-out* condicionals de *Pten* específics de teixit, fins al moment, només es coneixen dos models diferents en què la deleció de *Pten* té lloc de manera induïble i específica de teixit a la vegada, concretament a l'epiteli prostàtic adult i a cèl·lules mare hematopoètiques (Ratnacaram et al., 2008; Yilmaz et al., 2006). Pel que fa a la pròstata, després de l'ablació de *Pten*, com a conseqüència de l'administració de Tamoxifè als ratolins mutants, té lloc al desenvolupament d'hiperplàsia prostàtica, PIN i adenocarcinomes de pròstata, que no són en cap cas, metastàtics. A més, molt recentment, s'ha desenvolupat un nou model animal de deleció condicional i induïble de *Pten*, que utilitza com a recombinasa la *Tmprss2-Cre:ER^T* (Gao et al., 2016). En aquest cas, la Cre es troba sota el control del promotor del gen *Tmprss2* (*transmembrane protease serine 2*), és induïble per Tamoxifè i presenta activitat recombinasa a l'epiteli luminal de la pròstata i a les cèl·lules epitelials de la bufeta i del tracte gastrointestinal, principalment. Els ratolins mutants d'aquest model desenvolupen PIN amb creixement cribiforme, però no presenten canvis visibles ni alteracions histològiques de tipus tumoral a còlon. Tot i l'existència d'aquests models, la deleció induïble i específica de *Pten* a les cèl·lules epitelials d'altres teixits que permetin establir nous models de carcinogènesi continua essent encara un repte a assolir.

Introducció

1.4.1 El model induïble CAG-Cre:ER^TPTEN^{f/f} per a l'estudi del paper de PTEN en el desenvolupament de neoplàsies endometrials i prostàtiques, i hiperplàsies de tiroide

Per acabar amb l'apartat dels models condicionals deficientes de *Pten* és important descriure, en el context d'aquesta tesi doctoral, la generació i caracterització del model CAG-Cre:ER^TPTEN^{f/f} (en endavant, Cre:ER^TPTEN^{f/f}). Aquest model *knock-out* condicional de *Pten* induïble per Tamoxifè (Mirantes et al., 2013) es va generar l'any 2013 a partir del creuament dels animals CAG-Cre:ER^{T+/-} (Hayashi and McMahon, 2002) i *Pten*^{f/f} (Lesche et al., 2002), en un fons genètic mixt.

Per una banda, la recombinasa CAG-Cre:ER^T (en endavant, Cre:ER^T) es troba sota el control del promotor de la beta actina de pollastre (CAG), que li confereix teòricament una expressió constitutiva en un ampli espectre de tipus cel·lulars tant en etapes embrionàries com adultes. Tal com s'ha descrit anteriorment, la Cre:ER^T és una proteïna de fusió entre la recombinasa Cre i una forma modificada del receptor d'estrògens, que permet la unió a Tamoxifè però no als estrògens endògens de l'animal. D'aquesta manera, la Cre:ER^T es manté al citosol fins que no rep l'estímul necessari. En estimular el sistema amb Tamoxifè, la proteïna Cre:ER^T es transloca a nucli, on pot executar la seva activitat recombinasa sobre les seqüències diana LoxP (Figura 4).

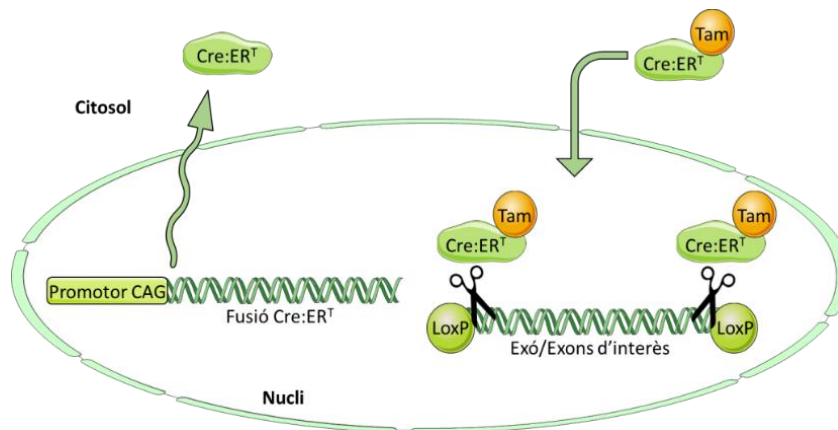


Figura 4: Esquema del funcionament del sistema CAG-Cre:ER^T-LoxP. La recombinasa CAG-Cre:ER^T es manté al citosol fins que s'estimula amb Tamoxifè (Tam). En aquest moment, pot translocar a nucli on promou la recombinació específica gràcies al reconeixement de les seqüències LoxP.

Per l'altra banda, els ratolins *Pten*^{f/f} presenten l'exó 5 dels dos al·lells de *Pten* flanquejats per les seqüències LoxP, reconegudes per la Cre:ER^T. La deleció d'aquest exó, que codifica pel domini fosfatasa de la proteïna, dona lloc a la pèrdua total de PTEN.

Curiosament, la injecció d'una única dosi de Tamoxifè als ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} dona lloc a la pèrdua de PTEN majoritàriament només en cèl·lules epitelials, però no estromals, mesenquimals o

hematopoètiques, i en forma de mosaic. D'aquesta manera, conviuen, en un mateix teixit, cèl·lules que han perdut l'expressió de *Pten* i cèl·lules normals, que mantenen l'expressió del gen.

En els ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$, la pèrdua de PTEN dóna lloc a un ràpid desenvolupament de neoplàsia intraepitelial endometrial (EIN), hiperplàsia de tiroide i PIN, a les 6-8 setmanes posteriors a la injecció de Tamoxifè, i amb una incidència propera al 100%.

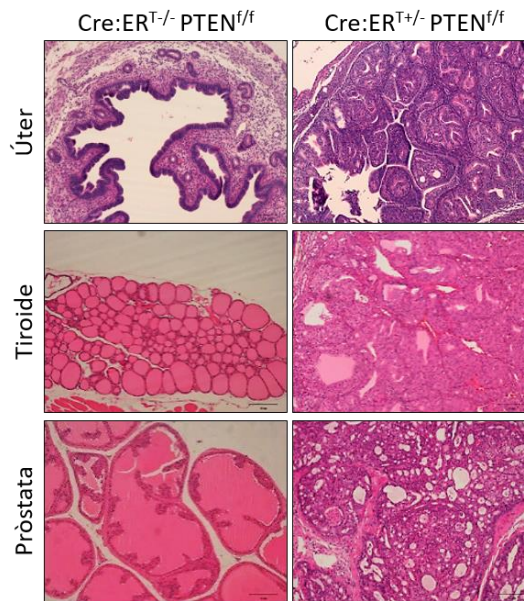


Figura 5: Els ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ desenvolupen EIN, hiperplàsies de tiroide i PIN a les 6-8 setmanes després de la injecció de Tamoxifè. Imatges representatives de la tinció amb H-E a endometri (panell superior), tiroide (panell central) i pròstata (panell inferior) de ratolins $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ tractats amb Tamoxifè (10x) (modificat de (Dasil et al., 2017)).

No obstant, la injecció de Tamoxifè no només indueix recombinació a l'endometri, la tiroide i la pròstata dels animals $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$, sinó que també s'observa en el teixit epitelial de ronyó, fetge, pulmó i còlon. En qualsevol cas, la pèrdua de PTEN en aquests òrgans no condueix al desenvolupament de neoplàsies ni d'altres alteracions histològiques.

Introducció

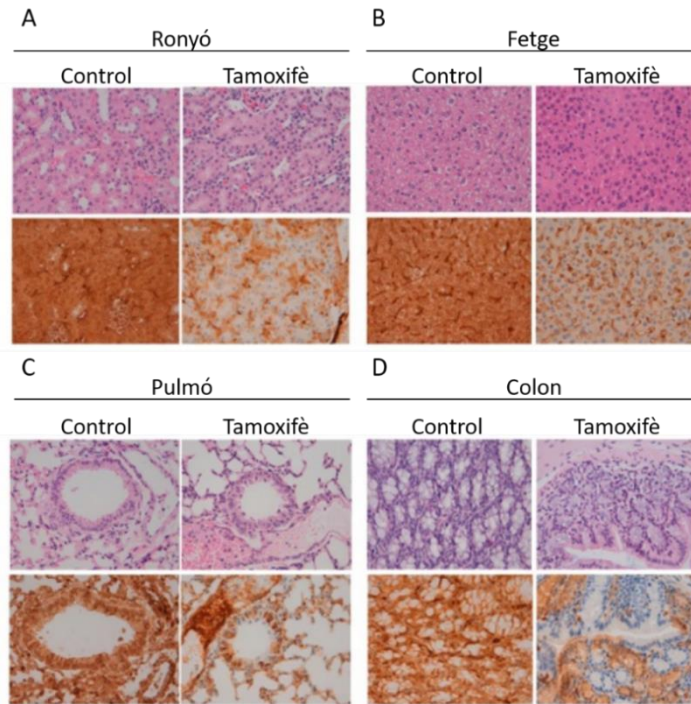


Figura 6: La pèrdua d'expressió de *Pten* no dona lloc a alteracions histològiques en altres teixits epitelials. Imatges representatives de la tinció amb H-E (panell superior) i de la immunohistoquímica de PTEN (panell inferior) a ronyó (A), fetge (B), pulmó (C) i còlon (D) de ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Tamoxifè (modificat de (Mirantes et al., 2013)).

Finalment, és important remarcar que la recombinasa Cre:ER^T no presenta activitat en teixit hematopoètic. Així, els ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} no mostren pèrdua d'expressió de *Pten* en òrgans limfoides, on tampoc hi desenvolupen alteracions histopatològiques.

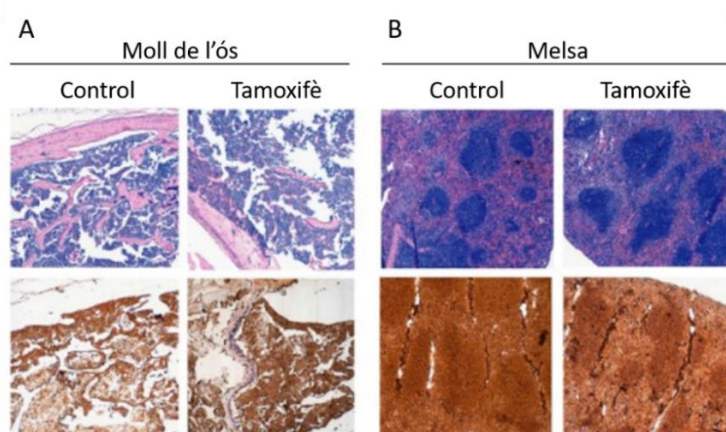


Figura 7: L'administració de Tamoxifè als ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} no condueix a la pèrdua de PTEN ni al desenvolupament d'alteracions histològiques en òrgans limfoides. Imatges representatives de la tinció amb H-E (panell superior) i de la immunohistoquímica de PTEN (panell inferior) a moll de l'ós (A) i melsa (B) de ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Tamoxifè (modificat de (Mirantes et al., 2013)).

És important remarcar que el model Cre:ER^TPTEN^{f/f} és el primer model descrit on s'aconsegueix delectonar *Pten* de manera induïble i específica a les cèl·lules epitelials, però no estromals, de l'endometri. Està àmpliament acceptat que els carcinomes d'endometri, així com tots els adenocarcinomes, apareixen com a resultat de l'acumulació de mutacions a les cèl·lules epitelials. Per tant, en aquest sentit, el model Cre:ER^TPTEN^{f/f}, que permet la inactivació del gen de manera específica en el component epitelial, representa una eina molt valuosa a l'hora d'entendre els mecanismes autònoms implicats en la carcinogènesi induïda per la pèrdua de PTEN, no només a endometri, sinó també a pròstata i tiroide. A més, el ràpid desenvolupament de les lesions neoplàsiques en tots tres òrgans el converteixen en una plataforma molt útil per estudiar l'efecte de fàrmacs antineoplàstics.

2. Alteracions de *PTEN* en patologies oncològiques

Des del seu descobriment, *PTEN* s'ha establert com un dels gens supressors de tumors més freqüentment inactivats en càncers esporàdics. A més, el seu paper com a gen supressor tumoral es veu reforçat per l'existència de desordres neoplàsics hereditaris, autosòmics dominants, com la síndrome de Cowden, la malaltia Lhermitte-Duclos i la síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba, que es coneixen col·lectivament amb el nom de PHTS (*PTEN hamartoma tumour syndromes*). Aquestes síndromes són causades majoritàriament per la presència de mutacions germinals en *PTEN*. La síndrome de Cowden és la PHTS millor descrita i concretament, un 80% dels pacients presenten mutacions germinals en el gen i un alta predisposició a desenvolupar càncer de mama, tiroide i endometri. A més, aquestes observacions correlacionen amb el fet que quan aquests tipus tumorals es desenvolupen de manera esporàdica acostumen a presentar mutacions somàtiques en *PTEN*. Els pacients amb PHTS són una població ideal, encara que minoritària, per estudiar la biologia de *PTEN* i el desenvolupament de teràpies dirigides, ja que la pèrdua de *PTEN* sembla ser el mecanisme conductor responsable de molts dels trets fenotípics d'aquestes síndromes. Els ratolins *Pten*^{+/-} són un bon model per a l'estudi de PHTS, sempre en funció del fons genètic, ja que recapitulen part del fenotip tumoral associat típicament a aquestes síndromes (Hollander et al., 2011).

La premissa clàssica sobre la supressió tumoral afirma que és necessària la pèrdua de les dues còpies d'un gen supressor tumoral per a què tingui lloc l'aparició de càncer (Knudson, 1971). Aquesta hipòtesi es coneix com la doble mutació i és el cas per exemple dels tumors retinoblastoma, que experimenten pèrdua homozigòtica del gen *RB1*. No obstant, a mesura que va anar evolucionant el coneixement sobre la supressió tumoral i es van estudiar casos concrets, van sorgir dos paradigmes més, que actualitzen la hipòtesi de la doble mutació. Així, per exemple, sorgeix el model de l'haploinsuficiència, que dona cabuda a aquells casos en què una única còpia normal del gen és insuficient per al manteniment d'un escenari no patològic, tal com ocorre amb *TP53*. Per acabar, en el darrer paradigma, el gen supressor tumoral actua de manera dosi-depenent i quasi suficient (Berger et al., 2011; Venkatachalam et al., 1998). Els treballs sobre *PTEN* descriuen que el seu comportament com a gen supressor tumoral s'ajusta al model de la quasi suficiència, ja que petites reduccions en el seu nivell d'expressió, sense que tingui lloc ni tan sols la pèrdua d'un únic al·lel, poden causar el desenvolupament de neoplàsies (Alimonti et al., 2010). A més, també es pot considerar com un gen d'haploinsuficiència obligada donat que, en determinats escenaris, la pèrdua de *PTEN* en heterozigosi és més tumorigènica que la pèrdua completa del gen. Per exemple, en un context amb expressió de

Introducció

p53, l'haploinsuficiència de *PTEN* és més agressiva a nivell tumoral a pròstata que la pèrdua completa del gen, ja que aquesta desencadena una senescència dependent de p53, que presenta un efecte protector (Chen et al., 2005). Així doncs, el context cel·lular en què té lloc l'alteració de la funció de *PTEN* determinarà el resultat de la pèrdua parcial o total del gen. Les conseqüències d'aquestes alteracions poden variar entre teixits i definir diferents llindars necessaris per al desenvolupament dels processos neoplàstics (Berger et al., 2011).

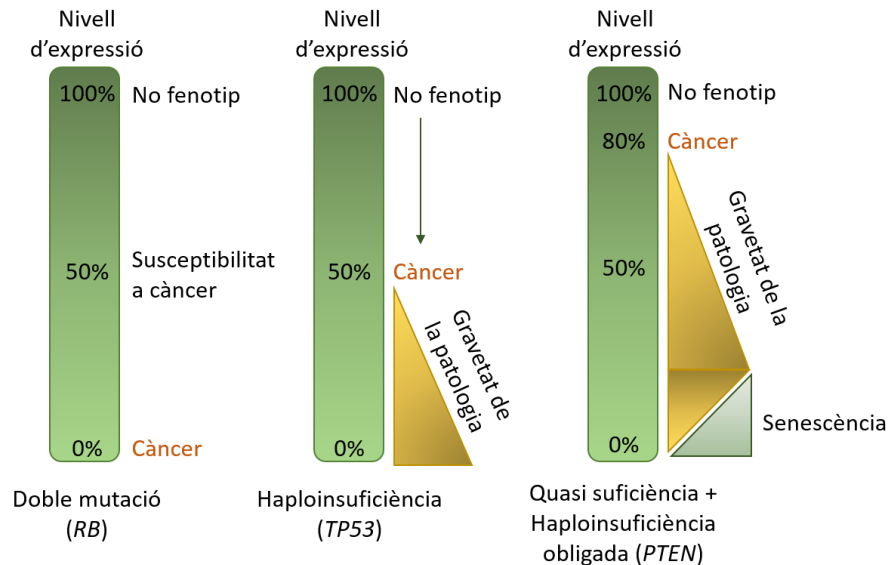


Figura 8: Paradigmes de la supressió tumoral. El comportament de *PTEN* com a gen supressor tumoral no s'ajusta al model de doble mutació ni al d'haploinsuficiència, sinó a un tercer paradigma que es coneix amb el nom de quasi suficiència i haploinsuficiència obligada (modificat de (Berger et al., 2011)).

En qualsevol cas, una gran proporció de càncers humans esporàdics presenten pèrdua de l'expressió de *PTEN* de manera parcial o total (Milella et al., 2015). No obstant, la desaparició completa de *PTEN* acostuma a tenir lloc en càncers que es troben en un estadi avançat (Hollander et al., 2011). A més, la pèrdua de la funció de *PTEN* pot succeir a través de diferents mecanismes, que inclouen tant alteracions genètiques com epigenètiques, i que engloben mutacions puntuals, delecions, hipermetilació del promotor, LOH (*loss of heterozigosity*), amplificació dels miRNA que en controlen l'expressió, i fins i tot, una localització alterada de la proteïna, entre altres. També, les mutacions somàtiques poden ocórrer en qualsevol dels seus dominis, de manera que cada regió diferent de la proteïna, i en conseqüència, l'activitat de *PTEN* que s'hi relaciona, pot ser patològicament rellevant per a l'inici i la progressió del càncer (Milella et al., 2015). Finalment, és especialment important el tipus d'alteració que sofreix *PTEN* per a l'estudi de la seva implicació en la patologia tumoral, i podria

fins i tot, tenir certa implicació clínica. L'any 1998, es va descriure que els pacients amb síndrome de Cowden que presentaven mutacions sense sentit de *PTEN* en el domini fosfatasa desenvolupaven un major nombre de lesions que aquells que en presentaven delecions (Marsh et al., 1998). Recentment, s'ha revelat el mecanisme molecular que explica aquest fenotip. S'ha demostrat que *PTEN* existeix en una forma heterodimèrica que presenta activitat fosfatasa lipídica. La presència de mutacions puntuals en *PTEN* dona lloc a la formació d'heterodimers amb la proteïna *wild-type*, que inactiven així, la seva activitat fosfatasa. Per tant, les formes mutades de *PTEN* actuen com a dominants negatius, que acaben desencadenant un fenotip més agressiu en comparació amb la pèrdua de la proteïna (Papa et al., 2014).

Les alteracions en *PTEN* poden trobar-se en càncers de mama, pulmó, tiroide, endometri, pròstata, còlon, melanomes, limfomes i leucèmies, gliomes, i feocromocitomes, entre altres. No obstant, la freqüència d'alteracions en *PTEN* és variable en funció del tipus tumoral (Hollander et al., 2011). En aquesta tesi, ens centrarem en el paper de *PTEN* en el càncer d'endometri, pròstata, tiroide i càncer colorectal, que es descriuen a continuació, més extensament.

2.1 *PTEN* en el càncer d'endometri

2.1.1 L'úter i l'endometri en condicions fisiològiques

L'úter és un òrgan clau del sistema reproductor femení ja que proporciona l'ambient adequat perquè es produeixi la implantació i el posterior desenvolupament embrionari i fetal.

En humans, es tracta d'un òrgan muscular buit de paret gruixuda, amb forma de pera, que es localitza a la cavitat pèlvica, entre la bufeta i el recte. (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

Des d'un punt de vista histològic, la paret uterina està formada per tres capes diferents, que són, començant des de la llum cap a fora, les següents: l'endometri, que és la capa més interna i constitueix la mucosa de l'úter, el miometri, que és la capa muscular de l'úter i la part més gruixuda de la paret uterina, i el perimetri o serosa, que és la capa serosa externa o la coberta peritoneal visceral del úter. El perimetri cobreix tota la superfície posterior de l'úter però només una part de la superfície anterior. La resta de la superfície anterior consisteix en teixit connectiu o adventícia.

Introducció

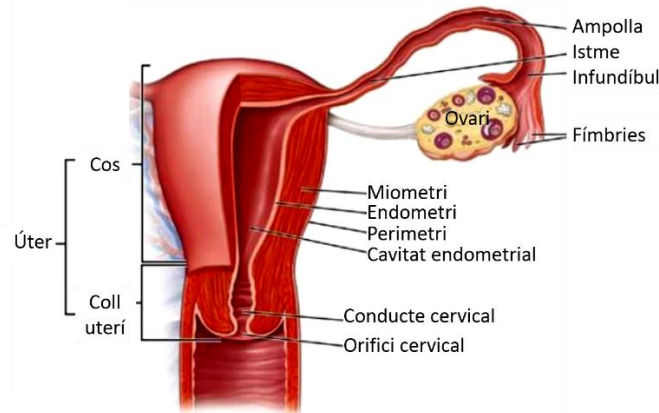


Figura 9: Representació esquemàtica dels òrgans reproductors interns femenins humans. Vista frontal que il·lustra l'obertura des de la vagina fins a l'úter i les trompes de Fal·lopi. Es remarquen les tres capes de la paret uterina: la capa interna, l'endometri, que revesteix la cavitat uterina, la capa intermèdia, més gruixuda, el miometri, i la capa externa, el perimetri (modificat de (Porth and Grossman, 2014)).

En concret, l'endometri està revestit per un epitelí cilíndric simple amb cèl·lules secretores i cilíades. L'epitelí superficial s'invagina a la làmina pròpia subjacent, l'estroma endometrial, per formar les glàndules uterines, que de vegades, poden ramificar-se a la part més profunda de l'endometri. Cal remarcar que no existeix una capa submucosa que separi l'endometri del miometri.

Al llarg de la vida fèrtil, l'endometri està compost per dues capes o zones que es diferencien estructural i funcionalment, i que són l'estrat o capa funcional i l'estrat o capa basal. Aquestes dues capes són importants durant el cicle menstrual, que prepara l'endometri per a una possible implantació de l'embrió i posterior embaràs. El cicle menstrual es troba coordinat amb el cicle ovàric, ja que les hormones d'aquest darrer regulen al primer, i pot descriure's en tres fases successives, que recullen processos proliferatiu i degeneratiu. Així, la fase proliferativa (dies 6-14) s'inicia pels estrògens ovàrics i es caracteritza per la reconstitució de les glàndules de l'estrat funcional a partir de les cèl·lules epitelials de la porció basal. Al final d'aquesta fase de proliferació, l'endometri presenta un espessor de 3 mm i les glàndules presenten una llum estreta i són relativament rectes, amb un aspecte lleument onejat. A continuació, té lloc la fase secretora (dies 15-28), que dóna lloc a una sèrie de canvis a l'estrat funcional per efecte de la progesterona. Les glàndules creixen i adquireixen un aspecte de tirabuixó i la seva llum es distén a mesura que s'omple de productes de secreció. L'endometri es torna edematós i pot acabar assolint un gruix d'entre 5 i 6 mm. Finalment, té lloc la fase menstrual, que comença a causa de la davallada en la secreció ovàrica de progesterona i estrògens. Es caracteritza perquè les glàndules detenen la seva secreció i l'endometri redueix el seu espessor fins a 1 mm a mesura que l'estroma es torna menys edematós. Es produeix la destrucció de l'epitelí de revestiment superficial i

el trencament dels vasos sanguinis. Així, es forma el flux hemàtic corresponent a la menstruació. El desprendiment continua fins que només queda la capa basal. L'estrat funcional es regenerarà amb el següent cicle, durant la fase proliferativa (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

Així doncs, l'estrat funcional pot definir-se com la porció de l'endometri que prolifera i es degenera durant el cicle menstrual, i l'estrat basal, com la capa que serveix com a font per a la regeneració de l'estrat funcional després de la menstruació.

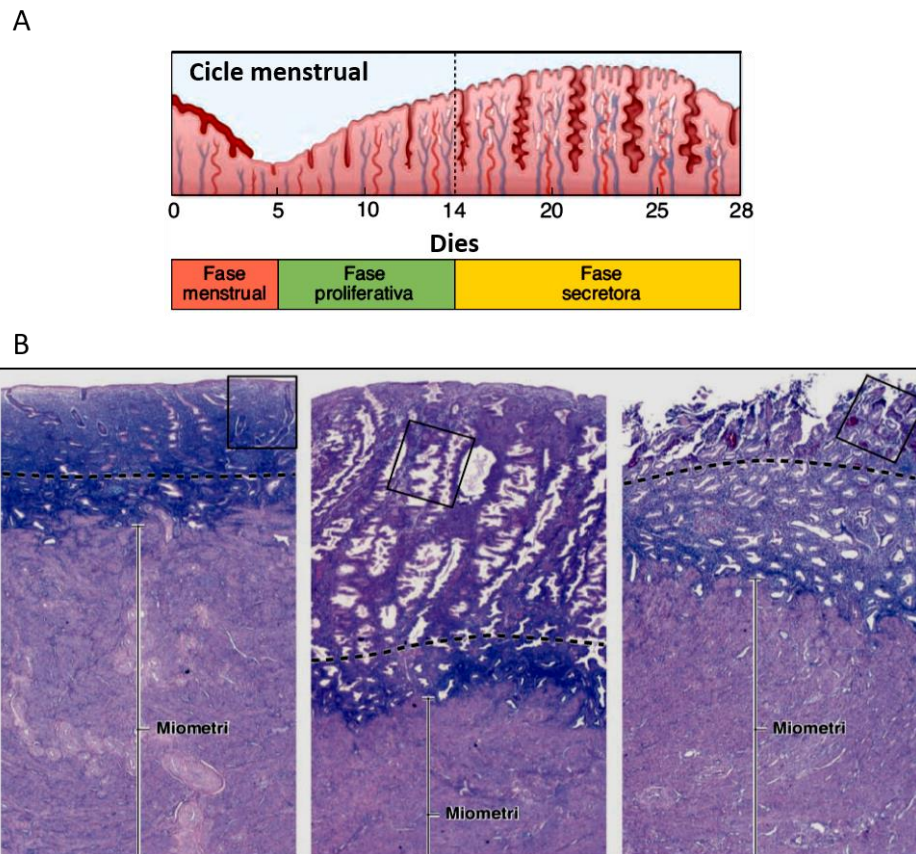


Figura 10: Esquema del cicle menstrual. (A) Representació esquemàtica l'evolució del cicle menstrual i els canvis que tenen lloc a l'endometri. (B) Fotomicrografies del revestiment uterí en les fases proliferativa (esquerra), secretora (central) i menstrual (dreta). A la fase proliferativa, l'estrat funcional, separat de l'estrat basal per mitjà de la línia de punts, augmenta molt el seu espessor. Durant la fase secretora, les glàndules adquireixen un aspecte tortuós a causa del seu gran creixement. L'endometri és encara més gruixut. Finalment, durant la fase menstrual, l'estrat funcional degenera i es desprèn (modificat de (Ross and Pawlina, 2015)).

A diferència del humans, en els ratolins l'úter és bicorni, és a dir, es troba constituït per dues branques que comencen a l'oviducte i que s'uneixen caudalment en forma d'Y, per connectar amb la vagina a través del cèrvix. En néixer, l'úter dels ratolins no presenta glàndules endometrials i consisteix en un epiteli simple envoltat d'un mesènquima indiferenciat. La invaginació de l'epiteli glandular no té lloc

Introducció

fins al cinquè dia després del naixement, i la gènesi de les glàndules endometrials comença a partir del setè dia. Fins i tot en l'edat adulta, les glàndules endometrials dels rosegadors són tubulars simples, no excessivament entortolligades ni ramificades (Croy et al., 2014).

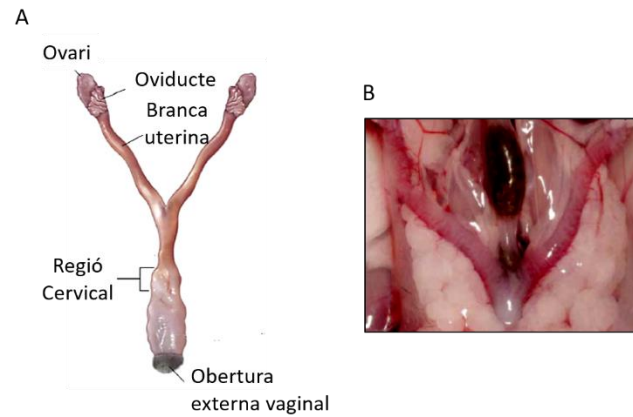


Figura 11: Anatomia de l'úter murí. (A) Representació de l'úter de ratolí, on es distingeixen els ovaris, les dues branques i el cervix. (B) Fotografia real d'un úter de ratolí (modificat de (Treuting et al., 2017)).

De manera similar al que ocorre en humans, l'úter de les femelles adultes de ratolí també experimenta canvis cíclics de creixement i degeneració, que es coneixen amb el nom de cicle estral. El cicle estral comença un cop s'assoleix la maduresa sexual (entre les 5-7 setmanes d'edat) i es produeix de manera continua durant tot l'any, controlat per factors ambientals, com el fotoperíode, la temperatura, la disponibilitat d'aliments i les feromones. Té una durada d'entre 4-5 dies i pot dividir-se en 4 etapes diferenciades (Groothuis et al., 2007; Sato et al., 1997; Tan et al., 2003). En primer lloc, el proestre té una durada aproximada de 18 hores i es caracteritza per l'inici de la proliferació de les cèl·lules endometrials. Durant aquesta fase, té lloc un increment gradual de les concentracions d'estrògens. A continuació, durant l'estre, que dura 28 hores, es dona una proliferació cel·lular abundant i l'úter es prepara per a la implantació. Aquesta etapa constitueix el període receptiu de les femelles i s'hi produeix la ovulació. Tot seguit, en cas que no s'hagi produït la fecundació, té lloc el metaestre. Amb una durada de 8 hores, es caracteritza per una apoptosi massiva de les cèl·lules epitelials i uns nivells molt baixos d'estrògens. Finalment, la femella resta en repòs i es manté sexualment inactiva durant la fase coneguda com diestre, que té una durada d'unes 35 hores.

2.1.2 El càncer d'endometri

El carcinoma d'endometri (*endometrial carcinoma*, EC) és el càncer més habitual del tracte genital femení i representa la quarta neoplàsia més freqüent en la dona en els països desenvolupats (Murali

et al., 2014). La seva incidència actual se situa entre 10-20 nous casos anuals per cada 100.000 habitants (Piulats et al., 2017). Generalment, el EC es troba confinat a l'úter i s'associa a un bon pronòstic, de manera que la supervivència a 5 anys oscil·la entre el 74 i el 91%. Tanmateix, en aproximadament el 15-20% dels casos, el tumor es presenta de forma disseminada o recidiva després del tractament, reduint la supervivència a 5 anys a menys d'un 20% (Murali et al., 2014; Siegel et al., 2017). El 67% de tots els càncers uterins s'originen a partir de les glàndules de l'endometri, raó per la qual reben el nom d'adenocarcinomes (Rose, 1996).

Bokhman va descriure per primera vegada l'existència de dues manifestacions clinicopatològiques diferents del càncer d'endometri en funció de criteris clínics, endocrins i epidemiològics (Bokhman, 1983). Tradicionalment, els ECs s'han classificat en tumors de tipus I o carcinomes endometrioides (*endometrioid endometrial carcinoma*, EEC) i tumors de tipus II o carcinomes no endometrioides (*non-endometrioid endometrial carcinoma*, NEEC). Els ECCs representen el 85% dels casos i tenen lloc majoritàriament en dones pre- i peri-menopàusiques. Són tumors dependents d'estrògens que es desenvolupen a partir de lesions precursors (hiperplàsia endometrial/neoplàsia intraepitelial endometrioides). Microscòpicament, els EECs de baix grau (EEC 1-2) contenen glàndules tubulars, que recorden d'alguna manera a l'endometri proliferatiu, encara que amb un cert grau de complexitat amb fusió entre glàndules i patró cribiforme. Per contra, els ECCs d'alt grau presenten un patró de creixement sòlid. Els NEECs, que són majoritàriament tumors serosos, es desenvolupen en dones més grans post-menopàusiques en absència de hiperestrogenisme i s'associen amb atrofia endometrial. Entre les seves característiques microscòpiques destaca la presència de papil·les gruixudes, fibroses o edematoses amb una estratificació prominent de les cèl·lules tumorals, i de cèl·lules anaplàsiques amb citoplasmes eosinòfils grans. La gran majoria dels EECs són tumors de baix grau (graus 1 i 2) i s'associen amb un bon pronòstic quan es troben confinats a l'úter. Els carcinomes d'endometri d'alt grau engloben els ECCs de grau 3, que representen un 10% del total dels casos de EC, són agressius i acostumen a associar-se amb metàstasis als ganglis limfàtics, i els tumors serosos, que són molt agressius i representen un 15% dels ECs. No obstant, tot i no ser els tipus tumorals més freqüents són els responsables d'un 39% i un 27% de les morts per càncer, respectivament (Kandoth et al., 2013; Piulats et al., 2017).

Més enllà de les diferències histològiques, els tumors de tipus I i tipus II s'associen a certes alteracions moleculars. Així, els EECs presenten inestabilitat de microsatèl·lits (*microsatellite instability*, MSI) i mutacions freqüents a *PTEN* (77%), *PI3KCA* (53%), *CTNNB1* (36%), *ARID1A* (35%) i *KRAS* (24%), entre

Introducció

altres. En canvi, els NEECs mostren inestabilitat cromosòmica, LOH, mutacions a *TP53* (90,7%), *PI3KCA* (41,9%) i altres alteracions moleculars que afecten a *SKT15*, *p16*, *E-cadherina* i *HER2*(Kandoth et al., 2013; Piulats et al., 2017).

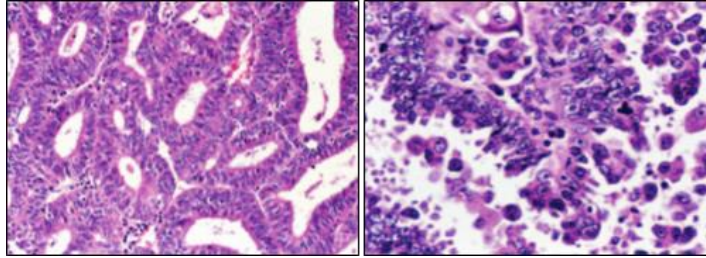


Figura 12: Carcinoma d'endometri. A l'esquerra, tall histològic d'un carcinoma d'endometri endometriode de grau 1, que presenta una citoarquitectura ben diferenciada. A la dreta, tall histològic d'un carcinoma d'endometri no endometriode on s'aprecia una citoarquitectura aberrant, característica d'un tumor d'alt grau (modificat de (Prat et al., 2007)).

Malgrat tot, el carcinoma d'endometri és una malaltia molt heterogènia, de manera que la seva classificació s'ha anat actualitzant a mesura que s'han detectat diferents tipus histològics. Així, recentment, la WHO (*World Health Organization*) ha definit una nova classificació histològica dels ECs que inclou 9 subtipus diferents i que s'enumeren a la taula 1. No obstant, els EECs i els carcinomes serosos continuen representant la gran majoria dels casos(Piulats et al., 2017).

Subtipus del Carcinoma Endometrial

- Carcinoma endometriode
- Carcinoma mucinós
- Carcinoma intraepitelial serós endometrial
- Carcinoma serós
- Carcinoma de cèl·lules clares
- Tumors neuroendocrins
- Adenocarcinoma de cèl·lula mixta
- Carcinoma no diferenciat
- Carcinoma desdiferenciat

Taula 1: Classificació histològica dels carcinomes endometrials segons la WHO a l'any 2014 (modificat de (Piulats et al., 2017)).

Malgrat els esforços per establir una classificació histològica completa i ben definida dels tumors endometrials, moltes vegades aquesta és difícil d'aplicar a nivell de la pràctica clínica. Existeixen solapaments entre les característiques dels diferents subtipus que en dificulten la seva distinció. Concretament, moltes vegades resulta complicat diferenciar els EECs d'alt grau dels tumors serosos.

Una correcta classificació del tipus tumoral és crítica per tal de seleccionar la teràpia clínica adjuvant apropiada per a cada cas. En aquest sentit, s’han realitzat importants estudis moleculars que han proporcionat informació útil a l’hora de predir el pronòstic i la resposta al tractament. Així, el TCGA (*The Cancer Genome Atlas Research Network*) va realitzar l’any 2013 un estudi a nivell genòmic, transcriptòmic i proteòmic per tal de caracteritzar més extensament aquesta patologia tan heterogènia. Així, es va establir una nova classificació que inclou 4 subtipus diferents en funció de l’espectre de mutacions, de les alteracions en el número de còpies i de la inestabilitat de microsatèl·lits, i que s’especifica a la taula 2 (Kandoth et al., 2013; Murali et al., 2014):

	POLE (Ultramutat)	MSI (Hipermutat)	Baix número de còpies (endometriode)	Alt número de còpies (pseudoserós)
Alteracions en el número de còpies	Baix	Baix	Baix	Alt
MSI/Metilació MLH1	Variable	MSI elevat	MSI estable	MSI estable
Taxa de mutacions	Molt elevada	Elevada	Baixa	Baixa
Prevalença de mutacions	<i>POLE</i> (100%) <i>PTEN</i> (94%) <i>PIK3CA</i> (71%) <i>FBCW7</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%)
Tipus histològic	Endometriode	Endometriode	Endometriode	Serós, endometriode i mixt
Grau	Variable (1-3)	Variable (1-3)	Grau 1 i 2	Grau 3
PFS	Bona	Intermèdia	Intermèdia	Baixa

Taula 2: Classificació de les 4 classes de tumors d’endometri endometrioides i serosos en funció de les seves característiques genòmiques. PFS: *progression free survival* (modificat de (Murali et al., 2014)).

El 35-50% dels carcinomes d’endometri esporàdics presenten mutacions en *PTEN*, i aquest percentatge s’eleva fins al 80% en els EECs. Fins i tot, entre un 15-55% de les hiperplàsies endometrials presenten pèrdua de l’activitat del gen supressor tumoral, suggerint que executa un paper clau a l’inici de la malaltia. Concretament, el 60% de les mutacions acostumen a ser insercions o delecions que

Introducció

donen lloc a canvis en la pauta de lectura, que són habituals en MSI. Per altra banda, també s'ha observat LOH per deleció en un 40% dels carcinomes endometrials (Eritja et al., 2015; Hollander et al., 2011). Un dels mecanismes addicionals descrits per a la inactivació de *PTEN* és la hipermetilació del seu promotor (Salvesen et al., 2001).

Finalment, els estudis realitzats fins al moment mostren taxes més elevades de mutacions de *PTEN* en tumors d'endometri amb MSI, suggerint que *PTEN* pot ésser objecte de mutacions en un context on els mecanismes de reparació del dany al DNA fallen. La deleció o hipermetilació de *MLH1* s'ha associat amb una LOH de *PTEN* més prematura (Kandoth et al., 2013; Wang et al., 2002).

2.2 PTEN en el càncer de pròstata

2.2.1 La pròstata en condicions fisiològiques

La pròstata és un òrgan fibromuscular i glandular, que en els humans, presenta una forma i grandària comparables als d'una nou. Es tracta de la glàndula sexual accessòria més gran del sistema genital masculí dels mamífers i la seva funció principal consisteix en secretar un líquid clar, lleugerament alcalí (pH 7,29) que contribueix a la composició del semen. Es troba ubicada a la pelvis, just per sota de la bufeta i davant del recte, rodejant la uretra proximal, que és el conducte de transport de l'orina i el semen (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

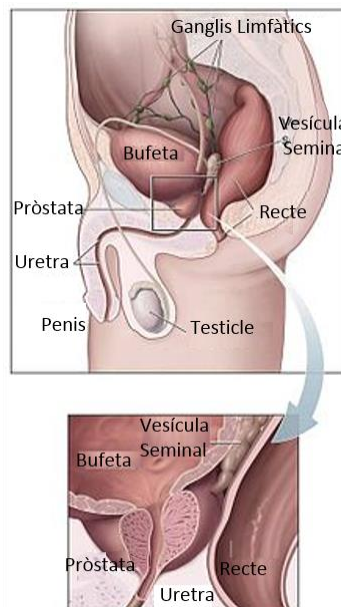


Figura 13: Representació de la pròstata humana i de la seva localització (modificat de la pàgina web del *National Cancer Institute*: www.cancer.gov).

Anatòmicament, la pròstata es divideix en diverses zones morfològiques i funcionals, que són clínicament diferents. Aquestes zones presenten trets histològics característics i, sobretot, tenen predisposició específica a malalties neoplàsiques benignes o malignes. Per una banda, la zona central envolta els conductes ejaculadors a mesura que travessen la pròstata. Conté entorn el 25% del teixit glandular i és resistent tant als carcinomes com a la inflamació. Per altra banda, la zona perifèrica constitueix el 70% del teixit glandular de la pròstata. Envolta la zona central i ocupa la part posterior i les porcions laterals de la glàndula. La major part dels carcinomes prostàtics s'originen en aquesta zona, que es pot palpar en un tacte rectal. Aquesta zona també és la més susceptible a la inflamació. També s'hi troba la zona de transició, que envolta la uretra prostàtica, constitueix el 5% del teixit glandular prostàtic i conté les glàndules mucoses. Aquesta zona està íntimament lligada amb el desenvolupament de la hiperplàsia prostàtica benigna (*benign prostatic hyperplasia*, BPH). En gent gran, les cèl·lules parenquimàtiques d'aquesta zona pateixen freqüentment una proliferació extensa i formen masses nodulars de cèl·lules epitelials. Per acabar, la zona periuretral conté glàndules mucoses i submucoses. En etapes avançades de la BPH, aquesta zona pot experimentar també una proliferació patològica, però sobretot dels components de l'estroma.

A més, la superfície anterior de la pròstata, per davant de la uretra, està ocupada per un estroma fibromuscular format per teixit connectiu dens i irregular amb una gran quantitat de fibres musculars llises (Ross and Pawlina, 2015; Shappell et al., 2004).

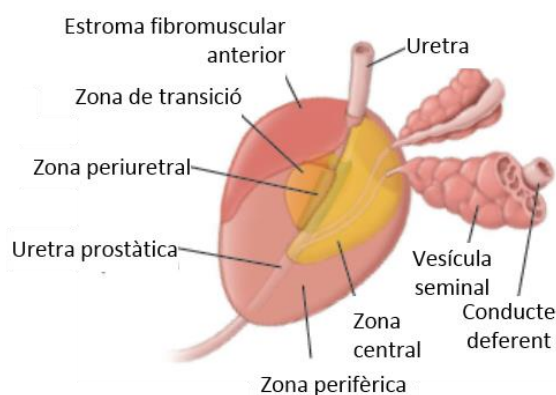


Figura 14: Dibuix esquemàtic de la pròstata humana. S'hi il·lustra la ubicació relativa, per colors, de les 4 zones de la pròstata i l'estroma fibromuscular anterior de la glàndula (modificat de (Ross and Pawlina, 2015)).

En cadascuna de les zones prostàtiques, l'epiteli glandular és generalment cilíndric simple, tot i que poden identificar-se parcel·les d'epiteli simple cúbic, pla simple i de vegades, pseudoestratificat. A nivell histològic, l'epiteli de la pròstata madura presenta al menys tres tipus cel·lulars diferents. Les

Introducció

cèl·lules epitelials luminals secretores són predominants i formen un epiteli cilíndric. Són dependents d'andrògens i produeixen diverses secrecions al lumen, com PSA (*prostate-specific antigen*) o fosfatasa alcalina. El segon tipus cel·lular més abundant són les cèl·lules epitelials basals, que es localitzen entre les cèl·lules luminals i la membrana basal. No presenten activitat secretora ni expressen el receptor d'andrògens. Es postula que entre elles resideixen les cèl·lules mare responsables de la regeneració tissular. Finalment, les cèl·lules neuroendocrines representen una població minoritària dispersada per tota la membrana basal, i proporcionen senyals paracrines que suporten el creixement de les cèl·lules luminals (Abate-Shen and Shen, 2000).

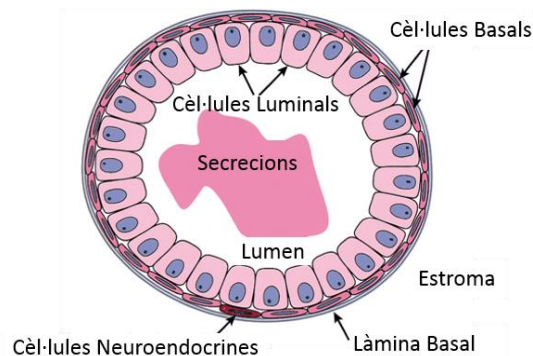


Figura 15: Representació esquemàtica dels tipus cel·lulars de l'epiteli prostàtic humà (modificat de (Abate-Shen and Shen, 2000)).

De forma global, les glàndules prostàtiques es disposen en tres capes concèntriques al voltant de la uretra: una capa mucosa interna, una capa submucosa intermèdia i una capa perifèrica, que conté les glàndules prostàtiques principals, que generen quasi tot el volum secretat. Les glàndules de la capa mucosa segreguen directament cap a la uretra, mentre que les altres dues capes connecten amb la uretra a través d'una sèrie de conductes (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

A diferència de la pròstata humana, que es troba constituïda per un únic lòbul, la pròstata de ratolí presenta una estructura lobular formada per 4 lòbuls diferents, l'anterior (AP), el ventral (VP), el dorsal (DP) i el lateral (LP). Aquests darrers també es coneixen col·lectivament com lòbul dorsolateral. Tots 4 lòbuls es troben separats els uns dels altres i recoberts per una càpsula fina de teixit mesotelial. Entremig, s'hi localitza una capa de teixit connectiu fibroadipós lax que conté vasos, nervis i ganglis. Cada lòbul està compost per una sèrie de conductes ramificats o túbuls cecs, que es troben envoltats d'una túnica fibromuscular fina, no comparable amb el dens estroma present a la pròstata humana (Abate-Shen and Shen, 2000; Shappell et al., 2004).

A nivell histològic, cadascun dels lòbuls de la pròstata murina presenta trets característics que el diferencien de la resta. Per una banda, el lòbul anterior, també anomenat glàndula coagulant, és proper a les vesícules seminals, al llarg de tota la seva longitud corba. Histològicament, presenta un patró papil·lar i cribiforme més complex que els altres lòbuls, amb cèl·lules epitelials cuboïdals-columnars. Per l'altra banda, el lòbul ventral presenta una mucosa plana, amb invaginacions epitelials puntuals. El lòbul dorsal presenta un epiteli columnar simple, lleugerament estratificat de manera ocasional. El grau d'invaginació de la mucosa és intermedi, menor que en AP. Finalment, el lòbul lateral presenta un epiteli cuboide, lleugerament columnar, i una superfície luminal plana, amb escasses invaginacions de la mucosa.

Les glàndules de cadascun dels lòbuls de la pròstata murina sembla que tenen poblacions cel·lulars homòlogues a les presents a la pròstata humana. Així, disposen de cèl·lules secretores luminals, una capa de cèl·lules basals i una menor població de cèl·lules neuroendocrines (Abate-Shen and Shen, 2000; Shappell et al., 2004).

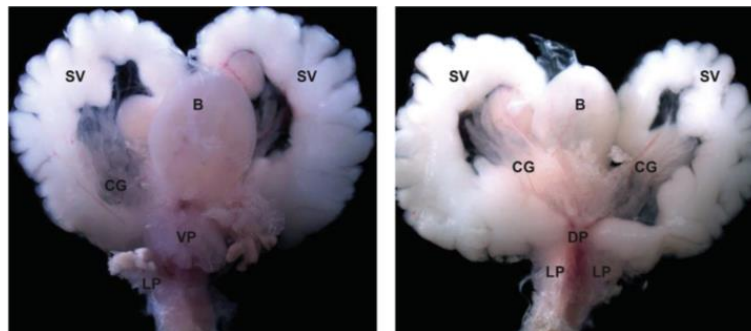


Figura 16: Anatomia de la pròstata murina. A l'esquerra, vista ventral de la pròstata de ratolí. A la dreta, vista dorsal. S'hi distingeixen els 4 lòbuls: glàndula coagulant (CG), lòbul dorsal (DP), lòbul lateral (LP) i lòbul ventral (VP), i també les vesícules seminals (SV) i la bufeta (B) (modificat de (Treuting et al., 2017)).

2.2.2 El càncer de pròstata

El càncer de pròstata (PCa) és el càncer més diagnosticat en homes i representa la tercera causa de mort per càncer en el sexe masculí. S'estima que durant l'any 2017 es diagnosticaran 161.360 nous casos de PCa i tindran lloc 26.730 morts a causa d'aquest. Així doncs, la previsió és que representi el 19% dels nous casos diagnosticats i sigui responsable del 8% de les morts (Siegel et al., 2017).

L'edat és el principal factor de risc per al PCa. De fet, aproximadament el 95% dels homes majors de 70 anys presenten hiperplàsia prostàtica. No obstant, les lesions preneoplàsiques poden diagnosticar-

Introducció

se entre els 20 i els 50 anys, suggerint que es tracta d'una malaltia que es desenvolupa lentament i que presenta una llarga fase preclínica(Valkenburg and Williams, 2011).

El PCa és molt dependent dels andrògens per créixer i proliferar. Per aquest motiu, la castració química, per mitjà de la deprivació androgènica, s'ha convertit en el tractament estàndard, i generalment, causa la regressió tumoral. La cirurgia i la radioteràpia també són claus en el tractament del PCa. No obstant, cap d'aquestes estratègies és vàlida quan el PCa metastatitza i/o recidiva(Shen and Abate-Shen, 2010). El conjunt d'aquestes estratègies terapèutiques i les millores en el diagnòstic han permès assolir una supervivència als 5 anys del 98,9% per als pacients amb una malaltia local(Valkenburg and Williams, 2011). Per tant, encara que molts homes pateixen PCa, la majoria moren per altres causes, fins i tot, molt abans que els símptomes del PCa es manifestin clínicament(Bell et al., 2015). No obstant, la supervivència disminueix dràsticament al 29,3% per als casos de malaltia metastàtica. Les metàstasis esquelètiques són les més freqüents i es troben aproximadament en el 90% dels pacients que moren de PCa(Valkenburg and Williams, 2011).

A diferència d'altres càncers d'origen epitelial, no existeix una classificació histopatològica ben definida del PCa que n'identifiqui diferents subtipus que variïn en el pronòstic o tractament. Malgrat la gran diversitat fenotípica, el 95% dels tumors de pròstata són adenocarcinomes, de tipus acinar, i comparteixen molts dels trets característics d'altres càncers epitelials. Potser, la variant més significativa histològicament parlant és el càncer de pròstata neuroendocrí, però representa un nombre molt petit dels casos de PCa diagnosticats. No obstant, habitualment poden observar-se focus de diferenciació neuroendocrina en tumors recurrents al tractament quirúrgic o de deprivació androgènica, i s'associen amb el desenvolupament de tumors resistents a la castració. En qualsevol cas, s'espera que els estudis genòmics a gran escala permetin establir una classificació molecular que tingui el potencial per identificar noves dianes terapèutiques i permeti estratificar fidedignament els pacients(Colicchia et al., 2017; Shen and Abate-Shen, 2010; Taylor et al., 2010).

El PCa és una malaltia heterogènia i multifocal en què el tumor conviu amb glàndules benignes i focus de lesions precursorses. S'ha descrit l'existència d'una lesió premaligna precursora que rep el nom de neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN). El PIN es caracteritza a nivell histològic per l'existència d'una hiperplàsia epitelial luminal, amb una reducció de les cèl·lules basals i atípia nuclear. A més, quan el PIN és d'alt grau (*high-grade* PIN, hgPIN) apareix un elevat increment en els marcadors de proliferació cel·lular. Encara que la relació del PIN amb el PCa no s'ha demostrat de forma conclouent, es pensa que aquestes lesions precursorses podrien evolucionar a tumors de pròstata. A més, els

adenocarcinomes poden existir en un estat latent o clínic, i poden arribar a convertir-se en invasius i/o metastàtics. Així doncs, sembla que a la glàndula prostàtica poden tenir lloc múltiples esdeveniments neoplàsics que condicionaran l'avenç i la progressió de la malaltia (Abate-Shen and Shen, 2000; Shen and Abate-Shen, 2010).

Un dels esdeveniments més habituals que té lloc a l'inici d'un 80% dels processos tumorals a la pròstata és la pèrdua de la regió 8p12-21. Existeixen múltiples treballs que evidencien a *NKX3.1* com al gen candidat per aquesta regió. A més, també pot tenir lloc la sobreexpressió de *MYC*. Durant la progressió cap a adenocarcinoma de pròstata tenen lloc una sèrie d'alteracions moleculars que causen la hiperactivació de les vies RAS-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) i PI3K/AKT, essent la inactivació de *PTEN* un dels factors clau. A més, també s'han descrit alteracions en l'expressió de gens implicats en cicle cel·lular, com *RB* i *p27*. Finalment, en estadis més avançats i metastàtics del PCa s'observa pèrdua de la dependència a andrògens, mutacions en *TP53* i desregulació dels gens reguladors de l'apoptosi, com la sobreexpressió de *Bcl-2* (*B cell lymphoma 2*), entre altres (Abate-Shen and Shen, 2000; Shen and Abate-Shen, 2010).

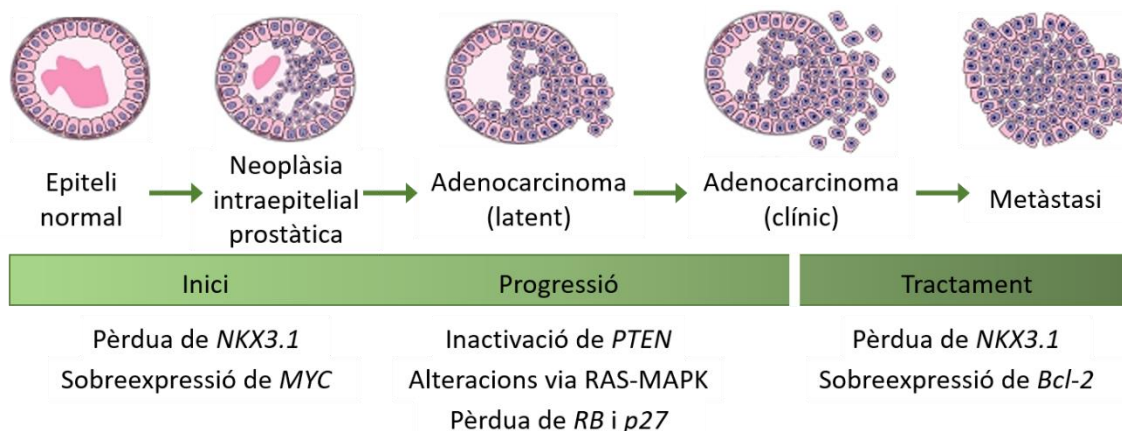


Figura 17: Etapes en el desenvolupament del càncer de pròstata. S'indiquen les diferents fases, els esdeveniments característics i les principals alteracions moleculars que hi tenen lloc (modificat de (Shen and Abate-Shen, 2010)).

La hiperactivació de la via PI3K/AKT és la segona aberració genòmica més comuna en el PCa avançat, després de les alteracions en la senyalització androgènica, i acostuma a tenir lloc a través de la inactivació de *PTEN*. La pèrdua del gen supressor tumoral és un esdeveniment primerenc en la carcinogènesi de pròstata, que fins i tot, es relaciona amb lesions de tipus PIN. Generalment, aquestes fases mostren haploinsuficiència del gen, i és en estadis més avançats o metastàtics quan *PTEN* s'inactiva completament. La freqüència de mutació varia en funció de l'estadi tumoral entre un 16 i

Introducció

un 41%, essent els tumors resistents a la castració els que presenten nivells més alts de mutació. En aquests casos, la pèrdua en homozigosi de *PTEN* és el fenomen més freqüent.

Així doncs, la funció de *PTEN* es perd freqüentment en el PCa, ja sigui per alteracions en el número de còpies, reorganitzacions estructurals i/o mutacions puntuals. La deleció de *PTEN* és l'alteració més habitual, mentre que les mutacions puntuals representen una minoria dels casos. Concretament, s'han observat delecions en el gen supressor tumoral en un 10-70% dels pacients que han estat sotmesos a tractament quirúrgic (Ciccarese et al., 2017; Colicchia et al., 2017; Wise et al., 2017).

2.3 *PTEN* en el càncer de tiroide

2.3.1 La tiroide en condicions fisiològiques

La tiroide és una glàndula endocrina bilobulada, localitzada a la regió anterior del coll, que consisteix en dos grans lòbuls laterals ubicats a cada costat de la laringe i de la tràquea superior, i que es connecten per una banda prima de teixit tiroïdal anomenat istme. Cada lòbul presenta una longitud aproximada de 5 cm, una amplada de 2,5 cm i un pes d'entre 20 i 30 g. La glàndula està rodejada per una càpsula prima de teixit connectiu i presenta una alta vascularització. La tiroide s'encarrega de la producció de tres hormones indispensables per al metabolisme i l'homeòstasi normals: la tiroxina (3,3',5,5'-tetrayodotironina, T4), la 3,3',5-triiodotironina (T3) i la calcitonina (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

La tiroide es compon d'un gran nombre d'estructures minúscules similars a sacs, més o menys esferoïdals, que s'anomenen fol·licles, i que són les unitats funcionals i estructurals de la glàndula. Centenars de milers de fol·licles, el diàmetre dels quals varia de 0,2 mm a 1 mm, constitueixen gairebé tota la massa de la glàndula. Els fol·licles presenten una paret formada per un epitelí simple cúbic o cilíndric baix anomenat l'epitelí fol·licular, i contenen en el seu interior una massa gelatinosa denominada col·loide. Les superfícies apicals de les cèl·lules estan en contacte amb el col·loide i les superfícies basals es recolzen sobre una làmina basal típica. L'epitelí fol·licular conté dos tipus cel·lulars diferents. Per una banda, les cèl·lules fol·liculars o tiròcits constitueixen el principal component cel·lular de l'epitelí i són les responsables de la producció de les hormones T3 i T4. Varien en forma i mida d'acord amb l'estat funcional de la glàndula. Per l'altra banda, les cèl·lules parafol·liculars o cèl·lules C se situen en la perifèria de l'epitelí fol·licular i per dins de la làmina basal del fol·licle, de manera que no estan exposades a la llum fol·licular. S'encarreguen de la secreció de calcitonina, que regula el metabolisme del calci. Són difícils d'identificar amb el microscopi òptic.

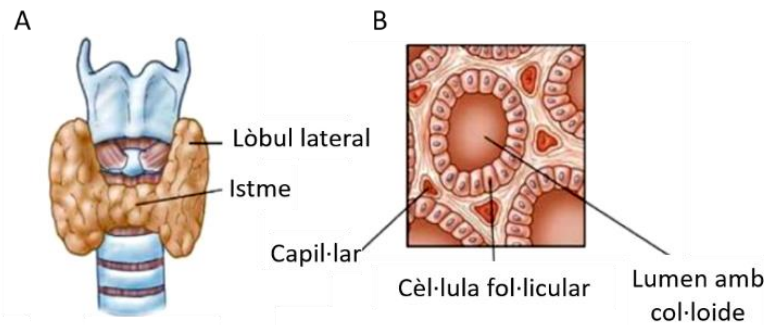


Figura 18: Representació esquemàtica de la tiroide. (A) Vista anterior de l'anatomia de la tiroide. (B) Estructura microscòpica dels fol·licles (modificat de (Porth and Grossman, 2014)).

Les característiques generals de la tiroide de ratolí, tant a nivell histològic com fisiològic, són comparables amb les de la tiroide humana, tret de la diferència en la mida (Treuting et al., 2017).

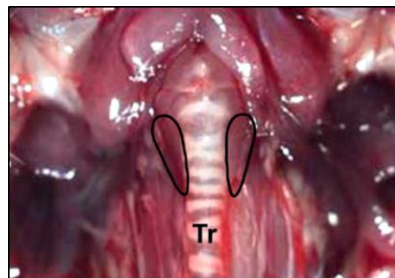


Figura 19: Anatomia de la glàndula tiroide de ratolí. S'hi distingeixen els dos lòbuls (delineats) de la tiroide, disposats un a cada costat de la tràquea (Tr). Els lòbuls estan connectats per un istme prim que no és aparent (modificat de (Treuting et al., 2017)).

2.3.2 El càncer de tiroide

El carcinoma de tiroide és el càncer endocrí més comú. Afecta un 1% de la població i la seva incidència sembla que comença a estabilitzar-se, després d'un augment continu al llarg dels anys. La incidència del càncer de tiroide és 3 vegades més gran en les dones que en els homes, i se situa en 21 i 7 nous casos anuals per cada 100.000 habitants, respectivament. No obstant, la taxa de mort és equivalent entre els dos sexes i es troba en 0,5 morts per cada 100.000 habitants (Siegel et al., 2017). La supervivència a 5 anys en casos de càncer de tiroide localitzat és superior al 95%. No obstant, hi ha un subgrup dels pacients, el 20-30%, que desenvolupen malaltia recurrent i/o metastàtica i que, en conseqüència, presenten un pitjor pronòstic (Kirschner et al., 2016).

El càncer de tiroide d'origen epitelial, també conegut com càncer de tiroide no medul·lar (*non-medullary thyroid cancer*, NMTC), representa el 95-97% dels casos, i es pot classificar en tres subtipus

Introducció

histològics diferents: papil·lar, fol·licular i anaplàsic. El càncer de tiroide papil·lar és el més comú i representa el 80% de tots els casos, mentre que el fol·licular i l'anaplàsic comprenen el 10-15% i el 5% dels casos de càncer de tiroide, respectivament. La resta de casos, un percentatge molt petit, corresponen al càncer de tiroide medul·lar (*medullary thyroid cancer*, MTC), que prové de les cèl·lules parafol·liculars(Charles, 2015; Kirschner et al., 2016).

El tumors de tipus papil·lar són tumors ben diferenciats que presenten citoarquitectura papil·lar i alteracions nuclears. Són tumors no encapsulats i amb una gran heterogeneïtat, que metastatitzen als ganglis limfàtics en un 50% dels casos. No obstant, tenen un pronòstic molt favorable. Aquests tumors presenten freqüentment activació de la via ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). S'han descrit 4 alteracions moleculars diferents que donen lloc a aquesta activació. Així, en primer lloc, és habitual identificar reordenaments cromosòmics dels receptors tirosina quinasa *RET* i *NTRK1*. També poden tenir lloc mutacions activadores a *BRAF*, com *BRAF^{V600E}* que és la més comuna i ocorre en un 40-60% dels casos, i als membres de la família *RAS*.

Els tumors de tipus fol·licular són tumors ben diferenciats encapsulats que es caracteritzen pel manteniment de l'arquitectura fol·licular. Aquest tipus tumoral és més habitual en àrees amb deficiència en iode dietètic, i generalment, presenta pitjor pronòstic que els tumors papil·lars, degut a la reducció en l'efectivitat del tractament amb iode radioactiu. Segueix un patró de propagació hematògena i metastatitza a pulmó sense intervenció dels ganglis limfàtics. Donat que aquest tipus tumoral és menys freqüent, s'han realitzat un nombre més limitats d'estudis genètics. No obstant, se'n coneixen algunes de les alteracions més característiques. Per exemple, un 45% dels tumors presenten mutacions puntuals en els oncogens de la família *RAS*, i un 35%, fusió entre els gens *PAX8* i *PPARG*. També s'han observat amplifícacions o mutacions en *PI3KCA* i mutacions en *PTEN*.

Finalment, els tumors de tipus anaplàsic representen els tumors més indiferenciats i per sort, es corresponen a un percentatge molt petit del total dels casos, ja que desafortunadament, presenten un dels pitjors pronòstics de tots els tumors sòlids. Són tumors molts agressius que manifesten invasió local i disseminació metastàtica, i la seva supervivència mitjana és inferior als 6 mesos. Poden desenvolupar-se espontàniament o progressar a partir de tumors ben diferenciats (papil·lars o fol·liculars). Molecularment, en aquest tipus de tumors, s'hi troben implicades les vies de senyalització PI3K/AKT i RAS-MAPK, però a més, també presenten mutacions addicionals en *TP53*(Charles, 2015; Kirschner et al., 2016; Knostman et al., 2007).

Els tumors de tiroide van ser un dels primers tumors associats amb la síndrome de Cowden, i consegüentment, amb la inactivació de *PTEN*. Les mutacions en *PTEN* en aquest tipus tumoral són menys freqüents però se segueixen altres mecanismes per a la pèrdua de la seva funció. Així, per exemple, el 25% dels adenomes benignes i també, múltiples tumors malignes esporàdics de tiroide presenten LOH de *PTEN*. La pèrdua completa del gen supressor tumoral només té lloc en menys d'un 10% dels casos, però ocorre amb una freqüència molt més alta en el subtipus anaplàsic (Hollander et al., 2011). A més, la inactivació de *PTEN* per la metilació del seu promotor s'ha trobat en un 50% dels tumors, especialment, de tipus fol·licular (Alvarez-Nuñez et al., 2006). En tumors papil·lars s'han detectat també reorganitzacions cromosòmiques que afecten al gen supressor tumoral (Hollander et al., 2011; Puxeddu et al., 2005).

2.4 Intestí gros i còlon

2.4.1 L'intestí gros i còlon en condicions fisiològiques

En humans, l'intestí gros presenta una longitud d'1,5 m, un diàmetre d'entre 6 i 7 cm i estructuralment, es constitueix pel cec, còlon, recte i canal anal. El cec, que conté l'apèndix, presenta una histologia molt similar a la del còlon. El còlon es divideix, segons la seva localització anatòmica, en 4 porcions diferents. En primer lloc, el còlon ascendent s'estén des del cec fins a la cara inferior del fetge. A partir d'aquest punt, gira de forma abrupta per constituir l'angle colònic dret. A continuació, el còlon transvers travessa la meitat superior de la cavitat abdominal de dreta a esquerra, i després es corba en forma aguda en direcció inferior, per formar l'angle colònic esquerre. Tot seguit, el còlon descendent s'estén fins arribar a una zona denominada sigma, que desemboca en el recte, i finalment, en l'anus. La part superior del recte es distingeix de la resta de l'intestí gros per la presència d'uns plects anomenats plects rectals transversos i la seva mucosa és molt similar a la del còlon distal. Funcionalment, en el còlon ascendent i transvers s'absorbeixen l'aigua i els electròlits mentre que al còlon descendent i al recte s'emmagatzemen les matèries fecals fins la seva expulsió via anus (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

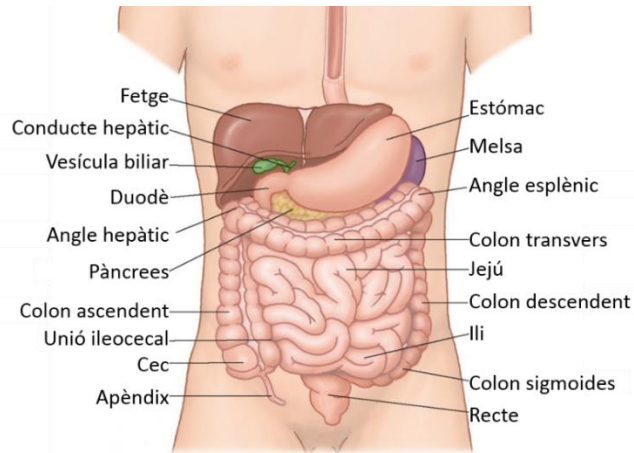


Figura 20: Representació esquemàtica del còlon humà i la seva localització. S'hi remarquen les 4 porcions: ascendent, transversa, descendent i sigmoides (modificat de (Porth and Grossman, 2014)).

Histològicament, el còlon es compon de 4 capes ben diferenciades, que són la mucosa interna, la submucosa, la muscular externa i la capa serosa externa.

La primera capa, la capa mucosa interna de l'intestí gros, està constituïda per un epitel·li de recobriment, un teixit connectiu subjacent denominat làmina pròpia, i la muscular de la mucosa, que està composta per cèl·lules musculars llises. La capa mucosa de l'intestí gros presenta una superfície llisa, sense plegaments circulars ni vellositats, i conté abundants glàndules intestinals (criptes de Lieberkühn). Aquestes glàndules són estructures simples tubulars, rectes i no ramificades d'epitel·li cilíndric simple, que s'estenen des de la muscular de la mucosa, a través de la làmina pròpia i desemboquen a la superfície luminal de l'intestí. L'epitel·li mucós conté almenys 4 tipus cel·lulars diferents. Per una banda, destaquen els enteròcits, que són les cèl·lules absortives especialitzades en el transport de substàncies des de la llum de l'intestí cap al sistema circulatori. Són cèl·lules cilíndriques altes amb el nucli posicionat en forma basal. També s'hi troben cèl·lules caliciformes, que són glàndules unicel·lulars secretores de mucina, cèl·lules enteroendocrines, que produeixen diversos tipus d'hormones, i finalment, les cèl·lules M, que són cèl·lules epitel·lials que cobreixen les plaques de Peyer i altres nòduls limfàtics de la làmina pròpia. No obstant, les cèl·lules epitel·lials principals de la mucosa són les absortives i les caliciformes. Les primeres predominen sobre les segones a gairebé tot el còlon, excepte a la zona propera al recte, on les proporcions s'equilibren.

Les cèl·lules epitel·lials de la mucosa experimenten un recanvi constant. El temps de recanvi varia en funció del tipus cel·lular. Així, per a les cèl·lules absortives i caliciformes és d'uns 6 dies, mentre que per a les enteroendocrines, d'unes 4 setmanes. Totes les cèl·lules epitel·lials de l'intestí gros deriven

d'una única població de cèl·lules mare intestinals, localitzada a la base de la glàndula intestinal. Les cèl·lules generades sofreixen dues o tres divisions addicionals a mesura que comencen a migrar cap a la superfície luminal. Quan arriben a la superfície de la mucosa experimenten apoptosi i s'exfolien cap a la llum en el punt mitjà entre dues glàndules intestinals contigües.

La segona capa o submucosa es troba constituïda per teixit connectiu dens, irregular i conglomerat de teixit adipós. Aquesta capa allotja vasos sanguinis, limfàtics i nervis.

La tercera capa, la muscular externa, consisteix en una capa interna de cèl·lules de múscul llis disposades en sentit circular, i una capa externa de fibres de múscul llis que es troben disposades en sentit longitudinal. Part de la capa muscular llisa longitudinal està engrossida per formar tres bandes longitudinals ben definides i equidistants denominades tènies del còlon. Els feixos musculars de les tènies del còlon penetren a la capa muscular interna circular en intervals irregulars en tota la longitud i circumferència del còlon. Aquestes discontinuïtats visibles a la muscular externa permeten que diferents segments del còlon es contreguin de forma independent, fenomen que condueix a la formació de les haustres del còlon, que són saculacions a la paret colònica.

Finalment, la quarta capa o serosa és la més externa i és una membrana formada per una capa d'epiteli pla i simple denominada mesoteli i una petita quantitat de teixit connectiu subjacent. La serosa no és present a tot l'intestí gros. De fet, les zones que es troben en contacte directe amb altres estructures, com el còlon ascendent i descendent, el recte i el conducte anal, es fixen a la paret de l'abdomen i de la pelvis per un teixit connectiu, l'adventícia, que fa de capa externa i que es barreja amb el teixit connectiu propi de la cavitat. En la resta de l'òrgan, però, la capa externa és una serosa típica (Porth and Grossman, 2014; Ross and Pawlina, 2015).

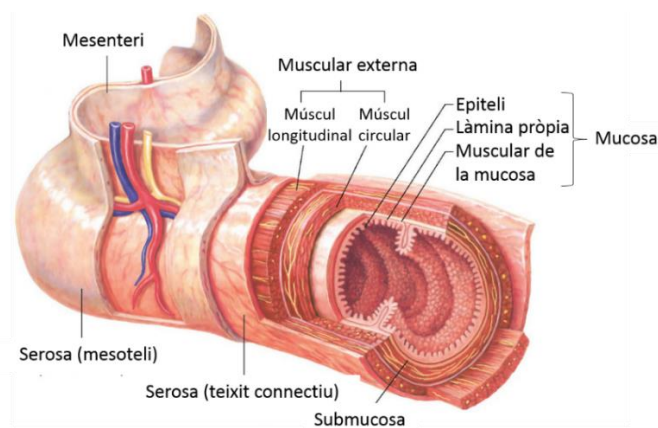


Figura 21: Representació esquemàtica d'un tall transversal d'intestí gros. Es representen les 4 capes ben diferenciades que componen l'intestí gros (modificat de (Porth and Grossman, 2014)).

Introducció

L'intestí gros dels ratolins és estructural i histològicament molt similar a l'humà, excepte petites diferències que es descriuen a continuació. En primer lloc, el còlon dels rosegadors es divideix en tres regions: proximal, mitjana i distal, que es caracteritzen per la presència o absència de plects mucosals que permeten diferenciar els segments histològicament, a diferència del còlon humà, en què les regions colòniques són pràcticament indistingibles. El còlon proximal presenta plects transversals de la mucosa (generalment en forma de V), mentre que la mucosa mitjana del còlon és plana i la distal conté plects longitudinals. A més, el cec dels ratolins, que no presenta apèndix, és comparativament molt més gran i prominent que l'humà, a diferència del recte, que és més petit i indistingible histològicament de la part distal del còlon.

Tot i aquestes petites variacions, tal com succeeix en els humans, la mucosa murina no presenta vellositats, i el còlon es compon també de les 4 capes descrites anteriorment. No obstant això, els rosegadors disposen d'unes capes mucosa i submucosa molt més primes que les humanes, i no presenten ni tènies ni haustres del còlon a la muscular externa, fet que permet que la serosa sigui molt més llisa (Treuting et al., 2017).

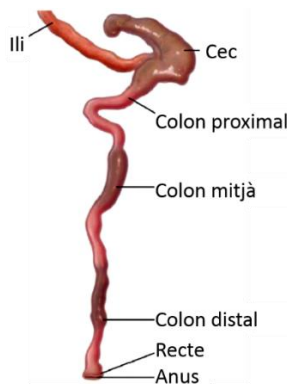


Figura 22: Representació esquemàtica de l'intestí gros murí. L'intestí gros dels ratolins està format pel cec sense apèndix, el còlon (proximal, mitjà i distal), el recte i l'anús. L'intestí prim connecta amb el cec a través de l'ili (modificat de (Treuting et al., 2017)).

2.4.2 El càncer colorectal

El càncer colorectal (CRC) és el tercer més comú en tot el món i representa la quarta causa de mort per càncer (Mármol et al., 2017; Zhang et al., 2017a). Cada any es diagnostiquen entre 1 i 2 milions de nous casos. La probabilitat de ser diagnosticada de CRC oscil·la entre el 4-5%, i la majoria dels casos, el 55%, es diagnostiquen en països occidentals (Das et al., 2017; Mármol et al., 2017). La majoria dels

CRCs són esporàdics (70%), de manera que els pacients no presenten predisposició genètica ni història familiar.

El CRC és generalment asimptomàtic en estadis inicials. No obstant, quan evoluciona a un estadi més avançat és freqüent l'aparició de sang a les femtes, canvi en el ritme de les deposicions, dolor abdominal, fatiga extrema i pèrdua de pes (Das et al., 2017; Simon, 2016). En conseqüència, la implementació de tècniques de cribratge que permetin un diagnòstic precoç del CRC és crítica per al control i la supervivència global d'aquesta patologia. Si els pacients amb CRC es diagnostiquen en estadis primerencs (estadi I i II), el pronòstic acostuma a ser bo i la supervivència a 5 anys pot arribar fins al 90%. Desafortunadament, més d'un 60% dels casos de CRC han evolucionat fins a estadis més avançats (estadis III i IV) en el moment de la detecció, disminuint així dràsticament la supervivència a un 9-13%. A més, el 50% dels pacients diagnosticats de CRC poden desenvolupar metàstasi en qualsevol moment de la seva vida (Majithia and Grothey, 2016; Zhang et al., 2017a).

Durant els darrers 20 anys, la recerca genètica i molecular ha permès concloure que l'inici i la progressió del CRC es deuen a l'acumulació progressiva d'alteracions genètiques i epigenètiques que transformen l'epiteli normal en adenocarcinomes (Das et al., 2017). La varietat en totes aquestes alteracions donen lloc a una malaltia molt heterogènia (Bettington et al., 2013; Simon, 2016).

En primer moment, tenen lloc una sèrie de canvis focals que condueixen al desenvolupament d'unes lesions precanceroses benignes conegudes com pòlips. Els pòlips són agrupacions cel·lulars localitzades que presenten un creixement anormal, i que es troben a la mucosa intestinal sobresortint cap a la llum de l'intestí. Els pòlips amb potencial maligne poden classificar-se en adenomes tradicionals o pòlips que deriven de la via serrada, en funció de la histologia i de les alteracions moleculars que han donat lloc al seu origen. Els pòlips serrats acostumen a localitzar-se a la regió proximal del còlon.

La progressió de pòlip a càncer comporta l'acumulació d'una sèrie de canvis genètics o epigenètics. Existeixen dos vies genètiques principals, la inestabilitat cromosòmica (*chromosomal instability*, CIN) i el fenotip de metilació a les illes CpG (*CpG island methylation pathway*, CIMP), que donen lloc al desenvolupament del CRC i que corresponen generalment, amb els dos tipus de pòlips descrits anteriorment. Així, la via de CIN s'associa generalment amb els adenomes tradicionals i s'observa en el 65-70% dels casos de CRC esporàdics. Es caracteritza per la presència d'alteracions cromosòmiques, numèriques i estructurals. Els tumors que es generen per aquesta via poden distingir-se per l'acumulació de mutacions en oncògens i gens supressors de tumors específics, com *APC*, *KRAS*,

Introducció

PI3KCA, *SMAD4* i *TP53*. Normalment, les primeres mutacions que desenvolupen aquests tipus de tumors tenen lloc en el gen *APC*, que regula la segregació cromosòmica durant la divisió cel·lular, i a continuació, poden ocórrer en *KRAS*, i més endavant, en *TP53*, entre altres.

En canvi, durant el desenvolupament dels CRCs per la via serrada, una de les alteracions més comunes és la hipermetilació de promotors (CIMP), com per exemple dels gens *MLH1*, *BMP3* (*bone morphogenic protein 3*) i *NDRG4* (*N-Myc downstream-regulated gene 4*), entre altres. Poden distingir-se dos subgrups de tumors que són positius per CIMP: els tumors CIMP-H (CIMP-*high*) que es relacionen amb mutacions en *BRAF* i la metilació de *MLH1*, i els tumors CIMP-L (CIMP-*low*), relacionats amb mutacions en *KRAS*. No obstant, les primeres mutacions acostumen a afectar el gen *BRAF*, mentre que les mutacions en *KRAS* són més infreqüents en aquesta via.

Finalment, la metilació del promotor de *MLH1* està relacionada amb un tercer mecanisme, la MSI, que té el seu origen en alteracions en els gens reparadors del DNA, donant lloc a un fenotip hipermutador. La MSI pot ocórrer tant en els tumors que s'originen a partir de la via clàssica com els de la via serrada, i s'associa en molts casos amb mutacions germinals, com a la síndrome de Lynch, encara que també es troba en un 15% dels tumors esporàdics. De manera anàloga al CIMP, també existeixen tumors MSI-H (MSI *high*) i MSI-L (MSI-*low*). Els tumors esporàdics que presenten MSI són CIMP positius i normalment es localitzen en la regió proximal del còlon. Així doncs, les mutacions activadores de *BRAF* ocorren de manera pràcticament exclusiva en els tumors MSI i CIMP positius (Bogaert and Preneen, 2014; Das et al., 2017; Simon, 2016; Wiland et al., 2014).

És important remarcar que aquestes tres vies que confereixen inestabilitat genòmica no són mutualment excloents. Per tant, és possible que els tumors presentin característiques de més d'una. No obstant, i en conclusió, encara que aproximadament el 60-70% dels CRCs deriven de la via tradicional amb CIN, existeixen un 25-35% dels càncer colorectals que presenten patró de serració, i que es caracteritza per l'activació de la via MAPK (mutacions en *BRAF* o *KRAS* mutualment excloents) i la presència de CIMP. Per altra banda, encara que la MSI és habitual, no es requereix obligatòriament per a la via serrada (Bogaert and Preneen, 2014).

Seguint totes aquestes característiques, l'any 2007 es va establir una classificació dels CRCs en 5 subtipus diferents que es presenten a la taula 3 (Jass, 2007):

Subtipus de càncer colorectal

Tipus 1	CIMP-H, MSI-H, mutacions en <i>BRAF</i>
Tipus 2	CIMP-H, MSI-L o MSS, mutacions en <i>BRAF</i>
Tipus 3	CIMP-L, MSI-L o MSS, mutacions en <i>KRAS</i>
Tipus 4	CIMP negatiu, MSS
Tipus 5 o Síndrome de Lynch	CIMP negatiu, MSI-H

Taula 3: Subtipus de càncer colorectal segons les vies d'alteracions genètiques i epigenètiques que presenten. MSS: estabilitat de microsatèl·lits (modificat de (Jass, 2007)).

Finalment, l'any 2012, el projecte TCGA va publicar els resultats d'un estudi basat en la identificació del perfil genòmic de múltiples casos de CRC. A més de totes les alteracions anteriorment descrites, van poder identificar mutacions en altres gens, com *ARID1A* i *ATM* en tumors no hipermutats, i *POLE*, en tumors hipermutats, entre altres (Network, 2012).

La inactivació de *PTEN* és relativament prevalent en el CRC i és particularment freqüent en els tumors que presenten MSI. L'activitat de PTEN es perd en una proporció variable de CRCs esporàdics (5-30%) a través de diversos mecanismes que inclouen mutacions, pèrdues al·lèliques i la metilació del seu promotor. Tant les mutacions com la hipermetilació del promotor són més habituals en els tumors que presenten MSI (De Roock et al., 2011; Hühns et al., 2014; Milella et al., 2015).

No obstant, el paper de *PTEN* en el càncer colorectal encara genera discrepàncies (De Roock et al., 2011). S'ha suggerit que l'estat d'activació de PTEN pot constituir un marcador potencial de la resposta a les teràpies basades en l'ús d'inhibidors d'EGFR i MAPK. A més, alguns treballs evidencien que la pèrdua de PTEN en els tumors primaris està significativament relacionada amb un risc de mort incrementat i una baixa supervivència en cas de metastasi. Per contra, altres treballs han reportat correlacions negatives entre la pèrdua de PTEN en el CRC metastàtic i la supervivència dels pacients i la resposta al tractament (Atreya et al., 2013; Loupakis et al., 2009). Finalment, també s'ha associat l'absència de la proteïna PTEN nuclear a tumors més agressius (Zhou et al., 2002).

3. El cicle cel·lular

Tradicionalment, el cicle cel·lular s'ha dividit en 4 fases diferents: G1 (*gap-phase 1*), S, G2 (*gap-phase 2*) i M, que ocorren de manera successiva per tal de transmetre la informació genètica a dues noves cèl·lules filles. Durant la fase G1, la cèl·lula acumula la massa i els metabòlits necessaris per a la replicació del DNA, que té lloc durant la fase S. A continuació, la fase G2 prepara la cèl·lula per a la divisió cel·lular i és necessària per assegurar que la replicació del DNA s'ha produït correctament. Finalment, la mitosi ocorre a la fase M (Darling et al., 2017). Quan la citocinesi es completa, les noves cèl·lules generades poden continuar dividint-se o entrar en una fase de quiescència coneguda com G0 (Malumbres and Barbacid, 2005).

El cicle cel·lular està governat per unes serina/treonina quinases dependents de ciclina (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) que presenten una activitat oscil·lant durant les diferents fases del cicle cel·lular. L'activitat de les CDKs depèn majoritàriament de processos de fosforilació i defosforilació reversibles, de la síntesi i de la degradació dels seus cofactors activadors, les ciclins (Bendris et al., 2015), i de l'expressió, disponibilitat i degradació de diversos inhibidors (*CDK inhibitors*, CKIs). Les quinases Wee1 i Myt1 inhibeixen l'activitat quinasa dels complexos Ciclina-CDK per la fosforilació d'uns residus específics. Per contra, les fosfatases cdc25 activen l'activitat quinasa ja que en desfosforilen aquests mateixos residus. A més, els complexos Ciclina-CDK actius requereixen d'una fosforilació addicional mitjançada per la quinasa activadora de CDK (*CDK-activating kinase*, CAK). A més, existeixen dues famílies de CKIs, la família INK4, formada per p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}, i la família CIP/KIP, constituïda per p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}. Els membres de la família INK4 s'uneixen específicament a monòmers de CDK4 i CDK6, i impedeixen la formació dels complexos amb les Ciclins D, mentre que les proteïnes CIP/KIP s'uneixen als complexos Ciclina-CDK, encara que el seu efecte inhibitori més potent és sobre els complexos Ciclina E/A-CDK2 (Malumbres and Barbacid, 2005). Fins a l'actualitat, s'han identificat 29 ciclins i 20 CDKs en les cèl·lules humanes, encara que no totes estan implicades en el cicle cel·lular (Malumbres, 2014).

La progressió al llarg del cicle té lloc per mitjà de la fosforilació d'infinat de proteïnes per part dels complexos heterodimèrics Ciclina-CDK (Sherr and Roberts, 2004). En primer lloc, la progressió a través de la fase G1 es regula per un mecanisme complex que implica a tres CDKs diferents i a les seves corresponents ciclins i proteïnes reguladores (Brandmaier et al., 2017; Malumbres and Barbacid, 2005). Inicialment, l'estimulació mitogènica indueix la síntesi de les Ciclins D, de manera que la seva expressió es regula per mitjà de les condicions ambientals extracel·lulars (Sicinski et al., 1995). Els

Introducció

complexos actius Ciclina D-CDK4/CDK6 fosforilen a RB, i altres proteïnes relacionades, com p107 i p130(Vélez-Cruz and Johnson, 2017). Aquestes proteïnes contenen múltiples llocs de fosforilació per CDK, però les CDK4/6 només en reconeixen alguns(Dick and Rubin, 2013).

Les proteïnes RB reprimeixen la transcripció per mitjà de la unió i la modulació de l'activitat de factors de transcripció, com els membres de la família E2F, histones deacetilases i complexos remodeladors de la cromatina. La fosforilació de RB per les CDK4/6 permet als factors E2F dur a terme el seu programa transcripcional de manera que indueixen l'expressió de diversos gens necessaris per a l'entrada de la cèl·lula a la fase S. Una de les dianes transcripcionals més importants dels complexos RB-E2F són les ciclines E, necessàries per activar la CDK2 i permetre la finalització i el progrés de la fase G1 i S, respectivament(Vélez-Cruz and Johnson, 2017). Així doncs, a l'inici de la fase G1, RB es troba hipofosforilat, i s'hiperfosforila a mesura que aquesta fase va avançant(Sherr et al., 2016). Encara que els complexos Ciclina D-CDK4/6 s'encarreguen de la fosforilació inicial de RB, és el complex Ciclina E-CDK2 qui l'acaba inactivant i dirigint la cèl·lula de manera irreversible a la fase S(Malumbres, 2014). A més, els complexos Ciclina D-CDK4/6 també juguen un segon paper important en la progressió de la fase G1 ja que permeten el segrest dels CKIs p21^{Cip1} i p27^{Kip1}, donant lloc a l'activació dels complexos constituïts amb CDK2(Sherr and Roberts, 2004).

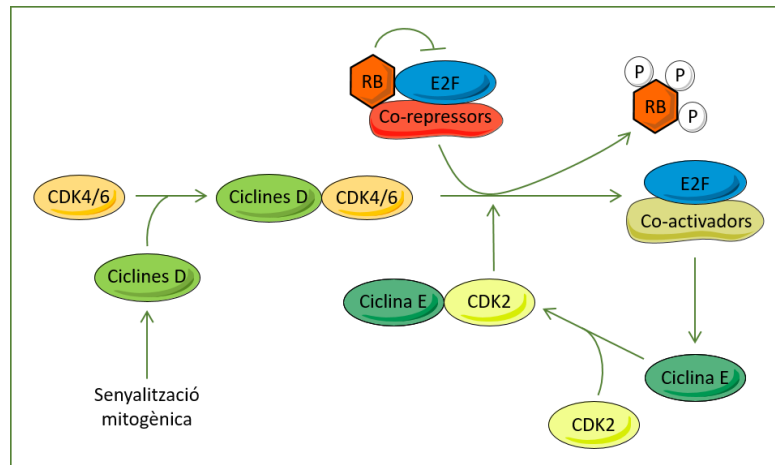


Figura 23: Breu visió general de la transició de la fase G1 a la S del cicle cel·lular. Els factors de creixement extracel·lulars activen l'expressió de les Ciclines D, que formen complex amb la CDK4/6. El complex Ciclina D-CDK4/6 inicia la fosforilació de RB, donant lloc a l'alliberament dels factors de transcripció E2F, que indueixen l'expressió de la Ciclina E i d'altres gens necessaris per a la síntesi del DNA. Els complexos Ciclina E-CDK2 fosforilen també a RB, inactivant-lo completament (modificat de (Law et al., 2015)).

Més tard, durant les fases S, G2 i M, la CDK2 i la CDK1 juguen papers importants per al cicle cel·lular amb les seves companyes Ciclina A i Ciclina B(Dickson, 2014).

3.1 Ciclina D1

En les cèl·lules de mamífer, s'ha descrit l'existència de tres ciclines diferents de tipus D, la Ciclina D1, la D2 i la D3, que tot i ser codificades en gens diferents, presenten una gran similitud pel que fa a la seva seqüència aminoacídica (Sherr and Roberts, 1999). No obstant, s'expressen de manera diferencial en funció del tipus de teixit (Matsushime et al., 1991). D'entre totes tres Ciclines D, la Ciclina D1 s'ha convertit en la més ben estudiada i caracteritzada.

3.1.1 Estructura de la Ciclina D1

La Ciclina D1 està codificada pel gen *CCND1*, que conté 5 exons i es localitza al cromosoma 11q13 en humans, i al cromosoma 7 en ratolí (Ramos-García et al., 2017). El gen *CCND1* codifica per una proteïna d'aproximadament 34 kDa i 295 aminoàcids.

A nivell proteic, poden distingir-se alguns dominis principals. Per una banda, l'extrem N-terminal conté el lloc d'unió a RB amb el motiu conservat LXCXE i s'estén de l'aminoàcid 5 al 9. El següent domini és la *cyclin box*, que s'encarrega d'interactuar amb les CDK4/6 i amb els CKI, i compren els aminoàcids del 56 al 145. Finalment, l'extrem C-terminal regula l'estabilitat proteica. En concret, aquest domini conté una seqüència PEST (241-290) i el residu Thr286, que és necessari i suficient per a la degradació proteica de la Ciclina D1 dependent d'ubiquitinització. A més, la Ciclina D1 també presenta dos dominis necessaris per a la seva funció en la regulació transcripcional. La regió compresa entre la *cyclin box* i el domini C-terminal conté regions responsables de la interacció de la Ciclina D1 amb factors de transcripció. L'activació transcripcional per Ciclina D1 s'associa amb el motiu LXXLL (aminoàcids 251-255), que és un lloc important de reclutament de co-activadors, mentre que la repressió transcripcional s'associa a la presència d'un domini repressor (142-253) de factors transcripcionals (Knudsen et al., 2006; Qie and Diehl, 2016).

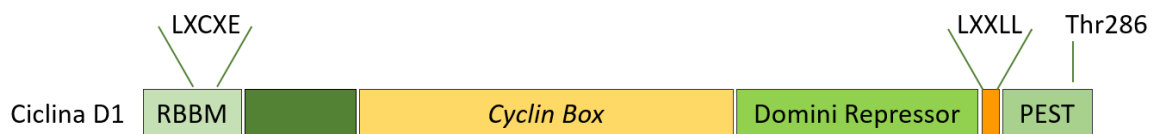


Figura 24: Estructura esquemàtica de la proteïna Ciclina D1. A l'extrem N-terminal, s'hi localitza el motiu d'unió a RB (RBBM), seguit de la *cyclin box*. A continuació, es destaca el domini repressor i el motiu activador LXXLL. Finalment, a l'extrem C-terminal, s'hi troba la seqüència PEST i la Thr286 (modificat de (Qie and Diehl, 2016)).

Introducció

3.1.2 Funció de la Ciclina D1

Tal com s'ha descrit anteriorment, la Ciclina D1, així com les altres Ciclines D, actua com a lligam essencial entre l'entorn cel·lular i la maquinària que governa el cicle cel·lular (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). A diferència de l'expressió de la resta de ciclines, que fluctua periòdicament durant la progressió del cicle, l'expressió de la Ciclina D1 s'indueix ràpidament després de la exposició de les cèl·lules a mitògens extracel·lulars, i torna a disminuir un cop aquests agents mitogènics es redueixen (Diehl et al., 1997). És la responsable, juntament amb la resta de Ciclines D, de promoure la progressió del cicle cel·lular durant la fase G1 en complex amb la CDK4 i la CDK6, a través de dues funcions principals. En primer lloc, el complex Ciclina D1-CDK4/6 fosforila RB, i permet així, l'alliberament dels factors de transcripció E2F (Kato et al., 1993). En segon lloc, el complex segresta els membres de la família d'inhibidors CIP/KIP com p21^{Cip1} i p27^{Kip1}. En resposta a una estimulació mitogènica continua, el complex Ciclina D1-CDK4/6 actua estequiomètricament per unir-se i segrestar aquests inhibidors. D'aquesta manera, disminueix el seu potencial inhibitori i facilita l'activació del complex Ciclina E-CDK2 (Sherr and Roberts, 1999).

Recentment, s'han evidenciat noves funcions de la Ciclina D1 que van més enllà de la seva implicació tradicional en la transició G1/S, i algunes d'elles són independents de CDK i poden tenir lloc en el citoplasma. Així, per exemple, s'ha descrit la seva implicació en transcripció gènica, mitjançant la regulació de factors de transcripció, en reparació de dany al DNA, en la mort cel·lular, en la diferenciació cel·lular, en la migració i invasió, i en el metabolisme (Hydbring et al., 2016; Pestell, 2013; Ramos-García et al., 2017).

3.1.3 Regulació de la Ciclina D1

La capacitat de la Ciclina D1 per actuar com a sensor de proliferació no només depèn de la seva ràpida inducció per mitògens sinó també de la seva inestabilitat inherent, fet que garanteix la seva degradació en aquelles cèl·lules deprivades de factors de creixement o que es troben sota estímuls antiproliferatius (Diehl et al., 1997).

Les vies de senyalització induïdes per mitògens regulen la Ciclina D1, a diferents nivells. Així, per exemple, en controlen la transcripció, la traducció, les modificacions post-traduccional, l'estabilitat i la formació dels complexos amb les CDK4/6. Aquesta regulació té lloc principalment a partir de les vies de senyalització RAS/MAPK i de vies dependents de RAS (Ramos-García et al., 2017). No obstant, existeixen altres vies de senyalització, com la via Wnt/ β -Catenina o NF- κ B, que poden regular també

l'expressió de la Ciclina D1 (Guttridge et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999). En concret, el complex nuclear format per β -Catenina i LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor/T cell factor*) pot unir-se al promotor de *CCND1* i activar-ne la transcripció, tal com també pot fer el factor de transcripció NF- κ B (Qie and Diehl, 2016). En primer lloc, la unió dels factors de creixement als RTKs de la membrana inicia la cascada de senyalització RAS-MAPK, que indueix l'expressió de la Ciclina D1 (Filmus et al., 1994; Lavoie et al., 1996; Liu et al., 1995; Weber et al., 1997). A més, la via de senyalització PI3K/AKT, que també pot activar-se per RAS, regula la traducció i l'estabilització de la Ciclina D1 (Vivanco and Sawyers, 2002). Així, la senyalització per PI3K/AKT/mTOR n'incrementa la traducció, mentre que la cascada PI3K/AKT/GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*) en limita la degradació. Durant la fase G1 del cicle cel·lular, la GSK-3 β és principalment citoplasmàtica però durant la transició G1/S, aquesta proteïna s'acumula a nucli on pot fosforilar la Ciclina D1 a la Thr286, potenciant així, la seva translocació a citoplasma i convertir-la en una diana per a la degradació pel proteosoma (Diehl et al., 1998). No obstant, l'AKT activa fosforila i, en conseqüència, bloqueja l'activitat quinasa de la GSK-3 β , de manera que permet l'estabilització i l'acumulació nuclear de Ciclina D1 (Vivanco and Sawyers, 2002). A més, l'AKT pot també inhibir els factors de transcripció FoxO, que poden suprimir l'expressió de la Ciclines D (Schmidt et al., 2002), i influenciar negativament l'expressió dels CKIs p21^{Cip1} i p27^{Kip1} (Liang et al., 2002; Zhou et al., 2001).

Per una altra banda, la Ciclina D1 també pot ser objecte d'una regulació a nivell post-transcripcional com a conseqüència d'un *splicing alternatiu*. Aquest fenomen té lloc principalment en un context tumoral i dona lloc a la formació de la proteïna Ciclina D1b, que no presenta el motiu regulador del domini C-terminal, que dirigeix la degradació de la Ciclina D1 per ubiquitinització. En conseqüència, la Ciclina D1b pot acumular-se a nucli, on intervé en la tumorigènesi (Knudsen et al., 2006).

Finalment, la Ciclina D1 és una proteïna molt làbil, que presenta una vida mitjana de 10-30 minuts, i la seva degradació depèn de les fases del cicle cel·lular. Tal com s'ha comentat anteriorment, la seva degradació proteica es dirigeix per poliubiquitinització i destrucció pel proteosoma, induïda per la fosforilació de la Thr286 per GSK-3 β .

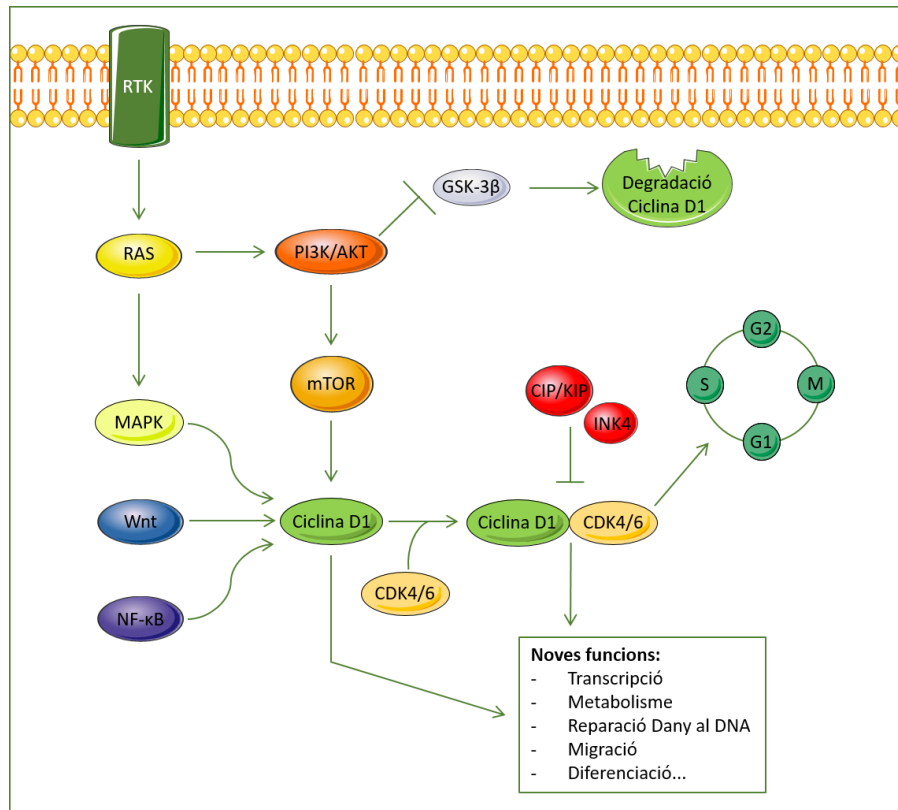


Figura 25: Regulació fisiològica i funcions simplificades de la Ciclina D1. Els mecanismes que donen lloc a un increment de l'activitat transcripcional del gen *CCND1* inclouen l'activació dels RTKs, que inicia la senyalització RAS-MAPK, i la senyalització per les vies Wnt i NF-κB. Els nivells de Ciclina D1 també poden incrementar per l'activitat de la via PI3K/AKT, que n'augmenta la transcripció via mTOR o en redueix la degradació per mitjà de la inhibició de GSK-3β. En el nucli, la Ciclina D forma complexos amb les CDK4/6 i promou la proliferació cel·lular a través de la via de RB, afavorint la transició G1/S. Finalment, més recentment, s'han descrit noves funcions de la Ciclina D1, que poden ser dependents o independents de CDK, entre les quals destaquen la regulació de la transcripció, la modulació del metabolisme, l'activitat en reparació de dany al DNA i la implicació en la migració i diferenciació cel·lular (modificat de (Ramos-García et al., 2017)).

3.1.4 Models animals de Ciclina D1

L'any 1995, dos treballs independents, però pràcticament simultanis en el temps, van descriure el fenotip de dos ratolins *knock-out* de *CCND1* (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). Els ratolins deficients per la Ciclina D1 són viables i fèrtils però presenten defectes a nivell del desenvolupament de la mama i la retina. A més, aquests ratolins presenten una mida i viabilitat reduïdes, en comparació amb els ratolins no mutants, i manifesten símptomes d'anormalitats neurològiques.

Anys més tard, es van publicar els resultats observats per als treballs respectius amb els *knock-out* de la *CCND2* i de la *CCND3*, i de manera anàloga al Ko de Ciclina D1, tots dos ratolins són viables però presenten defectes específics de teixit. Així, per exemple, la deficiència de Ciclina D2 provoca defectes

en la proliferació de les cèl·lules gonadals i esterilitat en les femelles(Sicinski et al., 1996), mentre que els ratolins deficients per Ciclina D3 mostren defectes en el desenvolupament dels limfòcits T, en la maduració dels limfòcits B i en la producció de neutròfils(Sicinska et al., 2003). Tots aquests treballs en global demostren que l'expressió de les tres Ciclines D és específica de teixit(Matsushime et al., 1991; Sun et al., 1996).

Finalment, en un altre treball, es va generar el ratolí deficient per a les tres Ciclines D(Kozar et al., 2004). Els embrions d'aquest model es desenvolupen de forma normal fins a la meitat de la gestació, que no pot completar-se degut a greus anèmies i defectes coronaris. En aquest moment, però, molts dels òrgans vitals ja es troben ben desenvolupats, de manera que se suggereix que la manca de les tres Ciclines D no afecta a la divisió cel·lular. No obstant, la deficiència de les tres Ciclines D causa errors de proliferació en la població hematopoiètica.

3.1.5 Ciclina D1 i càncer

Donada la rellevància dels complexos Ciclina-CDK a l'hora de promoure el cicle cel·lular és lògic que s'hagin documentat amplificacions, reordenaments gènics i/o increment en l'expressió de les ciclines i/o CDKs en tot tipus de tumors humans. En particular, l'amplificació del gen de la Ciclina D1, *CCND1*, és una de les alteracions de número de còpies més freqüents en càncers humans(Casimiro et al., 2014; Ramos-García et al., 2017).

La Ciclina D1 es troba sobreexpressada en múltiples tipus de càncers, com ara en les neoplàsies d'origen limfoide i de cap i coll, i en els càncers de pulmó, bufeta, glàndula pituïtària, pròstata, endometri, mama i còlon, entre altres(Bartkova et al., 1995; Casimiro et al., 2014; Cheung et al., 2001; Dickson et al., 1995; Ruhul Quddus et al., 2002). Diversos estudis clinicopatològics han mostrat que la sobreexpressió de la Ciclina D1 correlaciona amb la metastasi tumoral i amb un pitjor pronòstic(Musgrove et al., 2011).

Els mecanismes pels quals la Ciclina D1 pot sobreexpressar-se en un context tumoral són múltiples i variats. Així, és habitual detectar reordenacions genètiques en els adenomes de paratiroide i en les neoplàsies limfoides, com el mieloma múltiple i el limfoma de les cèl·lules del mantell(Casimiro et al., 2014; Motokura et al., 1991). Un dels altres mecanismes involucrats és l'amplificació del locus de *CCND1*, que en alguns casos, com en el càncer de mama, s'associa a un pitjor pronòstic(Bièche et al., 2002; Naidu et al., 2002). Per altra banda, també s'ha descrit l'existència de mutacions, com ara les que afecten al residu Thr286, per exemple en càncers d'endometri i esòfag(Benzeno et al., 2006) o les

Introducció

substitucions P287S i P287T en càncers d'endometri (Moreno-Bueno et al., 2003). A més, el polimorfisme G/A870 s'ha associat amb el fenomen del *splicing alternatiu* de la Ciclina D1. El al·lel A870 sembla que podria donar lloc preferentment a la isoforma Ciclina D1b, convertint-se així, en un factor de risc de càncer (Ashton et al., 2008; Knudsen et al., 2006).

Per acabar, en un 30-50% dels càncers, la sobreexpressió de la Ciclina D1 pot no ésser conseqüència directa d'alteracions en el seu gen o proteïna, sinó de la pròpia senyalització oncogènica. Així, les mutacions que afecten als RTKs, RAS, RAF, PI3K o PTEN, o a vies de senyalització com Wnt o NF-κB, entre altres, poden potenciar un increment de l'expressió d'aquesta ciclina i de l'activitat del complex Ciclina D1-CDK4/6 (Casimiro et al., 2014; Mirantes et al., 2013). També pot donar-se la pèrdua dels miRNAs que controlen l'estabilitat de la Ciclina D1, com miR-15a i el miR-16 en càncer de pulmó de cèl·lula no petita (Bandi et al., 2009).

Totes aquestes observacions correlacionen perfectament amb nombrosos estudis realitzats amb models animals que posen de manifest que l'increment de la Ciclina D1 pot promoure la formació de tumors col·laborant en la transformació cel·lular i/o antagonitzant l'acció de gens supressors tumorals. Tant les seves funcions dependents com les independents de CDK contribueixen al fenotip tumoral (Casimiro et al., 2014; Musgrove et al., 2011; Qie and Diehl, 2016).

3.2 E2F-1

Tradicionalment, la família de factors de transcripció E2F s'ha considerat la diana principal dels repressors transcripcionals de la família RB. Existeixen 8 gens *E2F* relacionats (*E2F-1-8*) que donen lloc a 9 proteïnes diferents. Els factors de transcripció E2F-3a i E2F-3b s'originen com a conseqüència de la presència de promotors alternatius en el locus *E2F-3*. A més, existeixen dues isoformes diferents per al factor E2F-7, E2F-7a i E2F-7b, que es generen a partir d'un únic producte de transcripció per *splicing* alternatiu. D'altra banda, existeixen 3 gens *DP* relacionats (*DP1*, *DP2/3* i *DP4*), que formen complex amb els factors E2F-1-6. Aquests factors requereixen una heterodimerització amb una proteïna DP per a crear un factor funcional d'unió a DNA, mentre que els factors E2F-7 i E2F-8 s'hi uneixen de manera independent a DP. Tradicionalment, els factors E2F-1, E2F-2 i E2F-3a s'han associat amb l'activació de la transcripció, mentre que els factors E2F-3b, E2F-4, E2F-5, E2F-6, E2F-7 i E2F-8, amb la seva repressió. No obstant, cada vegada més, s'està acceptant la idea que tots els factors poden actuar com a activadors o repressors en funció del context cel·lular i del gen diana. L'activitat dels factors E2F-1-5 es regula per mitjà de la unió a RB, p107 i p130, mentre que la dels E2F-6, E2F-7 i

E2F-8 és independent de la família RB (Biswas and Johnson, 2012; Castillo et al., 2015; Poppy Roworth et al., 2015). D'entre tots aquests factors, l'E2F-1 és el membre fundador de la família i un dels més ben caracteritzats.

3.2.1 Estructura d'E2F-1

El factor de transcripció E2F-1 es troba codificat pel gen que té el mateix nom, *E2F-1*, i que es localitza en el cromosoma 20q11.22 en humans, i en el cromosoma 2, en ratolins. El gen *E2F-1* codifica per una proteïna d'aproximadament 47 KDa i 437 aminoàcids.

Estructuralment, E2F-1 presenta un llarg extrem N-terminal, que conté la senyal de localització nuclear i el domini d'unió a Ciclina A. A continuació, presenta el domini d'unió a DNA i el domini de dimerització, que inclou dos motius conservats: una seqüència de repeticions de leucines i la *marked box*. Finalment, a l'extrem C-terminal, s'hi disposa el domini d'activació transcripcional, que conté el lloc d'unió a RB.

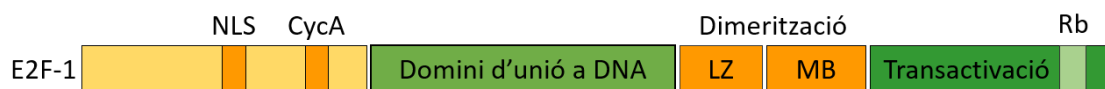


Figura 26: Estructura esquemàtica de la proteïna E2F-1. A l'extrem N-terminal, s'hi troba la seqüència de localització nuclear (NLS) i el domini d'unió a Ciclina A (CycA). Tot seguit, s'hi localitza el domini d'unió a DNA i el domini de dimerització, que conté la seqüència de repeticions de leucines (LZ) i la *marked box*. Finalment, a l'extrem C-terminal hi ha el domini de transactivació, amb el lloc d'unió a RB (modificat de (Chen et al., 2009)).

3.2.2 Funcions d'E2F-1

La família de factors de transcripció E2F participa en la regulació d'una gran varietat de processos biològics que controlen el destí cel·lular, com ara la síntesi del DNA, la progressió del cicle cel·lular, la reparació de dany al DNA, l'apoptosi, la diferenciació i també, el metabolisme. Per tant, són de gran importància per al manteniment de l'homeòstasi cel·lular (Dimova and Dyson, 2005). No obstant, i malgrat tots els esforços dedicats en aquest camp i la gran quantitat de treballs relacionats, la família E2F continua representant encara, en alguns casos, un gran enigma. Existeixen certs obstacles principals que han limitat l'estudi complet del paper dels E2Fs *in vivo*, com per exemple, l'alt grau de redundància entre activadors i repressors, l'antagonisme funcional aparent que presenten, i finalment, l'habilitat que tenen alguns membres per regular l'expressió d'altres components de la família (Chen et al., 2009).

Introducció

La funció canònica més coneguda d'E2F-1 és permetre l'entrada a la fase S, promovent la transcripció de diversos gens imprescindibles per a la duplicació del DNA i la progressió del cicle cel·lular, com la ciclina E i la ciclina A. De fet, hi ha una gran multitud de treballs que relacionen l'activitat d'E2F-1 amb el control de la proliferació cel·lular. La supressió de l'activitat d'E2F-1 durant el cicle cel·lular té lloc per mitjà de RB i a 2 nivells: passivament, en la qual RB s'uneix i obstaculitza el domini d'activació transcripcional d'E2F-1, i activament, quan RB recluta histones deacetilases (HDACs) per alterar l'estructura local de la cromatina dels gens diana d'E2F-1 (Biswas and Johnson, 2012; Poppy Roworth et al., 2015).

No obstant, però, gràcies a l'extensa recerca focalitzada en l'enteniment de les molt diverses, i aparentment, dicotòmiques funcions de l'activitat d'E2F-1, avui se sap que aquest factor de transcripció participa també en la resposta al dany al DNA, promovent l'apoptosi o bé la reparació, en la resposta a estrès i en la diferenciació i metabolisme cel·lular. Per tant, pot ser més precís considerar E2F-1 com un controlador clau del destí cel·lular, implicat en l'equilibri de diversos processos cel·lulars (Castillo et al., 2015; Chen et al., 2011; Liu et al., 2006).

La participació d'E2F-1 en la resposta al dany al DNA es pot descriure des de tres angles diferents (Poppy Roworth et al., 2015). En primer lloc, alguns estudis han evidenciat que després de l'exposició a agents genotòxics, i en resposta al dany al DNA, els nivells proteics d'E2F-1 incrementen (Blattner et al., 1999), i a més, pot ser objecte de modificacions post-traduccional. Així, les quinases ATM (*ataxia-telangiectasa mutated*) i ATR (*ataxia-telangiectasa and Rad3-related*) fosforilen E2F-1 a la serina 31, i la quinasa CHK2 (*checkpoint kinase 2*), a la serina 364. A més, E2F-1 també pot ésser acetilat en els residus de lisina 117, 120 i 125, per diverses acetiltransferases, com p300/CBP (*p300/CREB-binding protein*), PCAF (*p300-CREB-binding protein-associated factor*), entre altres. Totes aquestes modificacions contribueixen a l'estabilització de la proteïna i expliquen els nivells elevats d'E2F-1 després d'un insult genotòxic (Galbiati et al., 2005; Ianari et al., 2004; Lin et al., 2001; Stevens et al., 2003). A més, s'ha demostrat també que el dany al DNA *per se*, causat per agents com la radiació UV o la doxorubicina, indueix la transcripció *de novo* d'E2F-1, incrementant així també, els seus nivells proteics (Carcagno et al., 2009). En segon lloc, l'activitat transcripcional d'E2F-1 després del dany al DNA pot regular-se a través de la interacció amb proteïnes específiques. D'aquesta manera, els complexos E2F-1-pRB inhibeixen la transcripció quan es troben associats a proteïnes remodeladores del nucleosoma, com metiltransferases o HDACs, però l'activen després de la interacció amb histones acetiltransferases. Finalment, en darrer lloc, E2F-1 és reclutat al llocs de dany

al DNA on promou el reclutament de factors reparadors, la formació dels foci Rad51 i s'associa amb el factor reparador del DNA, γ H2AX(Castillo et al., 2015; Chen et al., 2011; Guo et al., 2010). Aquests tres mecanismes i les xarxes que desencadenen determinen el futur cel·lular, ja que promouen l'apoptosi o la reparació del dany al DNA(Biswas and Johnson, 2012; Castillo et al., 2015).

Pel que fa a l'apoptosi, E2F-1 actua a través de múltiples vies i mecanismes per induir aquest tipus de mort cel·lular després de dany al DNA, incloent la via dels receptors de mort, p53, la inducció de p73, i també a través de la via intrínseca de l'apoptosi(Phillips et al., 1999; Poppy Roworth et al., 2015). En aquest sentit, E2F-1 desencadena la transcripció de diversos gens pro-apoptòtics, que acaben conduint a la mort cel·lular, sol o formant complex amb pRB. Tal com s'ha comentat anteriorment, es poden formar dos complexos E2F-1-pRB en resposta al dany al DNA, un complex repressor que conté l'HDAC1, i un complex activador que conté P/CAF(Biswas and Johnson, 2012; Nagy and Tora, 2007; Poppy Roworth et al., 2015; Taubert et al., 2004). Així, es pot reprimir l'expressió de gens que promouen el cicle cel·lular, com Ciclina A, i es pot activar la de gens pro-apoptòtics. En concret, s'ha descrit que la fosforilació mitjançada per CHK2 incrementa l'afinitat d'E2F-1 a pRB, potenciant la transcripció de gens apoptòtics(Stevens et al., 2003). En qualsevol cas, E2F-1 pot promoure l'expressió d'ARF, que s'uneix a MDM2, dificultant la inactivació de p53 i incrementant, en conseqüència, l'apoptosi dependent de p53(Bates et al., 1998). També s'ha descrit que pRB pot ser escindit per caspases, i que el seu producte p68 pot unir-se amb E2F-1 als promotors de NOXA i p73 per augmentar-ne la seva expressió. A més, l'acetilació que sofreix E2F-1 no només incrementa la seva estabilitat sinó que també potencia la unió al promotor de p73(Bertin-Ciftci et al., 2013; Carnevale et al., 2012). Finalment, E2F-1 també incrementa la transcripció d'APAF1, de BIM, de les caspases 3 i 7, i de SMAC/DIABLO(Müller et al., 2001; Stanelle et al., 2002; Xie et al., 2006).

Recentment, s'ha descrit que davant la pèrdua d'activitat de RB, E2F-1 pot desencadenar una resposta apoptòtica amb la finalitat d'eliminar les cèl·lules hiperproliferatives a través de PTEN. E2F-1 pot unir-se al promotor del gen supressor tumoral de manera específica per tal d'induir la seva transcripció. Se suggereix que PTEN podria promoure l'activació de les caspases per mitjà de la inactivació de FAK (*focal adhesion kinase*)(Morales et al., 2014).

Finalment, i malgrat el paper d'E2F-1 com a mediador de l'apoptosi després del dany al DNA, cada vegada existeixen més evidències que suggereixen que també pot bloquejar aquesta mort cel·lular a favor de la reparació. Concretament, el dany al DNA i la fosforilació per ATM indueixen la interacció entre TopBP1 (*topoisomerase II β -binding protein*) i E2F-1(Liu et al., 2003). És important remarcar que

Introducció

AKT s'encarrega de fosforilar TopBP1 perquè pugui oligomeritzar-se, i conseqüentment, interactuar amb E2F-1 (Liu et al., 2006). A partir d'aquesta interacció, TopBP1 reprimeix múltiples activitats d'E2F-1 durant la reparació, com l'activitat transcripcional a l'hora d'induir l'entrada en fase S i l'apoptosi. Tot i les evidències que suggereixen que l'acetilació d'E2F-1 desencadena l'apoptosi, altres estudis plantegen també que participa en la reparació del dany al DNA, ja que en redueix l'afinitat per pRB i la incrementa a favor de TopBP1. A més, TopBP1 també pot reclutar E2F-1 als llocs de reparació, amb BRCA1 (Liu et al., 2003). Per acabar, E2F-1 també promou el reclutament o la retenció de factors reparadors als llocs de dany. Totes aquestes premisses posen de manifest la importància d'E2F-1 en el manteniment de la estabilitat genòmica en un context de dany al DNA, tant a través de funcions transcripcionals com no-transcripcionals (Biswas and Johnson, 2012; Castillo et al., 2015; Chen et al., 2011; Poppy Roworth et al., 2015).

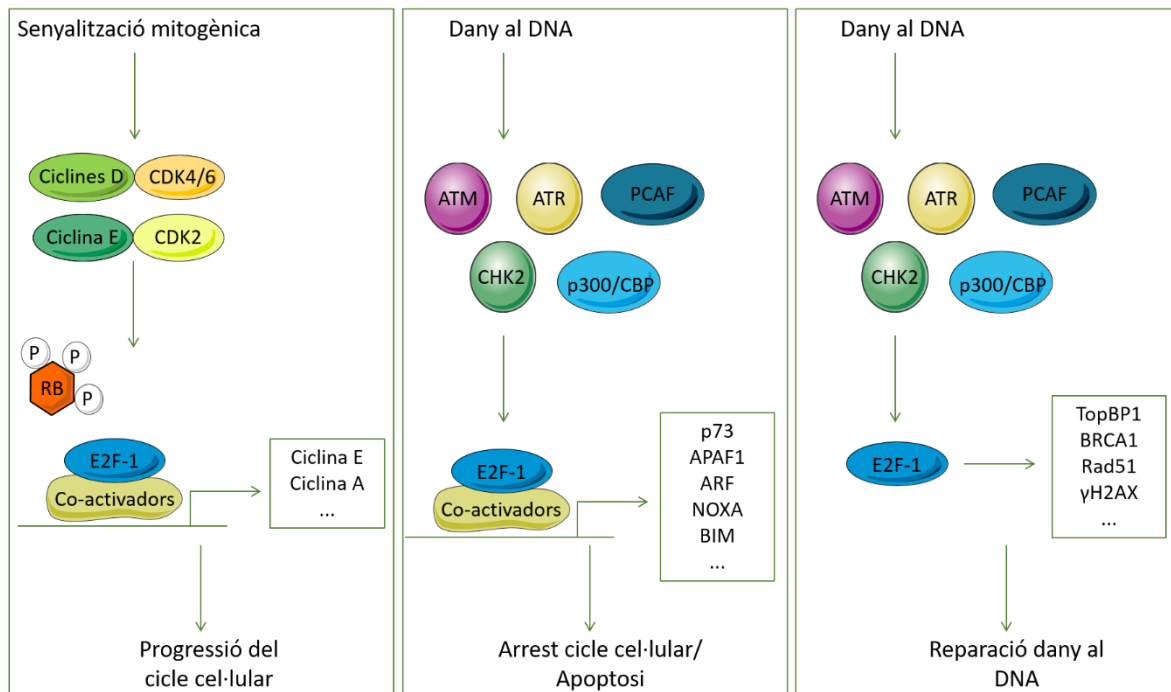


Figura 27: Representació esquemàtica del paper d'E2F-1 en el control de la proliferació, de l'apoptosi i de la reparació del dany al DNA. En condicions normals (panell esquerre), E2F-1 regula l'expressió de gens necessaris per a la progressió del cicle cel·lular. En un context de dany al DNA (panell central i dret), E2F-1 és objecte de modificacions post-traduccionals que l'estabilitzen. Els alts nivells d'E2F-1 i les modificacions que sofreix permeten l'activació d'un ampli espectre de gens implicats en la inducció de l'apoptosi (panell central). A més, E2F-1 pot jugar un paper important en la reparació del dany al DNA a través de la interacció amb determinades proteïnes implicades en les vies de reparació. Es creu que E2F-1 executa aquesta funció reparadora de manera independent a la seva activitat transcripcional (modificat de (Stevens and La Thangue, 2004)).

3.2.3 Regulació d'E2F-1

Tal com s'ha descrit anteriorment, el factor de transcripció E2F-1 pot actuar paradoxalment bé estimulant la proliferació cel·lular o pel contrari, l'apoptosi, en funció de les senyals cel·lulars. Aquesta funció dual d'E2F-1 requereix necessàriament que la seva expressió i activitat es regulin de manera estricta durant el cicle cel·lular a diferents nivells i a través de múltiples vies (Munro et al., 2012; Stevens and La Thangue, 2004).

Encara que el control d'E2F-1 per mitjà de la interacció amb certes proteïnes, com RB, és clarament molt important en la regulació de la seva activitat, és també evident que l'activació de la seva transcripció hi juga un paper significatiu. *E2F-1* està sotmès a un control transcripcional dependent del cicle cel·lular i presenta el seu màxim nivell de mRNA al final de la fase G1. El mRNA d'E2F-1 es troba a nivells molts baixos en cèl·lules quiescents, però s'acumula al final de la fase G1 després d'una reestimulació (Slansky et al., 1993). A més, durant les fases G0 i al començament de la fase G1, la proteïna E2F-1 es troba inhibida com a conseqüència de l'efecte repressor de RB. S'ha descrit que després de l'activació dels complexos formats per les CDKs i les Ciclines de la fase G1, i la conseqüent fosforilació de RB, l'E2F-1 alliberat pot autoregular la seva transcripció des del seu promotor, de manera que incrementa la seva pròpia transcripció (Johnson et al., 1994). A més, també s'ha descrit que RAS actiu indueix un increment dels nivells de mRNA d'E2F-1, ja que n'augmenta la seva estabilitat, i dels nivells proteics, de manera que s'acaba potenciant la seva activitat transcripcional. A més, sembla que aquest increment del mRNA i de la proteïna tenen lloc de manera dependent a les vies RAS/MAPK i PI3K/AKT, i independent a RB (Berkovich and Ginsberg, 2001).

D'altra banda, tal com s'ha explicat anteriorment, l'activitat d'E2F-1 es modula també a través de la interacció amb altres proteïnes i per mitjà de modificacions post-traduccionals. Així, per exemple, RB regula a E2F-1 a partir de la seva associació. A més, també s'ha demostrat que el complex CDK2-Ciclina A s'uneix de manera estable i fosforila a l'heterodímer E2F-1-DP-1, reduint així, la seva capacitat d'unió al DNA (Dymlacht et al., 1997; Xu et al., 1994). Pel que fa a les modificacions post-traduccionals, la fosforilació d'E2F-1, que pot tenir lloc en diversos residus de serina, evita la interacció entre el factor de transcripció i RB, és important per al seu export nuclear i la subseqüent degradació, i també, tal com s'ha descrit en l'apartat anterior, per a la resposta al dany al DNA (Fagan et al., 1994; Ivanova et al., 2009; Munro et al., 2012). D'altra banda, E2F-1 pot ésser acetilat, potenciant la seva capacitat d'unió al DNA, la seva activitat transcripcional i la seva estabilitat proteica (Martínez-Balbás et al., 2000).

Introducció

Finalment, per acabar, el recanvi proteic d'E2F-1 també es troba estrictament controlat (Munro et al., 2012). Es tracta d'una proteïna de curta durada que es degrada a través de la via del proteosoma. A mesura que les cèl·lules progressen de la fase S a la fase G2, el factor de transcripció experimenta una ràpida degradació, i existeixen diversos mecanismes que potencien aquest fenomen, com ara les modificacions post-traduccionals ubiquitinització i metilació (Carr et al., 2015; Munro et al., 2012). Per exemple, E2F-1 pot interactuar amb p19, potenciant la seva ubiquitinització (Martelli et al., 2001). Per contra, MDM2 pot unir-se al factor de transcripció i n'incrementa la seva vida mitjana (Zhang et al., 2005). A més, la unió a RB protegeix E2F-1 de la ubiquitinització i subseqüent degradació (Campanero and Flemington, 1997). La metilació antagonitza la fosforilació i l'acetilació que tenen lloc durant la resposta al dany al DNA, ja que condueix a la ubiquitinització i posterior, degradació d'E2F-1 (Kontaki and Talianidis, 2010).

3.2.4 Models animals d'E2F-1

L'any 1996 es van publicar simultàniament en el temps dos treballs independents que descriuen per primera vegada el fenotip dels ratolins *knock-out* d'E2F-1 (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996). Aquests animals deficientes per al factor de transcripció es desenvolupen i reproduïen de manera normal. No obstant, presenten alguns defectes específics de teixit i són propensos al desenvolupament de tumors. Així, per exemple, mostren anormalitats a nivell de timus, que correlacionen amb un excés de limfòcits T com a conseqüència de defectes en l'apoptosi dels timòcits. A més, també presenten atrofia testicular amb l'edat i displàsia de les glàndules exocrines. Pel que fa a la tumorigènesi, els ratolins *E2F-1^{-/-}* desenvolupen un ampli espectre de tumors entre els 8 i els 18 mesos d'edat, com sarcomes al tracte reproductiu, adenocarcinomes de pulmó i limfomes. Per acabar, aquests animals també mostren alteracions metabòliques (Denechaud et al., 2016; Fajas et al., 2004).

D'altra banda, i contràriament, la sobreexpressió d'E2F-1 sota el control del promotor de la queratina 5 predisposa també els animals a càncer, predominantment, de vagina, de pell i d'estómac (Pierce et al., 1999).

3.2.5 E2F-1 i càncer

E2F-1 és un factor de transcripció intrigant que juga un paper remarcable en processos tumorals. La seva funció en el control del destí cel·lular ha generat un debat important donat que E2F-1 presenta un comportament d'oncogen o de gen supressor tumoral dependent del tipus tumoral i del context cel·lular (Macleod, 1999; Poppy Roworth et al., 2015; Yamasaki et al., 1998; Zacharatos et al., 2004).

No obstant, les alteracions genètiques que afecten al propi E2F-1 són rares (Poppy Roworth et al., 2015). La base de dades *COSMIC (catalogue of somatic mutations in cancer)* només detalla 105 mostres que presenten mutacions en *E2F-1* de 31.035 analitzades. Malgrat tot, alguns treballs han descrit la presència d'amplificacions en carcinoma hepatocel·lular, càncer de pulmó de cèl·lula no petita i càncer de cèrvix, entre altres. A més, també pot tenir lloc una sobreexpressió del factor de transcripció, com en casos de càncer de pulmó de cèl·lula no petita, d'ovari i de mama, i en glioblastomes (Chen et al., 2009; De Meyer et al., 2009; Han et al., 2003). Finalment, i en contraposició, també s'ha evidenciat en certs tipus de càncers, com l'adenocarcinoma gàstric, el càncer de bufeta i el càncer colorrectal, una funció d'E2F-1 com supressor tumoral, ja que la seva expressió correlaciona amb les zones del tumor que presenten major índex apoptòtic (Bramis et al., 2004; Lee et al., 2008; Rabbani et al., 1999). De fet, aquesta funció dual d'E2F-1 que se suggereix amb els casos de càncer humans, també queda palesa amb els treballs realitzats en models murins.

Per tant, sembla clar que el context cel·lular és crític per a l'activitat resultant d'E2F-1, i presenta en conseqüència, importants implicacions en el camp de la teràpia oncològica.

3.3 Control del cicle cel·lular i de la integritat genòmica per PTEN

La transmissió de la informació genètica de manera continua i sense errors és clau per al manteniment de l'estabilitat genòmica. El desenvolupament de tumors en pacients humans i models animals que presenten alteracions genètiques i aberracions cromosòmiques exemplifiquen aquest principi (Brandmaier et al., 2017). La preservació de la integritat genòmica requereix del correcte funcionament del cicle cel·lular, que presenta com a funció principal assegurar un control exhaustiu de dos processos fonamentals: la replicació del DNA i la segregació cromosòmica, que són susceptibles d'errors (Bendris et al., 2015). Així, per tal d'assegurar la progressió unidireccional del cicle, el prerrequisit imprescindible per iniciar una nova fase és que l'anterior es completi sense errors. En aquest context, PTEN podria participar inevitablement en la determinació del destí cel·lular, actuant com a guardià del genoma (Brandmaier et al., 2017).

Diversos estudis han demostrat que la pèrdua de PTEN dóna lloc a una desregulació del cicle cel·lular (Mirantes et al., 2016; Mirantes et al., 2013). Per tant, queda palès que en un context amb PTEN funcional, aquest actua com a fre de la progressió del cicle cel·lular per prevenir la proliferació descontrolada. Si bé PTEN pot no controlar cadascuna de les fases del cicle cel·lular en tots els tipus cel·lulars, s'ha descrit que sí que executa un paper important en el control de les transicions

Introducció

G1/S(Cheney et al., 1999; Ramaswamy et al., 1999) i G2/M(Kandel et al., 2002). A més, i molt important, juga un rol essencial en el control del dany al DNA(Puc et al., 2005). Per tant, es troba involucrat en processos imprescindibles durant la transmissió de la informació genètica per promoure la replicació correcta del DNA i la segregació cromosòmica, evitant així, la inestabilitat genòmica(Brandmaier et al., 2017; Hou et al., 2017).

Específicament, nombrosos treballs relacionen PTEN amb la regulació de la progressió de la fase G1 i de la transició G1/S, tant a partir de la seva activitat fosfatasa lipídica, de manera dependent a la via PI3K/AKT i en el citoplasma, com també per mitjà de l'activitat fosfatasa proteica i de la seva localització nuclear(Brandmaier et al., 2017; Song et al., 2012). Des del seu descobriment, PTEN s'havia associat al citoplasma, degut a la seva implicació en la via PI3K/AKT. No obstant, actualment es coneix que aquesta proteïna pot localitzar-se també a nucli, on desenvolupa funcions rellevants, de manera independent a aquesta via. En qualsevol cas, PTEN es localitza preferentment en el compartiment citoplasmàtic quan la via PI3K/AKT es troba activada, i al nucli, en cèl·lules diferenciades o en repòs. En conseqüència, PTEN és preferentment nuclear durant les fases G0/G1 i, citoplasmàtic, durant la transició G1/S(Chung and Eng, 2005; Ginn-Pease and Eng, 2003; Lian and Di Cristofano, 2005; Liu et al., 2007).

Entre altres, PTEN citoplasmàtic inhibeix l'activació de l'AKT, i indueix en conseqüència, l'acumulació de p27. Aquesta acumulació redueix l'activitat del complex Ciclina E-CDK2 i evita la progressió del cicle cel·lular(Li and Sun, 1998; Weng et al., 2001). De fet, s'ha demostrat que p27 és un mediador crític de l'aturada en G1 induïda per PTEN(Gottschalk et al., 2001). No obstant, a part de p27, altres reguladors de la fase G1 i de la transició a la fase S també estan implicats en l'arrest del cicle cel·lular per PTEN, com per exemple, p18(Bai et al., 2006) i les Ciclines D(Radu et al., 2003; Weng et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Concretament, pel que fa a la Ciclina D1, s'han descrit dos mecanismes pels quals PTEN pot regular la seva expressió. Indirectament, quan no és actiu, a través de la via PI3K/AKT/GSK-3 β , que dona lloc a l'acumulació de Ciclina D1 a nucli i per tant, al progrés del cicle cel·lular(Vivanco and Sawyers, 2002). Directament, per mitjà de la seva localització nuclear, reduint els nivells i la localització nuclear de Ciclina D1. D'aquesta manera, condueix a l'aturada del cicle cel·lular(Radu et al., 2003; Weng et al., 2001).

A més, PTEN nuclear pot interaccionar directament amb p300 per promoure l'acetilació de p53 i la formació del complex PTEN-p53 en resposta al dany al DNA, conduint també, a l'aturada del cicle

cel·lular(Li et al., 2006). Finalment, l'activitat fosfatasa proteica de PTEN nuclear resulta en la defosforilació d'ERK1/2(Chung and Eng, 2005).

Tal com s'ha comentat anteriorment, PTEN nuclear executa diverses funcions en fases més avançades del cicle cel·lular i en processos tant importants com el manteniment de la integritat estructural dels cromosomes i la reparació del DNA en resposta a insults genotòxics. A més, PTEN es troba directament implicat amb la maquinària de la transmissió genètica(Brandmaier et al., 2017; Hou et al., 2017). Per exemple, pot controlar la maquinària de replicació i permetre la recuperació de les forquilles de replicació estancades en resposta a un estrés replicatiu, mitjançant el reclutament de Rad51(He et al., 2015). D'altra banda, pot formar complex amb la Ciclina B1 i la CDK1 a nucli, donant lloc a l'aturada del cicle cel·lular en G2/M(Kim et al., 2016). A més, pot associar-se també i incrementar l'estabilitat de Top2A (*DNA topoisomerase II α*) per tal d'evitar entortolliments de la cromatina abans d'entrar en mitosi(Kang et al., 2015). Finalment, s'ha descrit que PTEN pot interaccionar a través del seu extrem C-terminal amb proteïnes centròmriques com CENP-C (*centromere protein C*), i que la seva pèrdua dóna lloc a inestabilitat cromosòmica, tant a nivell estructural com numèric(Shen et al., 2007; Sun et al., 2014).

Així doncs, la funció nuclear de PTEN participa també en el seu paper com a supressor tumoral, i de fet, nombrosos estudis a nivell clínic proposen que la localització de PTEN podria esdevenir un factor pronòstic de la malaltia, ja que l'absència de la proteïna nuclear s'associa a tumors més agressius, per exemple, de còlon(Lian and Di Cristofano, 2005; Zhou et al., 2002). En qualsevol cas, la complexa regulació que executa PTEN del cicle cel·lular tant a nivell citoplasmàtic com nuclear és crítica per a la supressió tumoral(Brandmaier et al., 2017; Song et al., 2012).

4. Intervenció farmacològica en processos tumorals deficients en PTEN

4.1 Inhibició de CDK4/CDK6: Palbociclib

Les alteracions a l'eix Ciclina D-CDK4/6 són comuns en càncers humans i contribueixen a la proliferació tumoral i a la inestabilitat genòmica i cromosòmica (Kato et al., 2015). Aquesta via pot alterar-se a través de múltiples mecanismes, com l'amplificació de *CCND1* o la sobreexpressió de la Ciclina D1 (Bartkova et al., 1994; Bartkova et al., 1995; Dickson et al., 1995; Jiang et al., 1992; Knudsen et al., 2006; Motokura et al., 1991), l'amplificació o la presència de mutacions activadores de *CDK4/6* (Cheung et al., 2001; Khatib et al., 1993; Park et al., 2014; Sheppard and McArthur, 2013) i també, la pèrdua de l'inhibidor p16^{INK4a} (Iacobucci et al., 2011; Xing et al., 2013).

En aquest context, l'ús d'inhibidors de CDKs s'ha establert com una estratègia per generar nous fàrmacs anticancerígens (Asghar et al., 2015; Dickson, 2014). No obstant, l'ús dels primers inhibidors de CDKs que es van emprar en teràpia oncogènica van deixar resultats decebedors en una gran quantitat d'assaigs clínics (Aklilu et al., 2003; Hofmeister et al., 2014; Law et al., 2015). Però, recentment, s'han desenvolupat inhibidors específics de CDK4/6 que estan resultant ser més prometedors. D'entre tots ells, el Palbociclib s'ha convertit en el primer inhibidor de CDKs que ha demostrat efectivitat en el tractament de diversos tipus de càncers (Dickson, 2014).

El Palbociclib o PD0332991, que es comercialitza sota el nom de Ibrance[®] per Pfizer, és un inhibidor oral potent que inhibeix específicament les CDK4/6 amb una IC₅₀ que oscil·la entre 10-20 nM. No presenta activitat inhibidora sobre altres CDKs, com la CDK1 i la CDK2, que són unes 1000 vegades menys sensibles al fàrmac (Clark et al., 2016; Sherr et al., 2016).

A nivell químic, el Palbociclib és una molècula petita de piridopirimidina que inhibeix l'activitat CDK4/6 per mitjà de l'ocupació dels seus llocs d'unió a ATP (Fry et al., 2004).

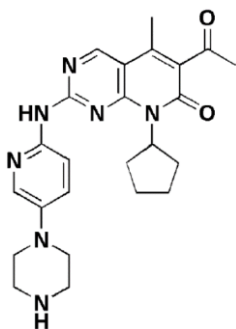


Figura 28: Estructura química del Palbociclib.

Introducció

Des del seu descobriment, s'han realitzat una gran quantitat d'estudis preclínic per tal de determinar els efectes antitumorals del Palbociclib. Aquests treballs suggereixen que l'activitat terapèutica del Palbociclib es basa en la seva capacitat per induir un fort arrest citostàtic reversible del cicle cel·lular en fase G1. D'aquesta manera, dona lloc a una disminució de la proliferació cel·lular, que permet disminuir el creixement de tumors subcutanis establerts amb diverses línies cel·lulars, i fins i tot en alguns casos, causar-ne la regressió (Bollard et al., 2017; Comstock et al., 2013; Fry et al., 2004). En línies cel·lulars i models animals de leucèmia limfoblàstica aguda de tipus T induïda per Notch, el tractament amb Palbociclib no només bloqueja l'entrada a la fase S del cicle cel·lular sinó que també provoca apoptosi (Sawai et al., 2012).

L'eficàcia en la teràpia clínica del Palbociclib s'ha demostrat en diversos estudis clínics, que han facilitat la seva aprovació per la U.S. *Food and Drug Administration* (FDA). El març del 2015, gràcies als resultats de l'assaig clínic fase II conegut com PALOMA-1, el Palbociclib va rebre l'aprovació accelerada per aquest organisme per al tractament, en combinació amb letrozol, de càncer de mama avançat que reté l'expressió del receptor d'estrògens però no, la d'HER2 en dones postmenopàusiques com a primera línia terapèutica endocrina (Finn et al., 2015). Els resultats positius obtinguts en aquest estudi van potenciar la realització del fase III conegut com PALOMA-2, que tenia per objectiu validar els resultats del fase II en una població major (Finn et al., 2016). Aquest nou estudi va permetre que la FDA concedís finalment, l'aprovació regular per aquesta indicació al març del 2017. Entremig, al febrer del 2016, el fàrmac es va aprovar de manera regular per al seu ús, en combinació amb fulvestrant, en la mateixa patologia, però un cop ha tingut lloc el progrés de la malaltia després de la teràpia endocrina (Cristofanilli et al., 2016). Per acabar, a finals del 2016, la EMA (*European Medicines Agency*) també va concedir l'aprovació al fàrmac en les mateixes condicions patològiques.

L'ús del Palbociclib com a estratègia terapèutica, sol o en combinació amb altres teràpies dirigides, també s'ha avaluat en una sèrie d'assajos clínics per a altres tipus de tumors, diferents al càncer de mama, com per exemple, limfomes de cèl·lules del mantell (Leonard et al., 2012) o liposarcomes (Dickson et al., 2013), encara que es requereixen estudis addicionals. En l'actualitat, s'estan conduint assajos en fase II i III per determinar l'eficàcia del fàrmac en càncer de pròstata metastàtic, càncer de pulmó de cèl·lula no petita i tumors estromals gastrointestinals en estadi avançat, entre altres (Clark et al., 2016).

4.2 Inhibició de receptors tirosina quinasa: Regorafenib

El Regorafenib o BAY 73-4506, que es comercialitza sota el nom de Stivarga®, és un inhibidor multiquinasa oral desenvolupat per Bayer i relacionat íntimament amb el Sorafenib (Strumberg and Schultheis, 2012).

A nivell químic, el Regorafenib és una difenilurea que es diferencia del Sorafenib únicament per la presència d'un àtom de fluor a l'anell fenòlic central. Aquesta petita alteració estructural li proporciona un perfil bioquímic similar però diferent al del Sorafenib, i li confereix altres aplicacions clíniques i una activitat farmacològica potencialment més potent (Wilhelm et al., 2011).

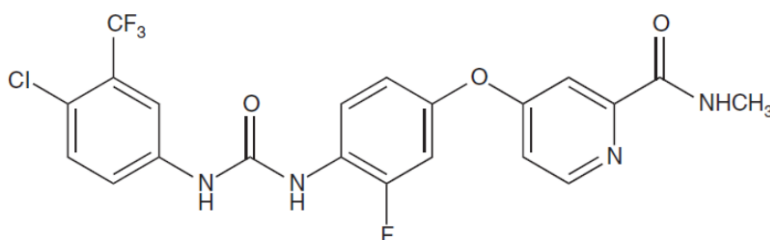


Figura 29: Estructura química del Regorafenib.

El Regorafenib pertany a la família urea dels inhibidors de proteïnes quinases i es considera un inhibidor de tipus II, donat que s'uneix de manera adjacent als llocs d'unió ocupats per ATP de les seves dianes, que són múltiples i molt variades. L'activitat antitumoral del Regorafenib és mitjançada per la inhibició dels receptors tirosina quinasa de membrana i altres quinases intracel·lulars implicades en funcions cel·lulars normals, com la proliferació, i amb una gran rellevància en processos patològics com la oncogènesi, l'angiogènesi i el manteniment del microambient tumoral. Entre les seves dianes destaquen VEGFR 1-3 (*vascular endothelial growth factor receptor*), FGFR (*fibroblast growth factor receptor*), PDGFR- β (*platelet-derived growth factor receptor*), TIE2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain 2*), c-KIT, RET, RAF-1, BRAF i la seva forma mutant hiperactiva BRAF^{V600E} (Strumberg and Schultheis, 2012; Wilhelm et al., 2011). Donat que els receptors tirosina quinasa són els principals activadors de la via PI3K/AKT, el tractament amb Regorafenib podria aportar beneficis terapèutics en aquelles neoplàsies que presenten hiperactivació d'aquest eix. De fet, s'ha suggerit que els subgrups de pacients amb mutacions en *PI3KCA* tractats amb Regorafenib presenten un major benefici clínic (Taberero et al., 2015).

Dianes moleculars IC₅₀ obtinguda en assajos <i>in vitro</i> (nM) ± SD	
RAF1	2,5 ± 0,6
BRAF	28 ± 10
BRAF^{V600E}	19 ± 6
VEGFR-1	13 ± 0,4
VEGFR-2	4,2 ± 1,6
VEGFR-3	46 ± 10
TIE-2	311 ± 46
PDGFR-β	22 ± 3
FGFR1	202 ± 18
c-KIT	7 ± 2
RET	1,5 ± 0,7

Taula 4: Dianes moleculars del Regorafenib.

La capacitat d'inhibir diferents receptors i proteïnes intracel·lulars implica que els efectes antineoplàstics del Regorafenib poden atribuir-se a diversos mecanismes d'acció. En alguns estudis preclínic s'han reportat un efecte antiangiogènic, bloquejant la vascularització tumoral, una reducció de la proliferació i inducció de l'apoptosi cel·lular, així com la inhibició de la capacitat invasiva i metastàtica. En molts d'aquests estudis, la principal via de senyalització implicada és l'eix RAS/MAPK (Abou-Elkacem et al., 2013; Schmieder et al., 2014; Tsai et al., 2017; Tuchen et al., 2017; Wilhelm et al., 2011).

Durant els darrers 10 anys, s'han realitzat diversos assajos clínics amb el fàrmac per avaluar la seva eficàcia en tumors sòlids. És important destacar l'assaig CORRECT, que ha estat el primer assaig en fase III que ha avaluat l'eficàcia del Regorafenib en pacients amb càncer colorectal metastàtic refractari a totes les teràpies estàndard aprovades (Grothey et al., 2013). Gràcies als resultats favorables d'aquest assaig, la FDA va aprovar, el 27 de setembre de 2012, l'ús de Regorafenib per al

tractament de pacients amb càncer colorectal metastàtic que han estat tractats, prèviament, amb fluoropirimidina, oxaliplatí, irinotecan, anticòs monoclonal anti-VEGF, i en cas de tumors amb *KRAS* no mutat, teràpia anti-EGFR. Posteriorment, va rebre també l'aprovació al Japó i per part de la EMA al març i agost de 2013, respectivament. Al febrer del 2013, la FDA va ampliar les indicacions del Regorafenib per incloure el tractament de pacients amb tumors estromals gastrointestinals avançats (*advanced gastrointestinal stromal tumors, GIST*) en base als resultats de l'assaig GRID (Demetri et al., 2013). Per acabar, molt recentment, l'abril de 2017, el Regorafenib va ser aprovat per la FDA per al tractament de pacients amb carcinoma hepatocel·lular, prèviament tractats amb Sorafenib (Bruix et al., 2017).

A més, s'ha realitzat també un estudi fase II per a avaluar l'activitat del Regorafenib en carcinomes renals. El fàrmac va mostrar certa activitat antitumoral però la toxicitat experimentada pels pacients va ser elevada (Eisen et al., 2012). Finalment, s'estan desenvolupant també assajos clínics per validar l'ús del Regorafenib en altres tipus tumors, com càncer biliar o gàstric (Chan and Ma, 2014).

OBJECTIUS

PTEN és l'element regulador negatiu per excel·lència de la via PI3K/AKT. La seva funció com a gen supressor tumoral l'ha convertit en un dels gens més freqüentment mutats en càncers humans. Les delecions o mutacions en *PTEN* que donen lloc a la pèrdua de la seva funció condueixen al desenvolupament de diversos tipus tumorals, tant en humans com en ratolins.

Dècades de recerca han permès postular diversos efectors moleculars de la carcinogènesi induïda per la pèrdua de PTEN. Entre aquests, destaquen les proteïnes implicades en cicle cel·lular i els receptors tirosina quinasa, principals activadors de la via PI3K/AKT. En aquest sentit, els objectius d'aquesta tesi són:

- 1. Estudi de la implicació del factor de transcripció E2F-1 en processos tumorals induïts per la pèrdua de PTEN.**
 - 1.1 Establiment d'un model murí per a l'estudi del paper d'E2F-1 en la tumorigènesi induïda per la pèrdua de PTEN.
 - 1.2 Avaluació de l'efecte de la manca d'E2F-1 en tumors sòlids induïts per pèrdua de PTEN.
- 2. Estudi de la implicació de l'axis Ciclina D-CDK4/6 en les neoplàsies induïdes per la pèrdua de PTEN.**
 - 2.1 Establiment d'un model murí per a l'estudi del paper de Ciclina D1 en la tumorigènesi induïda per la pèrdua de PTEN.
 - 2.2 Avaluació de l'efecte de la manca de Ciclina D1 en tumors sòlids induïts per pèrdua de PTEN.
 - 2.3 Avaluació de l'efecte de l'inhibidor de CDK4/6, Palbociclib, en tumors d'endometri i pròstata, i hiperplàsies de tiroide causades per la pèrdua de PTEN.
- 3. Avaluació de l'efecte de l'inhibidor multiquinasa Regorafenib en el tractament de tumors sòlids deficients per PTEN.**

MATERIALS I MÈTODES

1. Tècniques de Biologia Cel·lular

1.1 Reactius emprats en els experiments amb cultius cel·lulars

Els medis de cultiu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) i DMEM/F12, el sèrum fetal boví inactivat (FBSi), el sèrum de cavall (*horse serum*, HS), la tripsina, el *Hank's balanced salt solution* (HBSS), l'anfotericina B, l'EGF (*epidermal growth factor*) i el ITS (*insulin-Transferrin-Sodium Selenite*) s'adquireixen a Invitrogen. El piruvat sòdic, l'hepes, la penicil·lina/estreptomicina, la tripsina al 0,25% d'EDTA, el dimetilsulfòxid (DMSO), el bromur de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5 difeniltetrazol (MTT), el iodur de propidi, el Tritó X-100, la Ribonucleasa A, la bromodeoxyuridine (BrdU) i el Hoechst 33258 són de Sigma-Aldrich. El Matrigel® s'obté a la casa comercial BD Biosciences i el DCC (*dextran-coated charcoal-stripped serum*) a GIBCO.

1.2 Cultiu cel·lular en dues dimensions de línies tumorals

En aquest treball, s'ha emprat línies cel·lulars de diferents tipus tumorals. Així, s'han utilitzat tres línies cel·lulars humanes, Ishikawa (IK), HEC-1A i MFE-296, de carcinoma d'endometri, dues línies cel·lulars, també humanes, Cal-62 i FTC-133, de carcinoma de tiroide, i finalment, les cèl·lules de rata R33327-5'A (R'A) de carcinoma de pròstata. A la taula 5 es detallen les seves característiques.

Nom	Patologia	Origen	Dilució manteniment
IK	Adenocarcinoma d'endometri	ATCC	1/8
HEC-1A	Adenocarcinoma d'endometri	ATCC	1/8
MFE-296	Adenocarcinoma d'endometri	ECACC	1/8
Cal-62	Carcinoma anaplàsic de tiroide	Dra. Pilar Santisteban	1/8
FTC-133	Carcinoma fol·licular de tiroide	Dra. Pilar Santisteban	1/3
R'A	Adenocarcinoma de pròstata	Dr. Eloi Garí	1/8

Taula 5: Característiques i manteniment de les línies cel·lulars emprades en aquest treball.

Materials i mètodes

Totes les línies cel·lulars anteriorment esmentades creixen de manera adherent en monocapa a les plaques de poliestirè en medi DMEM suplementat amb 10% de FBSi, 1 mmol/L d'hepes, 1 mmol/L de piruvat sòdic, 1% de penicil·lina/estreptomycina i 0,1% d'anfotericina B. Totes cinc línies cel·lulars es mantenen a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂.

Aquestes línies es divideixen cada 3-4 dies quan es troben confluents, per tal d'assegurar el seu manteniment. En primer lloc, es fa un rentat amb tampó fosfat salí (PBS), i tot seguit, es disgreguen amb tripsina al 0,25% d'EDTA durant 5 minuts a 37°C. A continuació, s'inactiva la tripsina amb medi DMEM amb 10% de sèrum, es recullen les cèl·lules i se centrifuguen a 1.000 rpm durant 3 minuts. Finalment, el pellet cel·lular es resuspèn amb el mateix medi de cultiu, i les cèl·lules es planten en noves plaques p100 a una dilució determinada, en funció de la taxa de creixement de cada línia.

Un cop assegurat el manteniment de les línies, es realitza el recompte de les cèl·lules sobrants emprant una cambra de Burker, i un cop coneguda la densitat cel·lular, es pot procedir a plantar les línies cel·lulars per als futurs experiments. El número de cèl·lules i el tipus de placa que s'empra depèn de cada experiment.

1.3 Establiment de cultius tridimensionals amb la línia cel·lular humana de carcinoma d'endometri HEC-1A

En aquest treball, s'han establert cultius tridimensionals (3D) amb la línia cel·lular humana de carcinoma d'endometri HEC-1A. En primer lloc, per a l'establiment d'un cultiu 3D, es disposa un llit de Matrigel® de 7 µl sobre la base de cada pou d'una placa M96, i es deixa polimeritzar a 37°C durant 30 minuts. És important remarcar que el Matrigel® ha de mantenir-se sempre en gel, ja que polimeritza ràpidament a temperatura ambient. A continuació, es planten 1.000 cèl·lules/pou sobre el llit polimeritzat, tenint com a única premissa que les cèl·lules no es trobin formant agregats. El medi emprat per resuspendre les cèl·lules és DMEM/F12 (1:1) suplementat amb 1 mmol/L d'hepes, 1% de piruvat sòdic, 1% de penicil·lina/estreptomycina, 0,1% d'anfotericina B i 2% de DCC. Els cultius en tres dimensions es mantenen també a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂.

1.4 Aïllament de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí i establiment de cultius tridimensionals

Per a l'aïllament de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí i el seu posterior establiment en cultius tridimensionals, s'empren femelles d'entre 3-4 setmanes d'edat. En primer lloc, se sacrifiquen els

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

L'endemà, es procedeix a plantar les cèl·lules endometrials en tres dimensions. En primer lloc, les cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí, que es troben creixent en dues dimensions, es netegen amb PBS i es disgreguen amb tripsina al 0,25% d'EDTA durant 5 minuts a 37 °C. Tot seguit, la digestió s'atura amb l'adició de medi DMEM suplementat amb 10% FBSi. Es recullen les cèl·lules i se centrifuguen a 1.000 rpm durant 3 minuts. Posteriorment, es netegen amb PBS dues vegades, i es disgreguen mecànicament, fins a formar agregats cel·lulars de 2 a 8 cèl·lules. Qualsevol intent d'individualitzar les cèl·lules provoca una dràstica disminució de la viabilitat cel·lular. Tot seguit, les cèl·lules es resuspenen en medi DMEM/F12 suplementat amb 1 mM d'hepes, 1% de penicil·lina/estreptomocina, 0,1% d'anfotericina B i 3% de Matrigel®, i es planten a una concentració final de 4x10⁴ agregats cel·lulars/ml, sobre un llit de Matrigel®, prèviament polimeritzat. Al dia següent, es canvia el medi per medi nou igual a l'anterior però suplementat també amb 5 ng/ml d'EGF, una dilució 1:100 d'ITS i 3% de Matrigel®. A partir d'aquest moment, el medi es canvia cada 2-3 dies emprant cada vegada, aquest darrer medi suplementat.

1.5 Tractaments farmacològics *in vitro*

1.5.1 Tamoxifè

El Tamoxifè s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol, per al seu ús *in vitro*, en etanol absolut fins a una concentració stock d'1 mM.

Materials i mètodes

Per realitzar l'escissió de *Pten in vitro* en cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins femella Cre:ER^{T+/-} PTEN^{f/f}, un cop aïllades les cèl·lules i en el moment de plantar-les en dues dimensions s'afegeixen 0,5 µg/ml de Tamoxifè al medi de cultiu. L'endemà, es pot procedir normalment per tal de dur a terme el cultiu tridimensional.

1.5.2 Palbociclib

El Palbociclib o PD-332991 s'obté en pols a Pfizer Inc. Per als tractaments *in vitro*, el Palbociclib es dissol en DMSO estèril a una concentració stock de 2,5 mM, i es guarda congelat a -80°C, protegit de la llum, en alíquotes d'un sol ús. En el moment del tractament, el Palbociclib es dilueix en medi de cultiu i s'utilitza a concentracions de 2,5; 5 i 10 µM en funció de cada experiment.

Per l'assaig de viabilitat cel·lular, es planten 7.000 cèl·lules/pou en plaques M96. 24 hores després, es preparen les pertinents dilucions de Palbociclib i es realitza el tractament, que té una durada de 48 hores. Passat aquest temps, s'avalua la viabilitat cel·lular mitjançant la tècnica del MTT.

Per a l'anàlisi de la distribució de cicle cel·lular, es planten 100.000 cèl·lules/pou en plaques M6. A les 24 hores, es tracten amb les dosis corresponents de Palbociclib durant 48 hores, i es procedeix a avaluar la distribució del cicle cel·lular amb la tècnica del iodur de propidi.

Per al tractament de cultius tridimensionals de la línia cel·lular humana HEC-1A, es planten 1.000 cèl·lules/pou en M96 sobre el llit de Matrigel®, i el cultiu es deixa créixer entre 4-5 dies. Passat aquest temps, el cultiu tridimensional es tracta amb Palbociclib a les dosis corresponents durant 48 hores i posteriorment, s'avalua la mida dels diàmetres dels esferoides.

1.5.3 Regorafenib

El Regorafenib o Stivarga® (BAY 73-4506) s'obté en pols a Bayer Healthcare Pharmaceuticals. Per als tractaments *in vitro*, el Regorafenib es dissol en DMSO estèril a una concentració stock de 10 mM, i es guarda congelat a -20°C protegit de la llum. En el moment del tractament, el Regorafenib es dilueix en medi de cultiu i s'utilitza a concentracions de 5, 10, 25 i 50 µM, en funció de l'experiment.

Per a l'assaig de viabilitat cel·lular, es planten 7.000 cèl·lules/pou en plaques M96. 24 hores després, es preparen les pertinents dilucions de Regorafenib i es realitza el tractament, que té una durada de 72 hores. Passat aquest temps, s'avalua la viabilitat cel·lular mitjançant la tècnica del MTT.

Per al tractament agut amb Regorafenib, es planten 75.000 cèl·lules/pou en plaques M24. El procediment és el mateix que per a l'assaig anterior, però en aquest cas, el tractament només dura 16 hores. Passat aquest temps, les cèl·lules es renten amb PBS i es realitza l'extracció proteica.

1.6 Mesura del diàmetre de les glàndules o esfèroides

En aquest treball, s'han establert cultius tridimensionals amb la línia cel·lular humana de carcinoma d'endometri HEC-1A i amb cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí. És possible determinar els diàmetres dels esfèroides o glàndules d'ambdós tipus de cultius.

En primer lloc, es capturen imatges dels esfèroides o glàndules amb un microscopi confocal (Fluoview FV1000), i finalment, es realitza la mesura dels diàmetres emprant un software d'anàlisi d'imatge (*Image J* version 1.46r; NIH, Bethesda, MD). Es quantifica, almenys, el diàmetre de 150 esfèroides o glàndules per a cada condició.

1.7 Avaluació de la viabilitat cel·lular mitjançant MTT

L'avaluació de la viabilitat cel·lular es duu a terme amb l'assaig colorimètric MTT. En aquest assaig, es mesura l'activitat de l'enzim succinat-deshidrogenasa, present als mitocondris, que catalitza la reducció del MTT, producte de coloració groguenca, a un compost de coloració púrpura, anomenat formazan. Donat que la reducció del MTT a formazan només pot tenir lloc en cèl·lules metabòlicament actives, el nivell d'activitat d'aquest enzim, i per tant, la quantitat de formazan produïda, és proporcional a la viabilitat cel·lular del cultiu.

Un cop finalitzat el tractament d'interès, es pot procedir a realitzar l'assaig MTT. En primer lloc, s'incuben les cèl·lules a 37°C durant 30-45 minuts amb el reactiu MTT a 1 mg/ml, a les fosques. A continuació, s'aspira el medi i s'afegeixen 50 µl de DMSO, per tal de dissoldre els cristalls de formazan produïts per les cèl·lules actives, i s'incuba 5 minuts a les fosques a temperatura ambient. La quantitat de formazan solubilitzat i alliberat el medi es mesura amb un espectrofotòmetre (Bio-Rad) a una longitud d'ona dual de 595 i 620 nm. La lectura de l'absorbància obtinguda és proporcional a la viabilitat cel·lular. La resistència de les cèl·lules al tractament es representa com el percentatge de cèl·lules vives que han sobreviscut al tractament, en relació amb la condició control.

1.8 Avaluació de la distribució del cicle cel·lular

La distribució del cicle cel·lular es determina amb el mètode del iodur de propidi i la posterior lectura amb el citòmetre de flux.

Un cop finalitzat el tractament en qüestió, les cèl·lules es recullen i es resuspenen en 500 µl de PBS i 1 ml d'etanol fred al 70%, mentre s'agita enèrgicament. A continuació, les mostres es guarden congelades a -20°C, fins al dia de l'anàlisi. En aquest moment, es realitzen dos rentats amb PBS i s'incuben les cèl·lules amb la solució de iodur de propidi, que conté 0,04 µg/ml de iodur de propidi; 0,1% de Tritó X-100 i 50 µg/ml de Ribonucleasa A en PBS. La incubació es duu a terme durant 30 minuts en foscor a 37°C, i passat aquest temps, ja es poden analitzar les mostres amb el citòmetre de flux. Els resultats s'analitzen amb el programa Win MDI 2.9.

1.9 Avaluació de la proliferació cel·lular mitjançant l'assaig d'incorporació de BrdU

La BrdU és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina que s'empra molt comunament per detectar cèl·lules que proliferen. Així, les cèl·lules poden incorporar la BrdU, enlloc de la timidina, a les noves cadenes de DNA quan es repliquen. En aquest treball, només s'ha dut a terme l'assaig de BrdU en cultius en tres dimensions de cèl·lules epitelials de ratolí.

Per fer l'assaig d'incorporació de la BrdU, cal en primer lloc, afegir la BrdU al medi de cultiu a una concentració final de 4 µg/ml durant 16 hores. Passat aquest temps, els cultius en tres dimensions es fixen amb paraformaldehid (PFA) fred al 4% durant 20 minuts, i tot seguit, es fan tres rentats amb PBS. A continuació, es desnaturalitza el DNA amb HCl 2M durant 30 minuts a 37°C. Aquest pas permet que l'anticòs primari pugui reconèixer la BrdU. Transcorreguts els 30 minuts, s'afegeix Tetraborat Sòdic 0,1 M durant 2 minuts per tal de neutralitzar l'HCl. Tot seguit, el cultiu es renta 3 vegades més amb PBS i s'hi afegeix la solució de bloqueig durant 1 hora. Aquesta solució de bloqueig conté un 5% HS, 5% FBSi; 0,2% de glicina i 0,1% de Tritó X-100 en PBS. A continuació, es realitzen tres rentats més amb PBS, i s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs primari de ratolí anti-BrdU (ref. M0744, dilució 1/100, Dako) durant 18 hores. Finalment, es retira l'anticòs primari, es renten els pous tres cops amb PBS i s'incuba amb l'anticòs secundari de cabra anti-ratolí Alexa Fluor 546 (ref. A11003, dilució 1/500, Life Technologies) i Hoechst 33258 durant 3-4 hores. Transcorregut aquest temps, ja es pot visualitzar la tinció de la BrdU emprant un microscopi confocal.

2. Animals d'experimentació

2.1 Consideracions prèvies

En aquest treball, s'han emprat com a animals d'experimentació ratolins de laboratori allotjats en instal·lacions de barrera. Els ratolins s'han sotmès a procediments lliures de patògens i s'han mantingut a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ i una humitat relativa del $50\pm 5\%$, seguint cicles de 12 hores de llum/fosc i amb un accés *ad libitum* a menjar i aigua. A més, els ratolins immunodeprimits SCID (*severe combined immunodeficiency*) s'han mantingut en condicions SPF (*specific-pathogen free*).

Tots els estudis *in vivo* realitzats en aquest treball, i per tant, emprant ratolins d'experimentació, s'han regit per les següents disposicions legals:

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

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

2.2 Soques de ratolins emprades

2.2.1 Ratolins CAG-Cre:ER^T

Els ratolins CAG-Cre:ER^T (en endavant, Cre:ER^T) (B6.CG-Tg(CAG-cre/Esr1)5Amc/J) van ser generats al laboratori del Dr. Andrew P. McMahon mitjançant la tècnica de la injecció pronuclear, en la qual el material genètic s'injecta en el pronucli d'un oòcit fecundat (Hayashi and McMahon, 2002). El nostre laboratori va adquirir els ratolins Cre:ER^T a través de la companyia The Jackson Laboratory.

Aquest ratolins transgènics expressen la recombinasa Cre induïble per Tamoxifè sota el control del promotor de la CAG acoblat al *enhancer* del citomegalovirus (CMV). El transgen conté la proteïna de fusió formada per la recombinasa Cre i una forma mutant del domini d'unió a lligand del receptor d'estrògens murí (ER^T), que impedeix la unió amb els estrògens endògens. La proteïna de fusió Cre:ER^T es manté al citoplasma quan no s'estimula, però després de la exposició a Tamoxifè, pot translocar al compartiment nuclear i actuar com recombinasa sobre les seqüències LoxP.

Aquesta colònia de ratolins es manté en heterozigosi, i els animals Cre:ER^{T+/-} són viables, fèrtils, presenten una mida normal, i a més, no mostren alteracions morfològiques ni de comportament.

2.2.2 Ratolins *Pten* floxed (*Pten*^{f/f})

Els ratolins *Pten*^{f/f} (C;129S4-*Pten*^{tm1Hwu}/J) van ser generats pel Dr. Hong Wu mitjançant la tècnica de l'electroporació de cèl·lules mare embrionàries (ESC) i posterior injecció en blastocists (Lesche et al., 2002). El nostre laboratori va adquirir-los a través de The Jackson Laboratory.

Aquests ratolins presenten seqüències LoxP que es troben flanquejant l'exó 5 de *Pten*, que codifica per al domini fosfatasa de la proteïna. És important remarcar que el creuament d'aquests ratolins amb una soca que expressi qualsevol tipus de recombinasa Cre dóna lloc a la pèrdua de l'exó 5, i com a conseqüència, a l'absència de la proteïna PTEN. Així doncs, el seu ús permet l'excisió de *Pten* en diferents teixits o moments del desenvolupament en funció de la recombinasa que s'utilitzi.

Aquesta colònia de ratolins es manté en homozigosi i els ratolins *Pten*^{f/f} són viables, fèrtils, presenten una mida normal, i a més, no mostren alteracions morfològiques ni de comportament. Si no es creuen amb cap recombinasa, presenten nivells normals de PTEN.

2.2.3 Ratolins CAG-Cre:ER^TPTEN^{f/f}

Els ratolins CAG-Cre:ER^TPTEN^{f/f} (en endavant, Cre:ER^TPTEN^{f/f}) van ser generats l'any 2013 per la Dra. Cristina Mirantes (Mirantes et al., 2013) a partir del creuament de ratolins Cre:ER^{T+/-} i PTEN^{f/f}, en un fons genètic mixt.

Per tal d'induir la deleció de *Pten*, els ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} reben una única injecció de 0,5 mg de Tamoxifè entre la 4-5 setmana de vida. Entre les 6-8 setmanes posteriors, els ratolins desenvolupen EIN, hgPIN i hiperplàsia de tiroide, com a conseqüència de la pèrdua de PTEN.

2.2.4 Ratolins knock-out de *Ccnd1* (CycD1^{-/-})

Els ratolins knock-out de *Ccnd1* (CycD1^{-/-}) (FVB.129S2(B6)-Ccnd1tm1Wbg/J) van ser generats al laboratori del Dr. Robert A. Weinberg, mitjançant la tècnica d'electroporació d'ESC i posterior injecció en blastocists (Sicinski et al., 1995). El nostre laboratori va adquirir-los a través de The Jackson Laboratory.

El vector emprat per generar aquest ratolí permet reemplaçar un fragment genòmic del gen *Ccnd1*, que conté part de l'exó 1, i els exons 2 i 3, pel *cassette neo*. La seqüència reemplaçada codifica per al domini *cyclin box*, que es requereix per a l'activitat proteica.

Aquests ratolins es mantenen en heterozigosi, donat que els ratolins homozigots per a la mutació dirigida, encara que són viables, fèrtils i es desenvolupen a termini, mostren un retard en el creixement molt pronunciat a les tres setmanes d'edat. La majoria dels ratolins homozigots per a la mutació moren al cap de pocs dies del naixement, sovint durant el primer mes de vida. A més, els animals que aconseguen sobreviure a aquest període continuen mostrant un pes inferior al normal i un increment de la mortalitat. Finalment, els ratolins CycD1^{-/-} presenten també defectes neurològics, entre altres alteracions.

2.2.5 Ratolins knock-out d'*E2f-1* (E2F-1^{-/-})

Els ratolins knock-out d'*E2f-1* (E2F-1^{-/-}) (B6; 129S4-E2f1tm1Meg/J) van ser generats al laboratori del Dr. Michael E. Greenberg, mitjançant la tècnica d'electroporació d'ESC i posterior injecció en blastocists (Field et al., 1996). El nostre laboratori va adquirir-los a través de The Jackson Laboratory.

El vector emprat per generar aquest ratolí permet reemplaçar un fragment genòmic del gen *E2f-1*, corresponent a l'exó 3, pel *cassette neo*. A més, l'exó 4 també es deleciona. La seqüència reemplaçada del gen *E2f-1* codifica per al domini d'unió al DNA i part del domini de dimerització. Mutacions en

Materials i mètodes

aquestes regions permeten abolir la capacitat de l'E2F-1 per unir-se al DNA, activar la transcripció, induir la progressió del cicle cel·lular o conduir a l'apoptosi.

Els ratolins E2F-1^{-/-} són viables i fèrtils. No obstant, presenten alteracions de maduració dels timòcits i desenvolupen un ampli espectre de càncers. A més, amb l'edat, desenvolupen atrofia testicular.

2.2.6 Ratolins SCID (*severe combined immunodeficiency*)

Els ratolins SCID presenten una mutació genètica autosòmica recessiva designada com *Prkdc*^{scid}, que es localitza al cromosoma 16, i que impedeix la correcta recombinació VDJ. D'aquesta manera, els ratolins, que són homozigots per la mutació, no són capaços de generar limfòcits funcionals i desenvolupen una immunodeficiència combinada greu que afecta tant els limfòcits B com els T. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments. Per tant, són un model animal molt útil per l'estudi de tumors subcutanis o *xenografts*. El nostre laboratori va adquirir els ratolins SCID a través de la companyia The Jackson Laboratory.

2.3 Sexatge i Genotipatge

Els ratolins es deslleten i se sexen als 21 dies de vida, moment en què es procedeix al seu genotipatge. Amb aquest objectiu, els ratolins s'adormen amb isofluorà al 2% per via inhalatòria, es marquen, per tal d'identificar-los i diferenciar-los els uns dels altres, mitjançant un codi de talls en els orelles, i es procedeix a obtenir una biòpsia de la cua, inferior a 5 mm de longitud.

Tot seguit, les cues es digereixen en un tampó de genotipatge (100 mM Tris pH 8,5; 200 mM NaCl, 5 mM EDT i 0,2% SDS) i proteïnasa K a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich). La digestió es realitza durant aproximadament 4 hores a 56 °C i amb una agitació de 750-800 rpm. A continuació, s'inactiva la proteïnasa K a 95°C durant 5 minuts i es descarten les restes de la cua no digerides per centrifugació. Es recull el sobrenedant i, tot seguit, es precipita el DNA amb etanol absolut fred. Finalment, es resuspèn el DNA amb aigua milliQ.

Un cop extret el DNA de cadascuna de les cues tallades, es pot procedir a realitzar la PCR (*polymerase chain reaction*) corresponent (taula 6). Finalment, els productes de la PCR s'analitzen mitjançant separació electroforètica en gel d'agarosa i les bandes es visualitzen per tinció amb Safe View Nucleic Acid Stain (NBS Biologicals).

Gen	Seqüència dels primers emprats	Programa de PCR			Bandes obtingudes				
		T (°C)	Temps	Cicles	Genotip	Mida			
Cre:ERT	Fwd	ACG AAC CTG GTC GAA ATC GT GCG	94 °C	2'	1	Cre:ERT ^{-/-}	no banda		
			94 °C	45''					
	Rev	CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG	65 °C	45''	32			Cre:ERT ^{+/+}	350 bp
			72 °C	45''					
			72 °C	5'	1				
Pten floxed	Fwd	CAA GCA CTC TGC GAA CTG AG	94 °C	3'	1	PTEN ^{+/+}	156 bp		
			94 °C	30''					
	Rev	AAG TTT TTG AAG GCA AGA TGC	60 °C	1'	35			PTEN ^{f/+}	156 i 328 bp
			72 °C	2'				PTEN ^{f/f}	328 bp
			72 °C	2'	1				
Ccnd1	Comú	TAG CAG AGA GCT ACA GAC TTC G	94 °C	3'	1	CycD1 ^{+/+}	224 bp		
			94 °C	30''					
	WT	CTC CGT CTT GAG CAT GGC TC	64 °C	45''	35			CyCD1 ^{+/-}	224 i 391 bp
	Mutant	CTA GTG AGA CGT GCT ACT TC	72 °C	1'				CycD1 ^{-/-}	391 bp
			72 °C	2'	1				
E2f-1	Comú	CTA ATT CTG ACC ACC AAA CGC	94 °C	2'	1	E2F-1 ^{+/+}	172 bp		
			94 °C	30''					
	WT	GGA TAT GAT TCT TGG ACT TCT TGG	60 °C	30''	35			E2F-1 ^{+/-}	172 i 227 bp
	Mutant	CAA GTG CCA GCG GGG CTG CTA AAG	72 °C	30''				E2F-1 ^{-/-}	227 bp
			72 °C	5'	1				

Taula 6: Genotipatge dels ratolins emprats en aquest treball. S'especifica la seqüència dels primers, el programa de PCR i la mida de les bandes per discriminar entre els diferents genotips possibles.

2.4 Establiment de tumors subcutanis en ratolins SCID

Per a l'establiment de tumors subcutanis o *xenografts in vivo* s'utilitzen femelles SCID d'entre 8-12 setmanes d'edat i amb un pes comprès entre els 20-25 grams. S'injecten subcutàniament, a cada flanc del ratolí, 10⁶ cèl·lules de cadascuna de les línies cel·lulars emprades, HEC-1A o MFE-296, en un volum total de 100 µl. El creixement tumoral es mesura cada setmana amb un peu de rei digital i el volum tumoral es calcula d'acord amb la fórmula: TV (*tumor volume*) = (Dxd²)/2, on *D* correspon al diàmetre gran del tumor i *d*, al petit. Els ratolins es comencen a tractar en el moment que els tumors mesuren

Materials i mètodes

100 mm³. Un cop finalitzat el tractament, els ratolins se sacrifiquen per dislocació cervical i el tumor es col·lecta per al seu anàlisi macroscòpic i immunohistològic.

2.5 Establiment de tumors subcutanis amb mostres derivades de pacients

Els tumors subcutanis amb mostres derivades de pacients o PDX (*patient-derived tumor xenograft*) es van establir a l'Institut de Recerca Vall Hebron amb col·laboració amb el grup de recerca biomèdica de ginecologia. Tots els procediments es van dur a terme segons protocols aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Hospital Universitari Vall Hebron.

El tumor subcutani PDX741 es genera a partir d'una mostra de teixit tumoral fresc d'una pacient amb EEC que s'implanta de manera subcutània als flancs dels animals. Per testar l'eficàcia de fàrmacs, es trasplanten quirúrgicament per via subcutània petites peces del PDX a nous ratolins femella *nude* Swiss de 6 setmanes d'edat. De nou, els tumors es mesuren segons la fórmula $TV = (Dxd^2)/2$, dos cops per setmana amb un peu de rei digital per tal de monitoritzar el creixement tumoral. Els tumors es deixen créixer fins que arriben aproximadament a un volum de 200 mm³, moment en què comença el tractament. Un cop aquest finalitzat, els ratolins se sacrifiquen per dislocació cervical i els tumors es col·lecten per al seu anàlisi macroscòpic i immunohistològic.

2.6 Tractaments farmacològics *in vivo*

2.6.1 Tamoxifè

Tal com s'ha comentat anteriorment, el Tamoxifè s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol, per al seu ús *in vivo*, en etanol absolut fins a una concentració de 100 mg/ml, i en oli de blat de moro (*corn oil*, Sigma-Aldrich) per tal d'arribar a la concentració final de 5 mg/ml. És important escalfar la preparació a 37 °C i vortejar-la bé per dissoldre completament el Tamoxifè.

Per induir l'activació de la recombinasa Cre:ER^T i la conseqüent deleció de *Pten*, els ratolins reben una única injecció intraperitoneal de 0,5 mg de Tamoxifè a les 4-5 setmanes d'edat. Per assegurar la fiabilitat dels resultats obtinguts, i que la inducció de la Cre:ER^T es deu exclusivament a l'estimulació amb Tamoxifè i no a l'efecte dels estrògens endògens, en tots els experiments s'inclou un grup d'animals que s'injecta només amb oli de blat de moro com a control, donat que aquest és el diluent emprat durant la preparació de la droga.

2.6.2 Palbociclib

Com s'ha comentat anteriorment, el Palbociclib o PD-332991 s'obté en pols a Pfizer Inc i es conserva a temperatura ambient i en la foscor, protegit de la llum.

Per als experiments *in vivo*, el Palbociclib es dissol en un tampó de Lactat de Sodi (Sigma-Aldrich) (50 mM, pH 4,0) fins a una concentració de 20 mg/ml. Un cop dissolt, el Palbociclib es manté congelat a -20°C i en la foscor.

Els ratolins Cre:ER^TPTEN^{ff} reben una dosi diària de 100 mg/kg de Palbociclib per via oral durant 21 dies, començant el tractament 2 setmanes després de la injecció de Tamoxifè. Per al tractament agut amb Palbociclib, el fàrmac s'administra només durant tres dies consecutius a tres dosis diferents, 75, 100 o 150 mg/kg. Finalment, en l'experiment de supervivència, el animals es tracten 5 cops per setmana amb Palbociclib, fins al moment en què requereixen l'eutanàsia. En tots els experiments, els animals controls van rebre vehicle, que consisteix en el mateix tampó de Lactat de Sodi emprat per dissoldre el Palbociclib.

En els experiments de tumors subcutanis establerts amb les línies cel·lulars HEC-1A i MFE-296, els animals es tracten per via oral amb vehicle o Palbociclib a una dosi de 150 mg/kg durant 15 dies.

En l'experiment amb PDX, els ratolins es tracten per via oral amb vehicle o Palbociclib a una dosi de 150 mg/kg durant 10 dies.

2.6.3 Regorafenib

Tal com s'ha descrit prèviament, el Regorafenib o Stivarga® (BAY 73-4506) s'adquireix en pols a Bayer Healthcare Pharmaceuticals i es manté a temperatura ambient i en la foscor, protegit de la llum, tant en pols com un cop diluït.

Per tal de dissoldre la droga, en primer lloc, es prepara una solució stock d'1,2-propylenglycol (Fluka), PEG 400 (Fluka), Pluronic F68 (VRW) i Regorafenib. La dissolució de tots els components és molt lenta, així que pot ser necessari deixar la barreja tota la nit a una temperatura de fins a 50°C i en agitació, fins que s'esclareixi completament. Aquesta solució stock s'aliquota ràpidament, ja que un cop a temperatura ambient, solidifica molt de pressa. Abans del seu ús, cal afegir un 20% d'aigua estèril a la solució stock, de manera que s'arriba així, a una concentració final de 10 mg/ml. Com que la solució de Regorafenib és sòlida a temperatura ambient, cal mantenir-la escalfada fins a 50°C fins obtenir una

Materials i mètodes

solució líquida que sigui administrable per via oral. A més, un cop afegida l'aigua a la solució, el Regorafenib només hi és estable durant 1 hora, així que cal treballar amb certa celeritat.

El Regorafenib s'administra diàriament als ratolins de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f} per via oral a una dosi de 60 mg/kg. El tractament s'inicia 3 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè i es duu a terme durant 21 dies. Per a l'experiment de supervivència, el Regorafenib s'administra seguint cicles de 5 dies de tractament diaris, seguits de 9 dies de descans, abans de començar el següent cicle. En aquest cas, el tractament s'allarga en el temps fins que els animals requereixen l'eutanàsia.

2.7 Colonoscòpies

Per a la monitorització continuada de les lesions presents a còlon es realitzen colonoscòpies d'alta resolució als ratolins d'interès experimental de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1, i a diferents punts temporals després de la inducció de la delecció de *Pten* amb Tamoxifè.

Les colonoscòpies a ratolins vius es realitzen amb l'aparell *Coloview rigid colonoscope* (Karl Storz), i se segueix el protocol descrit prèviament en altres treballs, però amb petites modificacions (Becker et al., 2006; Huang et al., 2002). Els ratolins es deixen en dejú durant les 12 hores prèvies a la colonoscòpia però amb accés a aigua. Abans de començar, s'anestesien amb un 2% d'isofluorà i es col·loquen en la posició adequada, sobre la esquena, de panxa cap a d'alt. D'aquesta manera, s'injecta 1 ml de PBS via anus, com si es tractés d'un ènema, per tal de netejar acuradament l'intestí gros i aconseguir una adequada lubricació. Finalment, l'endoscopi s'introdueix per l'anus i el còlon s'unfla suaument amb una bomba d'aire per facilitar la visualització, però amb cura de no perforar l'intestí. És possible visualitzar fins uns 3 cm de còlon i es poden prendre imatges de les lesions, per tal de seguir la seva progressió.

3. Histologia i Immunohistoquímica

3.1 Histologia Bàsica

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

3.2 Immunohistoquímica

Després d'incloure els teixits en parafina, pot ésser necessari recórrer a l'anàlisi immunohistoquímic de les mostres en cas que es vulguin estudiar marcadors específics. Així, es realitzen talls de 3 µm dels blocs de parafina i s'assequen durant 1 hora a 65°C. A continuació, es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. El següent pas consisteix en el desemmascament antigènic, que permet recuperar i exposar antígens emmascarats durant la preparació de la mostra. Així, s'incuben els portaobjectes amb un tampó comercial, que conté Tris/EDTA 50X a pH 9, en un mòdul de pretractament PT-LINK (Dako) durant 20 minuts a 95°C. A continuació, es bloqueja la peroxidasa endògena de la mostra incubant els portaobjectes amb una solució d'H₂O₂ al 3% per reduir el soroll de fons que s'obté amb el cromogen emprat. Tot seguit, es realitzen tres rentats amb PBS i s'incuba la mostra amb l'anticòs primari durant 30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es fan tres rentats més amb PBS i s'incuba la mostra amb l'anticòs secundari. Si la senyal és prou forta, s'utilitza un anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa (HRP) i s'incuba durant 30 minuts. Per contra, en aquells casos en què sigui necessari amplificar la senyal, s'empra un anticòs secundari conjugat a biotina durant 30 minuts, i finalment, s'incuba la mostra 15 minuts més amb estreptavidina unida a la peroxidasa (HRP), sempre a temperatura ambient. Per acabar, s'aplica el cromogen diaminobenzimida (DAB, Dako) per rebel·lar la reacció, i es realitza una contra-tinció amb hematoxilina per visualitzar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat. A la taula 7 s'indiquen els anticossos que s'han emprat en aquest treball per als anàlisis immunohistoquímics:

Anticòs	Dilució	Proveïdor	Referència
PTEN	1:100	Dako	M3627
Ki-67	1:50	Dako	M7249
Ciclina D1	1:25	Dako	M3642
p-RB	1:100	BD Biosciences	558385
β-Catenina	RTU	Dako	IR702
EnVision FLEX detection kit	RTU	Dako	K8002
Conill anti-Biotina	1:200	Jackson	111-065-144
Estreptavidina	1:400	Jackson	016-030-084

Taula 7: Anticòs primaris i secundaris emprats per a la immunodetecció de proteïnes mitjançant tinció immunohistoquímica en parafina. RTU: *Ready to use*.

3.3 Avaluació dels resultats de l'anàlisi immunohistoquímic

Els resultats de l'anàlisi immunohistoquímic s'avaluen emprant un sistema d'imatge automatitzat, l'instrument ACIS III (Dako). En aquest treball, únicament s'ha valorat la intensitat de la immunohistoquímica de pRB.

Així, s'escanegen les tincions realitzades i el sistema ofereix automàticament un valor d'intensitat per a cada cas, en un rang que oscil·la entre 60 i 255. Per a cada condició experimental, cal determinar la intensitat de com a mínim tres tincions independents, corresponents a 3 animals diferents que formen part del conjunt.

3.4 Anàlisi de proliferació cel·lular

El Ki-67 és un marcador que s'expressa en cèl·lules proliferatives. D'aquesta manera, la quantificació de la immunohistoquímica de Ki-67 dóna una mesura de la taxa de proliferació d'un determinat teixit en unes determinades condicions, per exemple, després d'un tractament.

Per a la quantificació, es prenen fotografies de 5 camps representatius de cada animal i es calcula la proliferació cel·lular com el percentatge de nuclis positius per Ki-67 respecte al número total de nuclis

a cada camp. S'avaluen entre 1.500-2.000 nuclis per animal. Les imatges de la tinció es prenen amb el microscopi DMD 108 (Leica) i es quantifiquen manualment amb el programa *Image J*.

3.5 Anàlisi de l'apoptosi cel·lular amb TUNEL

Per a la detecció immunohistoquímica de l'apoptosi cel·lular s'empra el kit comercial *In situ cell death detection*, POD de Roche (ref. 11684817910), que es basa en la tecnologia TUNEL, i se segueixen les instruccions del fabricant. Aquesta tecnologia permet detectar els trencaments de la doble cadena de DNA que tenen lloc durant l'apoptosi mitjançant la incorporació, per una reacció enzimàtica, de nucleòtids marcats amb fluoresceïna als extrems 3'OH lliures de les cadenes del DNA. En aquest treball, s'ha valorat l'apoptosi en mostres parafinades de còlon provinents de ratolins de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1.

Breument, els talls de còlon inclosos en parafina s'assequen durant 1 hora a 65°C, es desparafinen i es rehidraten. A continuació, es bloqueja la peroxidasa endògena amb H₂O₂ al 3% en aigua Milli Q i es permeabilitzen les cèl·lules amb 20 µg/ml de proteïnasa K en 10 mM Tris-HCl a pH 7,4-8 durant 30 minuts a 37°C. Tot seguit, els talls es renten amb PBS i s'incuben a les fosques amb la barreja de TUNEL durant 1 hora, en un cambra humida, i a 37°C. La mix de TUNEL conté l'enzim TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) i els nucleòtids marcats amb fluoresceïna. Transcorregut aquest temps, les mostres es tornen a netejar amb PBS i s'incuben durant 30 minuts amb l'anticòs anti-fluoresceïna, també a 37°C i en un cambra humida. Finalment, es renten de nou amb PBS i es rebel·la la tinció amb DAB.

Per a la quantificació, es prenen fotografies de 5 camps representatius de cada animal i es calcula l'apoptosi cel·lular com el percentatge de nuclis positius per TUNEL respecte al número total de nuclis a cada camp. S'avaluen entre 2.000-3.000 nuclis per animal. Les imatges de la tinció es prenen amb el microscopi DMD 108 (Leica) i es quantifiquen manualment amb el programa *Image J*.

4. Tècniques de bioquímica i biologia molecular

4.1 PCR a temps real quantitativa: RT-PCR

4.1.1 Extracció de RNA

En aquest treball, s'han realitzat extraccions de RNA a partir de cultius cel·lulars tridimensionals que es troben creixent sobre un llit de Matrigel®.

L'extracció del RNA es realitza amb el kit comercial *RNAeasy Total RNA kit* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. A més, s'hi acobla també una digestió amb DNAsa I, que permet eliminar el DNA genòmic contaminant que pugui restar a la mostra. Els extractes de RNA es quantifiquen amb el NanoDrop® (ND-1000 UV/Vis Spectofotometer, Nanodrop Technologies) i es guarden congelats a -80°C.

4.1.2 Síntesi de cDNA

A partir del RNA extret en el pas anterior, es pot sintetitzar, mitjançant la reacció de la transcripció inversa o retrotranscripció (RT), el cDNA. En primer lloc, cal sotmetre 500 ng del RNA a 90°C durant 2 minuts, per tal de desfer possibles dímers o bucles que s'hagin generat en la seva estructura. Tot seguit, es duu a terme la reacció de síntesi de cDNA amb l'enzim retrotranscriptasa del kit Taqman® (Applied Biosystems), i seguint les instruccions del fabricant. Les condicions de la reacció de retrotranscripció són: 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts a 95°C. Un cop sintetitzat, el cDNA es pot guardar a -20°C fins al moment del seu ús, o es pot emprar directament per a la tècnica de la PCR a temps real (RT-PCR).

4.1.3 PCR a temps real (RT-qPCR)

La tècnica de PCR a temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom que el termociclador CFX96™ (BioRad) llegeix i quantifica. El programa que s'utilitza comença per 10 minuts a 95°C i després, consta de 40 cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Les sondes emprades s'adquireixen a Applied Biosystems i es detallen a la taula 8. Com a control endogen d'expressió s'empra β -glucuronidasa (GusB).

Gen	Espècie	Nº de catàleg
GusB	Mouse	Mm00446957_m1
Ccnd1	Mouse	Mm00432359_m1
Ccnd2	Mouse	Mm00438070_m1
Ccnd3	Mouse	Mm01612362_m1

Taula 8: Sondes emprades per a l'anàlisi per RT-PCR obtingudes a Applied Biosystems.

Els resultats s'obtenen en forma de nombre de Ct (*cycle threshold*), que és el cicle de PCR en què comença el creixement exponencial del producte de la PCR, i per tant, de la síntesi de la mostra analitzada. Així, com més gran és el valor de Ct obtingut, menor és el nivell d'expressió del gen estudiat. La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

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

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

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

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

4.2 Immunodetecció de proteïnes

4.2.1 Western blot

4.2.1.1 *Extracció de proteïna total en SDS*

En aquest treball, s'han realitzat extraccions proteiques a partir de cultius cel·lulars creixent en placa i de teixits procedents de ratolí.

És important realitzar l'extracció proteica de forma ràpida i eficient, per evitar l'alteració i la degradació de la mostra, de manera que reflecteixi l'estat fisiològic amb la major fidelitat possible.

Pel que fa als cultius cel·lulars, després de cada tractament, les cèl·lules de l'experiment en qüestió es renten amb PBS fred, i a continuació, es recullen en el tampó d'extracció proteica. Pel que fa als teixits procedents de ratolí, en primer lloc, se sacrifica l'animal i s'extreuen els teixits d'interès. Es renten amb PBS, es tallen en diversos fragments i es congelen ràpidament amb nitrogen líquid. Un cop congelats, es poden guardar a -80°C fins al moment del seu ús o processar-los directament. Per a l'extracció proteica, es talla un petit fragment de 4 mm de cada mostra de teixit congelat, i es posa en 50 μl d'urea 5M amb perles de vidre (Sigma-Aldrich). A continuació, es disgrega la mostra emprant el disruptor FastPrep FP120 (Thermo Savant) durant 45 segons a intensitat 5 i tot seguit, es bull durant 5 minuts a 95°C . Posteriorment, s'afegeixen 75 μl de tampó d'extracció proteica, es torna a bullir i se centrifuga 5 minuts a 7.000 rpm. Així, el sobrenedant, descartant el volum d'urea afegit, és el nostre extracte proteic.

El tampó d'extracció proteica, emprat tant per línies cel·lulars com per teixits, és una solució de lisi desnaturalitzant que conté 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) i 2% de SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Sigma-Aldrich). Aquest tampó permet dur a terme una extracció eficient perquè trenca les interaccions entre les proteïnes i permet l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més, el detergent SDS desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims presents a la mostra, incloses fosfatases i proteases, que podrien danyar l'extracte.

Finalment, tant en el cas d'extractes proteics procedents de cultius cel·lulars com de teixits, se soniquen les mostres abans de quantificar-les.

4.2.1.2 Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry

Donat que el número de cèl·lules, la quantitat de teixit de cada condició i la eficiència de l'extracció proteica poden variar entre una mostra i una altra, és important quantificar la quantitat de proteïna present a cadascuna d'elles per tal de facilitar la posterior interpretació dels resultats. Si la quantitat de proteïna carregada en el gel és diferent entre condicions serà impossible extreure conclusions fiables dels nostres resultats, ja que no es podrà discernir si les diferències observades es deuen al tractament estudiat o a l'efecte de la càrrega. Per aquest motiu, s'utilitza el mètode de Lowry per a determinar la quantitat de proteïna total present a cada mostra, emprant els reactius comercialitzats per Bio-Rad, i comparant amb una recta patró de concentració proteica de BSA (albúmina sèrica bovina) coneguda. Així, breument, en una placa M96, en primer lloc, s'afegeixen 5 μl de cadascuna de les diferents mostres que constitueixen la nostra recta patró i 3 μl de cada llistat experimental, sempre per duplicat. Tot seguit, es barregen els reactius A i S en proporció 50:1, i s'afegeixen 25 μl d'aquesta

Materials i mètodes

barreja a cadascun dels pous, on prèviament hi havíem afegit mostra o recta patró. A continuació, s'afegeixen 200 µl del substrat fluorogènic (reactiu B), i s'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Transcorregut aquest temps, es llegeix l'absorbància de la placa a 595 nm. Els valors d'absorbància obtinguts per a les mostres s'extrapolen als de la recta patró, determinant així, la concentració proteica de cadascuna de les mostres.

4.2.1.3 Electroforesi en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Un cop els extractes proteics s'han obtingut i quantificat, les mostres es preparen agafant la mateixa quantitat de proteïna per a les diferents condicions que es volen comparar i afegint tampó de càrrega 5x (10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM β-mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8 i blau de bromofenol). A més, es porten totes a un mateix volum amb el mateix tampó de lisi i es bullen 5 minuts a 95°C per acabar de desnaturalitzar les proteïnes. D'aquesta manera, les mostres ja estan llestes per dur a terme la separació proteica per electroforesi en gels de poliactilamida amb SDS. Aquests gels són desnaturalitzants i permeten la separació de les diferents proteïnes de la mostra en funció del seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (BioRad), que conté 39% d'acrilamida i un 1% de bis-acrilamida. La polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) com a iniciador de la reacció i persulfat d'amoni (Sigma-Aldrich) al 0,05 % com a catalitzador.

En aquest treball, s'han emprat gels discontinus, formats bàsicament per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior o gel apilador es carreguen les mostres, i serveix per concentrar el front de proteïnes de manera que totes entrin a la vegada al gel separador. Es troba constituït per un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara en tampó 125 µM Tris-HCl a pH 6,8. Per l'altra banda, el gel separador és on realment se separen les proteïnes segons el seu pes molecular. Es prepara en tampó 375 µM Tris-HCl a pH 8,8, i el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que es volen detectar, oscil·lant entre el 6 i el 15%.

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

4.2.1.4 Transferència de proteïnes

Després de la separació de les proteïnes en el gel, es transfereixen a una membrana de PDVF (Immobilon-P, Millipore). El mètode emprat per la transferència és de nou el sistema MiniProtean® de BioRad, on es forma un sandvitx amb el gel, la membrana, dos papers Watman i dues espongetes. El sandvitx es col·loca en una solució de transferència (25 mM Tris 25 i 192 mM glicina a pH=8,3) amb un bloc de gel que evita els sobreescalfaments, i es deixen transferir les proteïnes del gel a la membrana durant 1 hora a un voltatge constant de 70V.

En acabar la transferència i per tal d'evitar possibles unions inespecífiques, la membrana es bloqueja amb llet en pols descremada al 5% en tampó TBS-T (20 mM Tris a pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,1% de Tween 20) durant una hora a temperatura ambient.

4.2.1.5 Immunodetecció de proteïnes

Un cop bloquejada la membrana, es fan tres rentats de 15 minuts amb TBS-T i s'incuba la membrana amb l'anticòs primari d'interès. Els anticossos i les dilucions emprades en aquest treball es detallen a la taula 9. La dilució de l'anticòs primari es prepara en una solució de TBS-T amb 3% de BSA i 0,02% d'Azida sòdica, que evita contaminacions bacterianes i permet reutilitzar l'anticòs. Generalment, la incubació s'acostuma a realitzar durant tota la nit a 4°C, encara que en alguns casos i en funció de l'anticòs, es pot dur a terme durant 1 hora a temperatura ambient.

A continuació, es recupera l'anticòs primari i es guarda a 4°C fins al seu proper ús. Es fan tres rentats a la membrana de 15 minuts cadascun amb TBS-T, i s'incuba amb la dilució adequada d'anticòs secundari (taula 9) en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment, la membrana es torna a rentar tres vegades més amb TBS-T.

Arribats en aquest punt, es pot procedir a la visualització de la immunodetecció proteica. Per això, l'anticòs secundari es troba conjugat a peroxidasa, que permet la detecció de la senyal. En aquest sentit, la membrana s'incuba durant 3 minuts amb el reactiu comercial Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Aquest reactiu associa la catàlisi de l'aigua oxigenada a la oxidació de luminol, produint un increment de la quimioluminiscència. Finalment, la membrana es visualitza amb el sistema de documentació *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad) i s'analitza amb el programa informàtic associat, *Image Lab*.

Materials i mètodes

Antigen	Dilució	Proveïdor	Referència
Ciclina D1	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology	sc:20044
Ciclina D2	1:250	ThermoFisher Scientific	AHF0112
Ciclina E	1:1.000	Cell Signaling technology	4129S
CDK4	1:250	Abcam	ab3112
CDK6	1:250	Santa Cruz Biotechnology	sc-53638
CDK2	1:250	Santa Cruz Biotechnology	sc-748
p27	1:1.000	BD Biosciences Pharmigen	610241
p16	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-1661
p-RB (Ser780)	1:1000	BD Biosciences	558385
p-S6K (Thr389)	1:1.000	Cell Signaling technology	9205
p-AKT (Ser473)	1:1.000	Cell Signaling technology	4060
AKT total	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1618
PTEN	1:1.000	Cell Signaling technology	9188
B-RAF	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-5284
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	1:1.000	Cell Signaling technology	9251
JNK total	1:1.000	Cell Signaling technology	9258
p-ERK 1/2 (Thr202/204)	1:1.000	Biolegend	675502
pan-ERK	1:5.000	BD Biosciences Pharmigen	610623
p-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	Biolegend	903501

Taula 9: Anticossos primaris i secundaris emprats per a la detecció proteica mitjançant la tècnica del Western blot.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Referència
p38 total	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-81621
p-p53 (Ser15)	1:1.000	Cell Signaling technology	9284
p53	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
p-eIF4E (Ser209)	1:1.000	Upstate	07-823
eIF4E	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-9776
MLH-1	1:1.000	Abcam	ab92312
p-H2AX (Ser139)	1:1.000	Upstate	05-636
α-Tubulina	1:20.000	Sigma-Aldrich	T9026
β-Actina	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616
GAPDH	1:20.000	Abcam	8245
Conill IgG-HRP	1:10.000	Jackson	111-035-003
Ratolí IgG-HRP	1:10.000	Jackson	115-035-003
Cabra IgG-HRP	1:10.000	Jackson	705-035-147

Taula 9. Continuació: Anticossos primaris i secundaris emprats per a la detecció proteica mitjançant la tècnica del Western blot.

RESULTATS

1. Estudi de la implicació del factor de transcripció E2F-1 en processos tumorals induïts per la pèrdua de PTEN

1.1 Generació del model murí Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1

El factor de transcripció E2F-1 és un proteïna intrigant pel que fa al seu rol en tumorigènesi. Diversos treballs han analitzat la seva funció en processos tumorals induïts per mutacions concretes i els resultats obtinguts rebel·len la seva activitat com a promotor i supressor de tumors en funció del tipus i context cel·lular (Fujiwara et al., 2011; Yamasaki et al., 1998). Per aquest motiu, amb aquests antecedents, vam voler estudiar el paper d'E2F-1 en la tumorigènesi induïda per la pèrdua de PTEN.

Així, vam generar un model murí a partir del creuament del nostre model *knock-out* de *Pten* induïble per Tamoxifè (Cre:ER^TPTEN^{f/f}) amb el *knock-out* d'*E2f-1*. Tal es com es pot veure en la figura 30, es va seguir un protocol de tres creuaments, emprant com a fundadors els ratolins amb genotip Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} i E2F-1^{-/-}. D'aquesta manera, es van obtenir ratolins amb el genotip desitjat Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}, i el corresponent control, Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}. A més, els ratolins amb el genotip Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} van ser utilitzats com a controls de la manca exclusiva d'E2F-1. En aquest punt, és important remarcar que tots els controls emprats en aquest treball provenen de la mateixa colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1, per tal d'assegurar que tots els animals analitzats presenten el mateix fons genètic. Així, és possible evitar errors a l'hora d'avaluar el fenotip dels animals i tenir la certesa que els efectes observats es deuen al genotip d'estudi i no, a diferents fons genètics.

Com que estàvem interessats en estudiar la implicació d'E2F-1 en els tumors deficients en PTEN, la colònia es va mantenir de manera que la deleció de *Pten* fos bial·lèlica en tots els animals que expressaven la recombinasa, i només variés el grau d'ablació d'*E2f-1*.

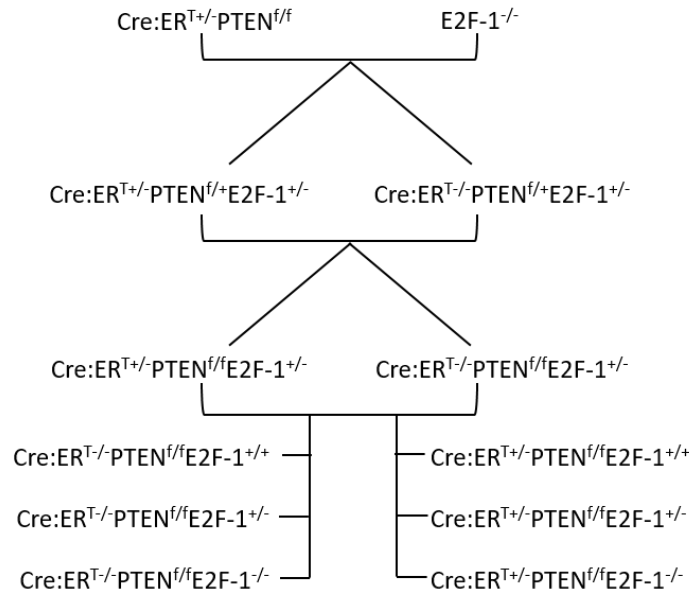


Figura 30: Estratègia de cria per a la generació del model animal Cre:ERTPTEN^{ff}E2F-1.

1.2 Efecte de l'absència d'E2F-1 en les neoplàsies de pròstata i endometri i les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN

Després d'establir la colònia Cre:ERTPTEN^{ff}E2F-1 i un cop obtinguts animals de tots 6 genotips diferents, es va procedir a caracteritzar l'efecte de l'absència d'E2F-1 en les neoplàsies de pròstata i endometri, i en les hiperplàsies de tiroide, originades a conseqüència de la pèrdua de PTEN.

El disseny experimental que es va dur a terme es mostra a la figura 31. Per començar, es va injectar intraperitonealment una única dosi de Tamoxifè, per tal d'induir la deleció de *Pten*, a ratolins mascles i femelles de 5 a 7 setmanes d'edat i de tots 6 genotips possibles. Els animals es van monitoritzar exhaustivament fins que van requerir l'eutanàsia.

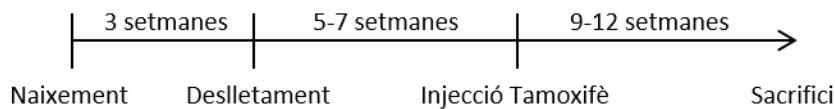


Figura 31: Disseny experimental per a l'anàlisi dels animals de la colònia Cre:ERTPTEN^{ff}E2F-1. Breument, els ratolins de tots els genotips reben una única dosi de Tamoxifè per via intraperitoneal entre les 5-7 setmanes de vida. Els ratolins se sacrifiquen 9-12 setmanes després de la inducció de la deleció de *Pten*.

A diferència de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}, en què els animals se sacrifiquen entre 6 i 8 setmanes després de la injecció de Tamoxifè, en aquest cas, l'empitjorament de l'estat físic dels ratolins es va observar més tard en el temps, amb independència del genotip. Per aquest motiu, els animals es van sacrificar entre 9 i 12 setmanes després de la inducció de la deleció de *Pten*. S'ha demostrat que el fons genètic dels ratolins afecta al desenvolupament dels tumors induïts per la pèrdua de PTEN (Freeman et al., 2006). Per aquest motiu, és important tenir present que poden existir diferències entre les dues colònies de ratolins, més enllà de les causades pròpiament pel diferent genotip. Així doncs, per exemple, els ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+} que s'empren com a controls de la pèrdua exclusiva de PTEN en les colònies Cre:ER^TPTEN^{f/f} i Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1, respectivament, poden presentar un fenotip diferent, simplement com a conseqüència del fons genètic en què s'ha establert la colònia.

En primer lloc, l'avaluació macroscòpica va permetre determinar que la pèrdua monoal·lèlica o bial·lèlica d'E2F-1 no alterava la mida de les pròstates dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} en comparació amb les dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}. A més, tal com es pot observar a la figura 32, l'anàlisi pels patòlegs va concloure que no existien diferències histològiques significatives entre els animals que expressaven la Cre:ER^T recombinasa, amb independència de l'expressió o absència d'E2F-1. La gran majoria dels ratolins van presentar hgPIN.

Resultats

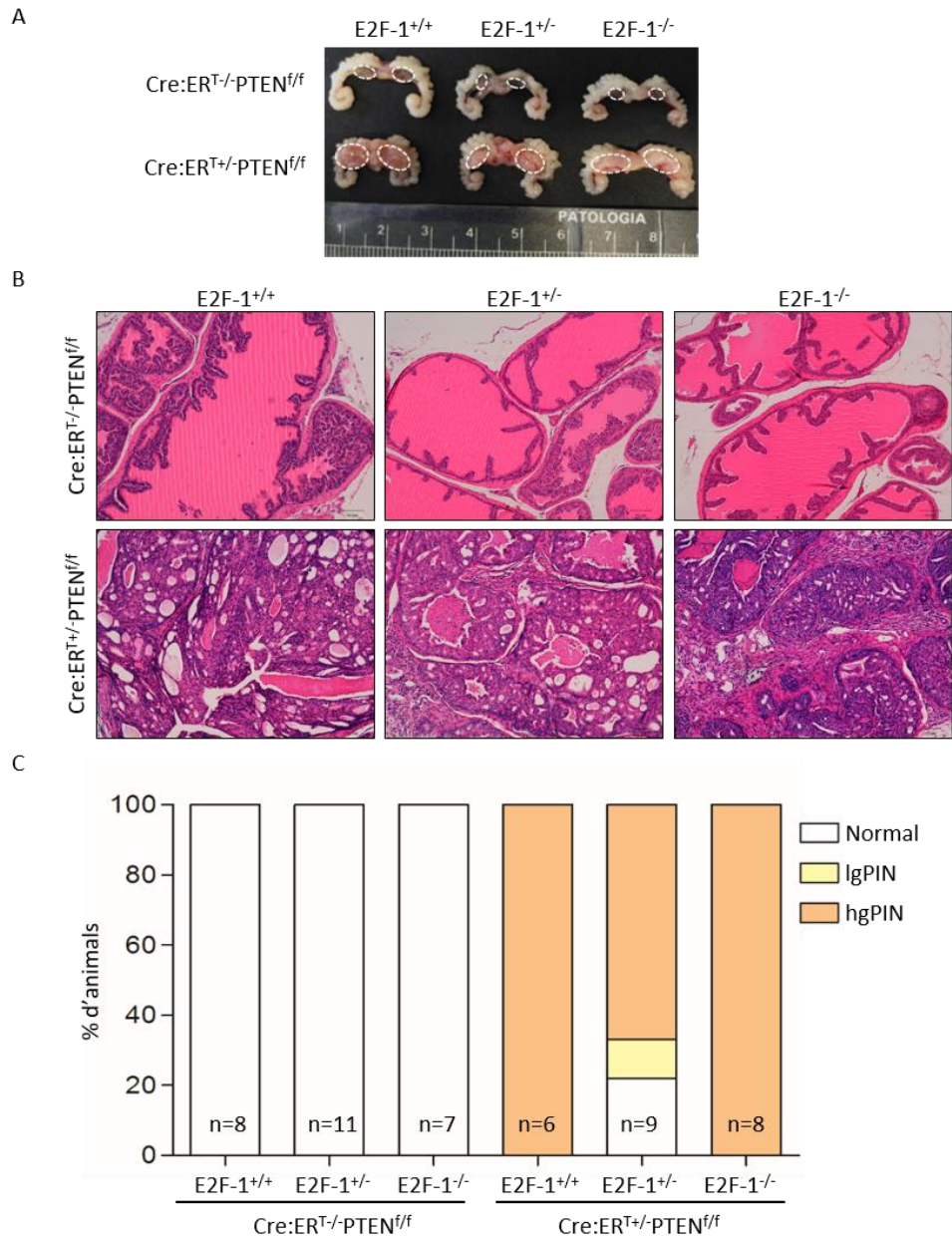


Figura 32: E2F-1 és dispensable en les neoplàsies prostàtiques induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Comparació entre pròstates *wild-type* i *knock-out* per a E2F-1 a les 9-12 setmanes després de la deleció de *Pten*. (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E a les pròstates de ratolins Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/-}, Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}, Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/-} i Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} (10x). (C) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat. IgPIN significa *low-grade prostatic intraepithelial neoplasia* i hgPIN, *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*.

A continuació, es va procedir a l'anàlisi histològic dels endometris. En aquest cas, es va observar que la manca d'E2F-1 conduïa a un lleuger increment de la incidència i la progressió dels tumors endometrials deficients per PTEN. No obstant, les diferències histològiques observades entre els genotips experimentals no van ser estadísticament significatives. Els ratolins femella Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} desenvolupaven hiperplàsia complexa o EIN independentment de la presència o absència d'E2F-1.

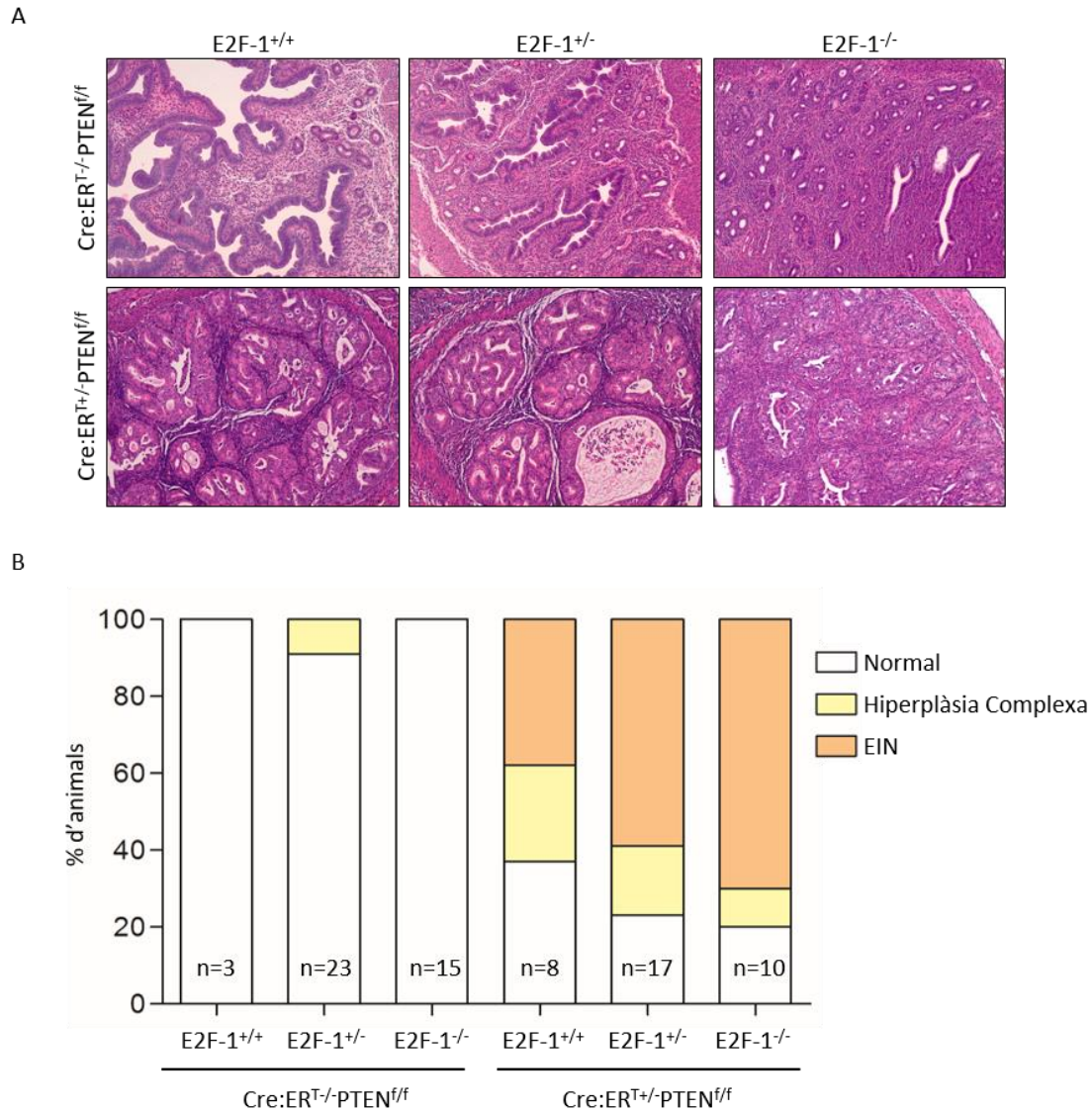


Figura 33: E2F-1 és dispensable en els tumors endometrials induïts per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de l'endometri de ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}, Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}, Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} (10x). (B) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat. EIN significa *endometrial intraepithelial neoplasia*.

Resultats

A més, mitjançant la tinció amb Ki-67, es va demostrar que les lesions presents a l'endometri dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$ presentaven el mateix nivell d'expressió del marcador de proliferació, i que per tant, l'absència d'E2F-1 no exercia cap efecte en la proliferació d'aquests tumors.

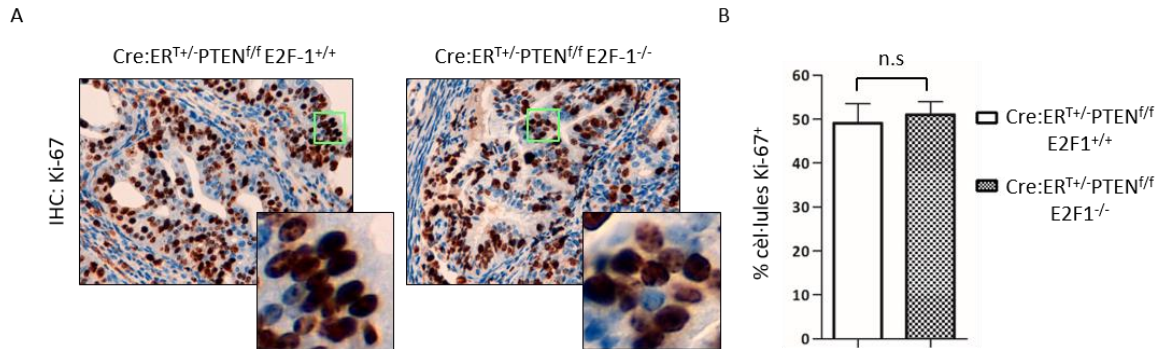


Figura 34: La manca d'E2F-1 no indueix un efecte antiproliferatiu en els tumors endometrials deficients per PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb Ki-67 dels tumors endometrials de ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$ (10x). (B) Quantificació de la tinció de Ki-67. Les dades provenen de n=5 animals per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana \pm s.e.m. No s'observen diferències segons anàlisi t-test.

Per acabar, vam estudiar l'efecte de l'absència d'E2F-1 en les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN. En aquest cas, és important destacar que només un petit percentatge (34%) dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$ van desenvolupar aquesta patologia, mentre que en els ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ de la colònia $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ aquest percentatge és proper al 100%. Sembla clar doncs, que el fons genètic en què es troba establerta la colònia $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1$ juga un paper important a l'hora de disminuir la incidència i alentir la progressió de les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN.

No obstant això, vam voler caracteritzar l'efecte de la manca d'E2F-1 en aquestes hiperplàsies. De nou, i tal com s'observa a la figura 35, no es van detectar diferències macroscòpiques ni histològiques entre els tres genotips experimentals, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$.

És important destacar que la manca exclusiva d'E2F-1 en els animals que conservaven l'expressió de PTEN no donava lloc a l'aparició d'alteracions histològiques en cap dels tres teixits analitzats.

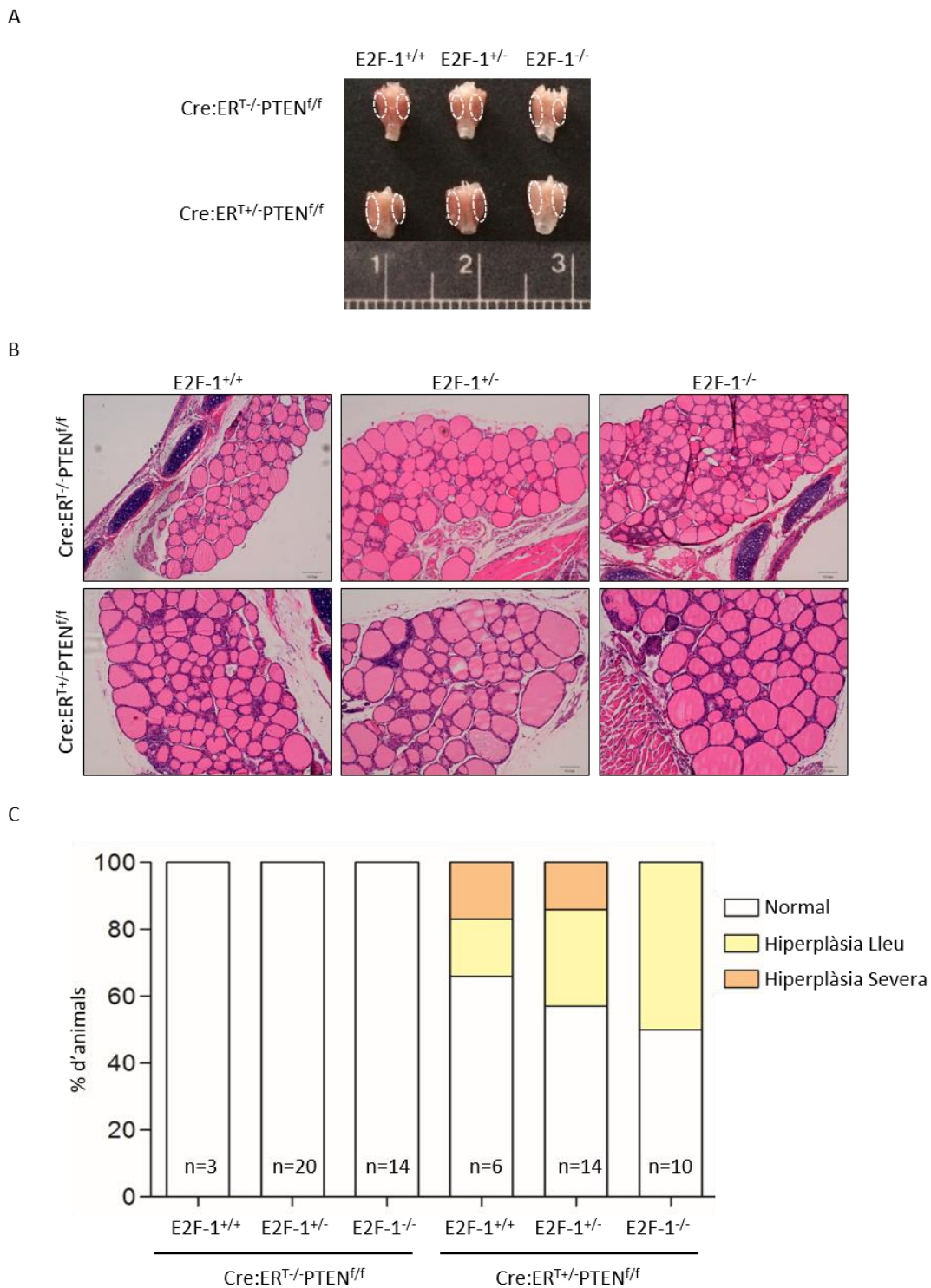


Figura 35: E2F-1 és dispensable en les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Comparació entre tiroides *wild-type* i *knock-out* per a E2F-1 a les 9-12 setmanes després de la deleció de PTEN. (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E a les tiroides de ratolins Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{+/-}, Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{-/-}, Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff/f}E2F-1^{-/-} (10x). (C) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat.

1.3 L'absència d'E2F-1 potencia la carcinogènesi de còlon per la via serrada induïda per la pèrdua PTEN

Un cop analitzats els tres tipus tumorals d'interès habituals, neoplàsia de pròstata i endometri, i hiperplàsia de tiroide, vam procedir a realitzar una avaluació macroscòpica i histològica exhaustiva de la resta d'òrgans dels ratolins de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1, per tal de detectar possibles alteracions.

Així, es van identificar macroscòpicament una sèrie de lesions, fàcilment quantificables, als còlons dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}. Està àmpliament acceptat que *PTEN* és un important gen supressor tumoral a còlon i que la seva pèrdua dóna lloc al desenvolupament de càncer colorectal (Di Cristofano et al., 1998; Marsh Durban et al., 2014; Milella et al., 2015; Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998). Per tant, el fet que els ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} desenvolupin aquestes lesions concorda perfectament amb el que s'ha descrit prèviament. Sembla que de nou el fons genètic de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1 dóna lloc a un fenotip tumoral diferent en els ratolins que només són deficientes per a *PTEN* en comparació amb la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}.

Tot seguit, es va voler estudiar l'efecte que exercia l'absència d'E2F-1 sobre aquestes lesions induïdes per la pèrdua de *PTEN* a còlon. Macroscòpicament, es va observar que els còlons dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} presentaven un major número de lesions observables en la mateixa longitud de còlon, en comparació amb els animals Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}. A més, es va determinar també que les lesions es localitzaven majoritàriament a la part més proximal del còlon en tots tres genotips analitzats. És important remarcar que en cap cas es van identificar lesions d'aquest tipus en els animals amb genotip Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}, que conserven l'expressió de *PTEN*.

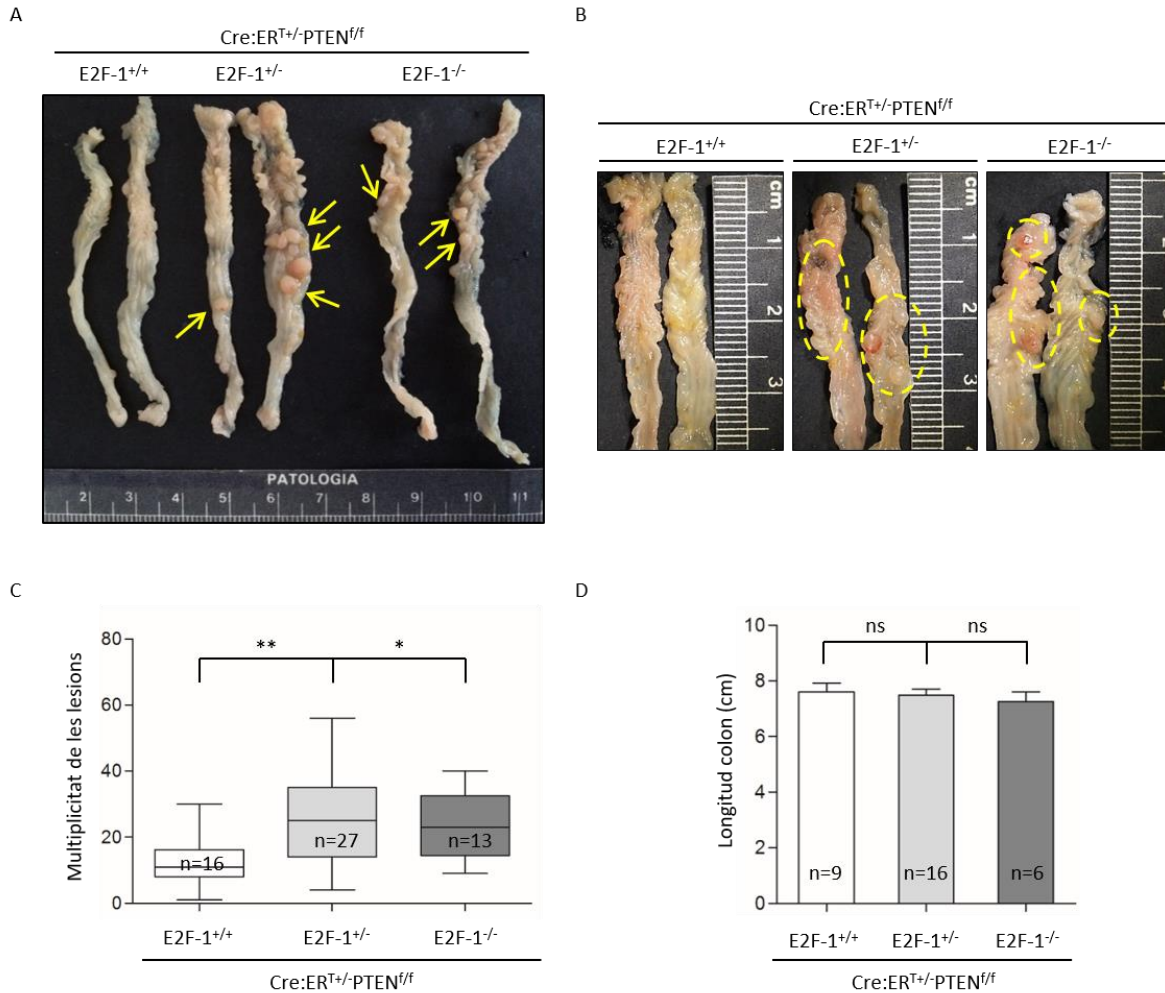


Figura 36: La pèrdua monoal·lèlica i bial·lèlica d'E2F-1 incrementa el número de les lesions observades al còlon dels ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} en comparació amb els ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}. (A) Imatges macroscòpiques dels còlons de ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}. Les fletxes remarquen les lesions observades. (B) Imatges macroscòpiques de la zona proximal dels còlons de ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}. Els cercles gros remarquen les lesions observades. (C) Quantificació del número de lesions observades als còlons de ratolins de tots tres genotips. *P<0.05 **P<0.01, mitjançant anàlisi one-way ANOVA, seguit del test de Tukey per comparacions múltiples. (D) Quantificació de la longitud dels còlons de tots tres genotips. No s'observen diferències segons anàlisi one-way ANOVA, seguit del test de Tukey per comparacions múltiples.

Resultats

A més, tal com es pot observar en la figura 37, els ratolins $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/-}}$ i $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{-/-}}$ no només presentaven un increment en el número de lesions, sinó que aquestes eren també més grans en comparació amb les dels animals $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/+}}$. Fins i tot, en algunes ocasions aquestes lesions eren tan grans que causaven l'obstrucció de l'intestí gros.

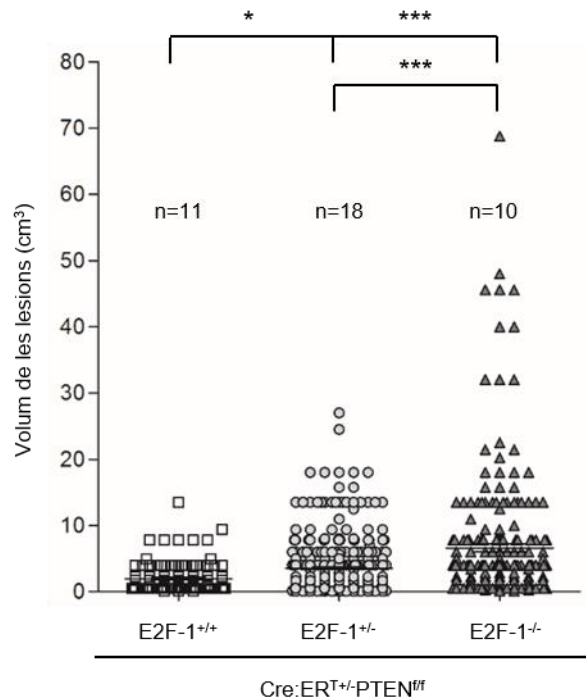


Figura 37: La manca d'E2F-1 incrementa la mida de les lesions observades a còlon. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$, mitjançant anàlisi one-way ANOVA, seguit del test de Tukey per comparacions múltiples.

A continuació, després de l'avaluació macroscòpica, es van incloure en parafina els còlons sencers dels ratolins, des del recte fins al cec, per al seu posterior anàlisi. Tal com s'observa a la figura 38, el 13% dels ratolins $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/+}}$ van ser diagnosticats d'adenocarcinoma intraepitelial, el 25%, d'adenoma, i un 6%, d'adenoma amb patró de serració. No obstant, la gran majoria dels animals d'aquest genotip, concretament un 56%, presentaven una histologia completament normal. Per contra, en el cas dels ratolins $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/-}}$ només un 5% va mantenir una histologia normal, mentre que la resta d'animals van ser diagnosticats d'adenoma (55%), adenoma serrat (35%) i adenocarcinoma intraepitelial (5%). Per acabar, cap animal $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{-/-}}$ va presentar histologia normal mentre que un 42% dels ratolins van desenvolupar lesions diagnosticades com adenocarcinomes intramucosos. A més, un 25% dels animals van presentar adenomes, i un 33% més, adenomes que encara conservaven el patró serrat. A la figura 39 es mostren H-E d'un adenoma serrat i d'un adenocarcinoma intramucosós, diagnosticats en animals $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{-/-}}$.

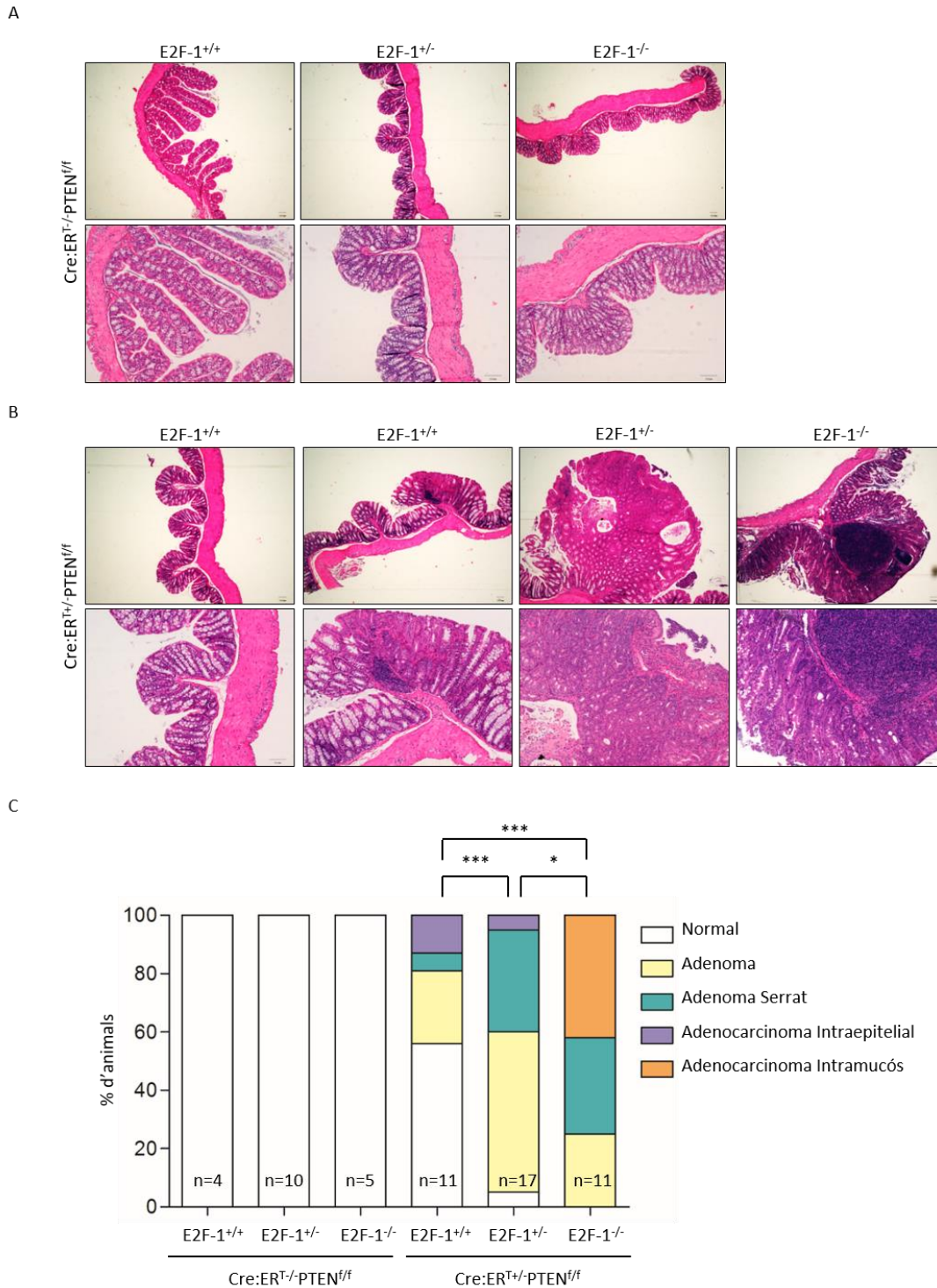


Figura 38: La pèrdua monoal·lèlica i bial·lèlica d'E2F-1 incrementa la incidència dels adenocarcinomes de còlon induïts per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de còlon de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} (4x i 10x). (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E de còlon de ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} (4x i 10x). (C) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. *P<0.05 ***P<0.001, segons el test exacte de Fisher amb estandarditzats corregits.

Resultats

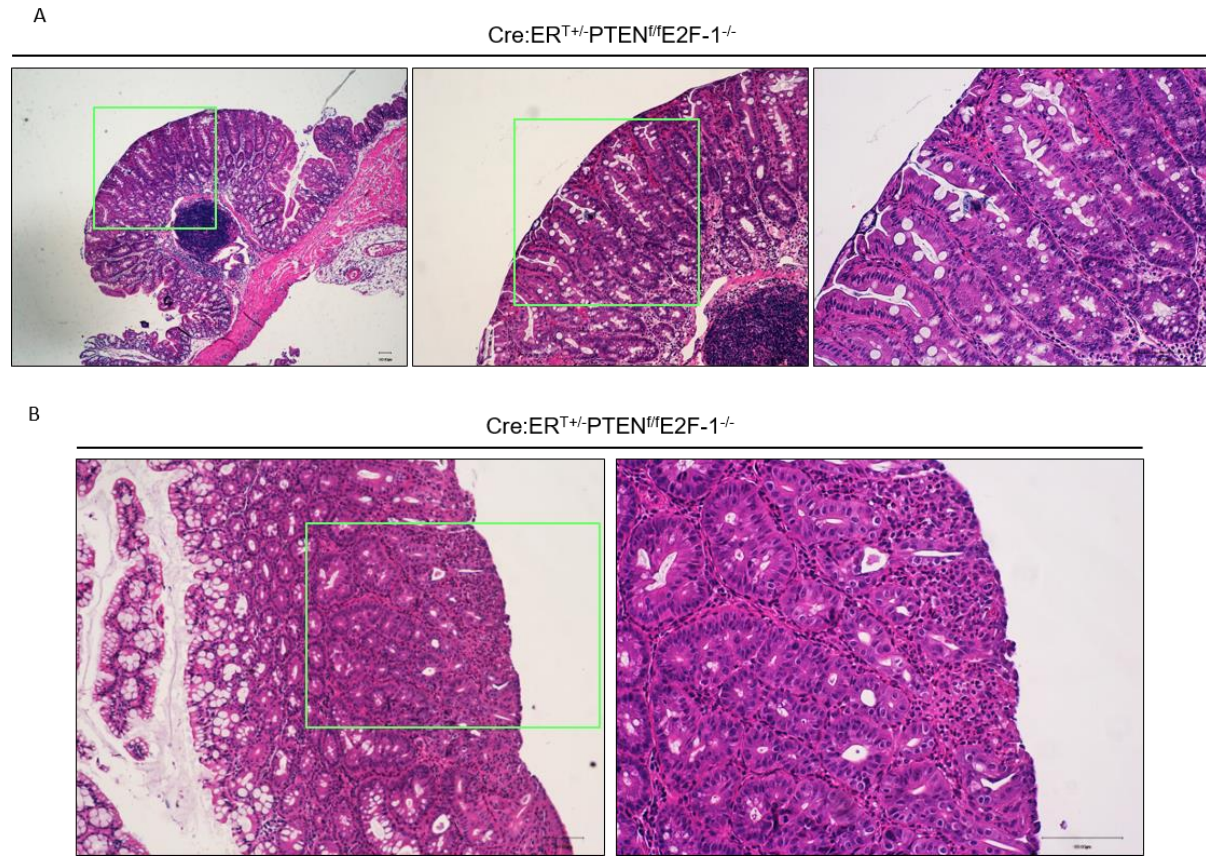


Figura 39: Exemplificació de les lesions desenvolupades en els ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de còlon de ratolí Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} que mostren un adenoma amb patró de serració (esquerra 4x, centre 10x i dreta 20x). (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E de còlon de ratolí Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} que mostren un adenocarcinoma intramucós (esquerra 10x i dreta 20x).

És important remarcar que, coincidint amb l'avaluació macroscòpica, no es va diagnosticar cap lesió al còlon dels ratolins amb genotip Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} ja que presentaven una histologia completament normal. Gràcies a la immunohistoquímica de PTEN es va comprovar que aquests animals conservaven l'expressió de PTEN sense canvis entre genotips. A més, aquest resultat es va corroborar amb un Western blot de llistats totals de còlon de ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff}E2F-1^{+/+} i Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}, que va permetre concloure que la manca d'E2F-1 no alterava l'expressió de PTEN. En canvi, en tots els ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} s'observava la pèrdua de l'expressió del gen supressor tumoral en forma de mosaic, sense diferències entre genotips.

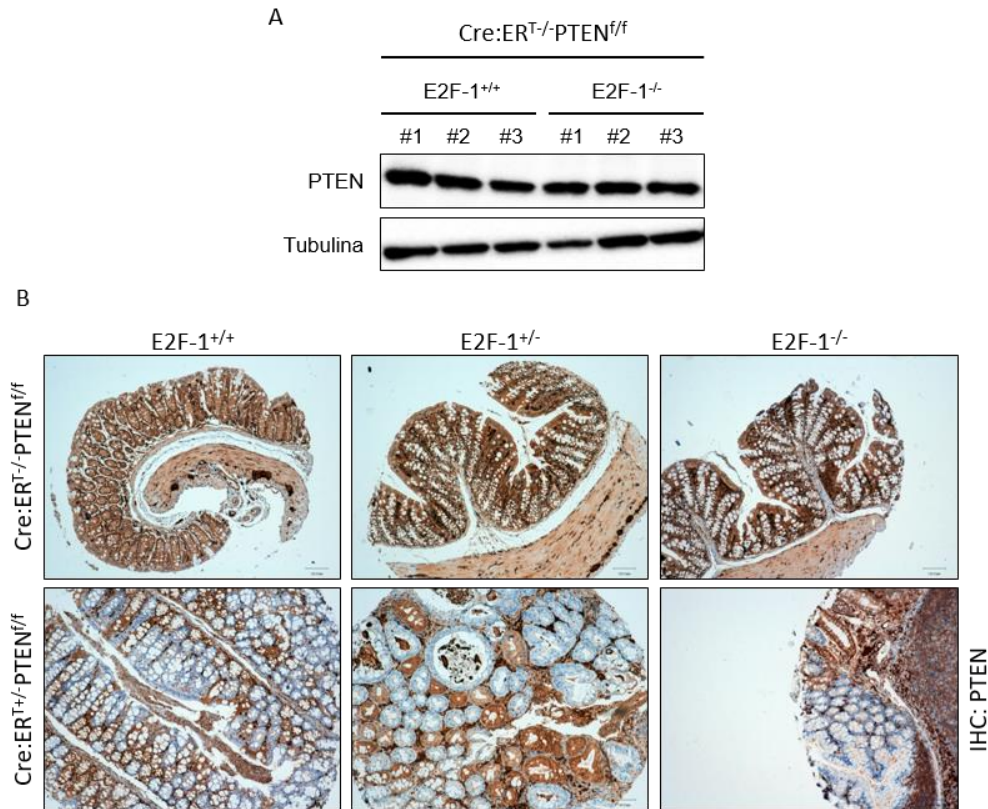


Figura 40: La pèrdua de PTEN és imprescindible per al desenvolupament de les lesions a còlon i la manca d'E2F-1 no n'altera l'expressió. (A) Avaluació de l'expressió de PTEN per Western blot a partir de llisats de còlon de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+} i Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}. La tubulina s'empra com a control de càrrega. (B) Imatges representatives de la immunohistoquímica de PTEN al còlon dels ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/-}, Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}, Cre:ER^{T+/+}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/+}PTEN^{ff}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/+}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-} (10x).

Per acabar amb la caracterització descriptiva d'aquestes alteracions, es van dur a terme colonoscòpies a ratolins de cadascun dels sis genotips. Les colonoscòpies es van realitzar a diferents punts temporals després de la injecció de Tamoxifè, per tal de monitoritzar l'aparició i el progrés de les lesions. De nou, no es van identificar canvis en els còlons dels ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}, tal com ja s'havia comprovat prèviament. Pel contrari, entre les 6 i les 9 setmanes després de la inducció de la deleció de PTEN, es van poder detectar lesions en els animals Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+} i Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{-/-}, que van anar creixent amb el temps. Una mica més tard, aquestes lesions també van observar-se en els animals Cre:ER^{T-/-}PTEN^{ff}E2F-1^{+/+}. No obstant, tal com s'observa a la figura 41, només vam ser capaços de detectar i monitoritzar aquelles lesions que es trobaven a la part més distal del còlon, propera al recte. Com a conseqüència de la rigidesa de l'endoscopi va resultar tècnicament impossible arribar a la part proximal del mateix, que és concretament la zona on s'acumulen preferentment les lesions.

Resultats

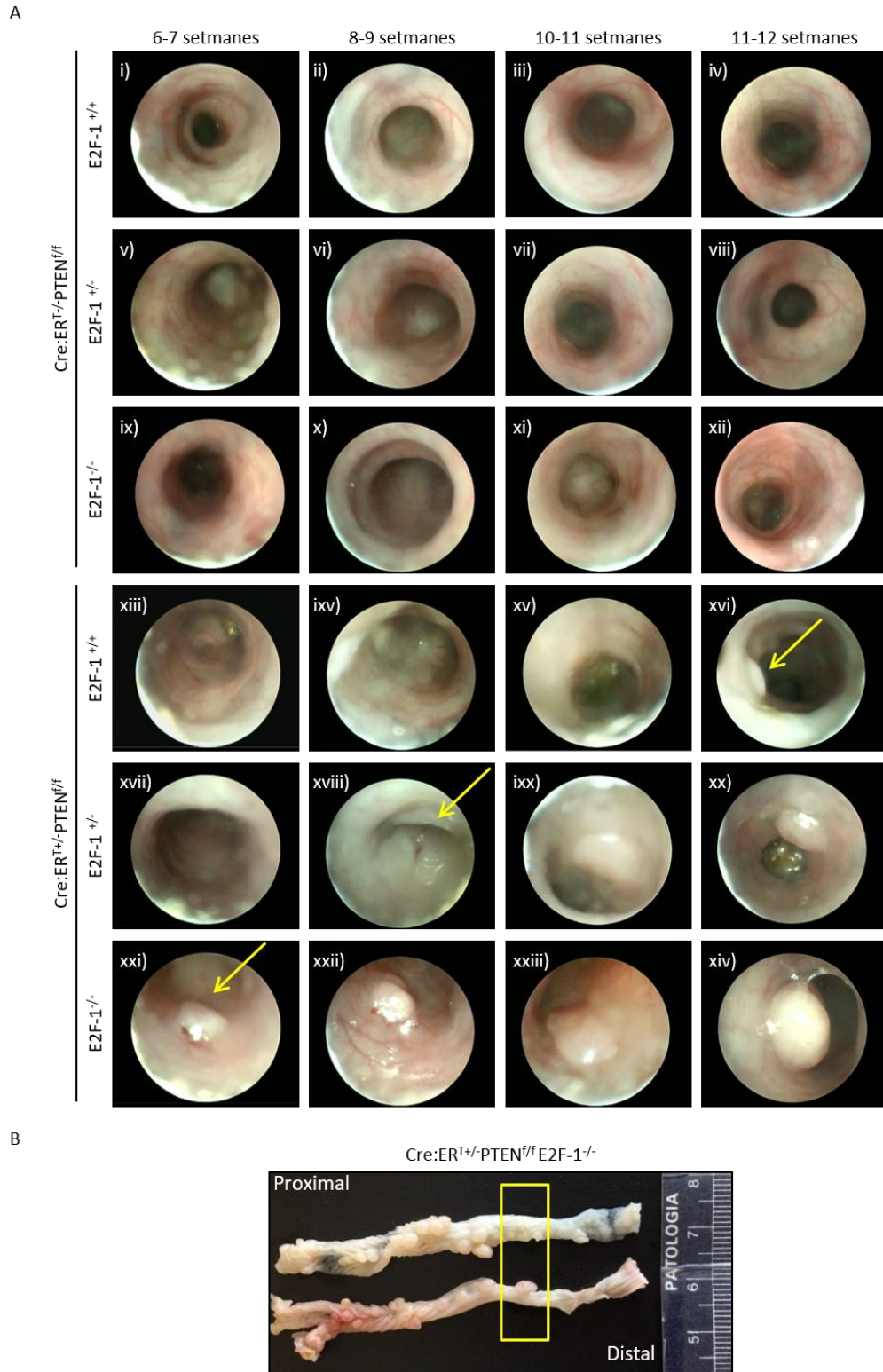


Figura 41: Imatges endoscòpiques del ratolins de tots sis genotips. (A) Els ratolins es van sotmetre a anàlisi endoscòpic a diferents punts temporals després de l'administració de Tamoxifè. Les fletxes grogues assenyalen el moment de la detecció de les lesions a cada genotip. (B) Imatge macroscòpica de la zona del còlon visible amb l'endoscopi.

En conjunt, aquests resultats permeten concloure que la pèrdua monoal·lèlica i bial·lèlica d'E2F-1 potencia el desenvolupament i la progressió del càncer colorectal induït per la pèrdua de PTEN. A més, l'absència exclusiva d'E2F-1, que no altera l'expressió de PTEN, no dona lloc al desenvolupament de lesions pre-malignes ni malignes a còlon.

Finalment, és important remarcar que aquestes lesions desenvolupades per la pèrdua de PTEN i potenciades per la manca d'E2F-1 només s'observen a còlon i en cap cas, per a cap dels 6 genotips analitzats, a intestí prim.

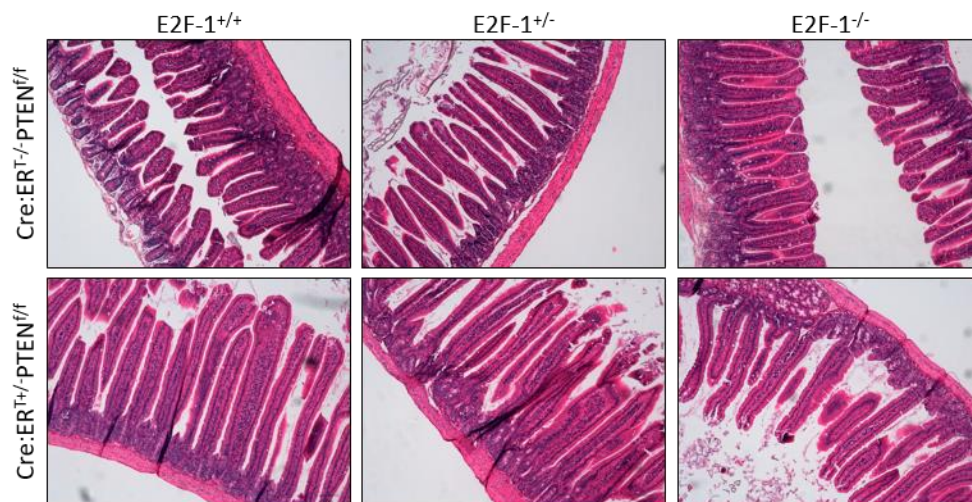


Figura 42: La pèrdua de PTEN, amb independència de l'expressió d'E2F-1, no condueix al desenvolupament de lesions tumorals a l'intestí prim dels ratolins. Imatges representatives de la tinció amb H-E a l'intestí prim de ratolins Cre:ER^{T-/}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T-/}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}, Cre:ER^{T-/}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}, Cre:ER^{T+/}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}, Cre:ER^{T+/}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} (10x).

1.4 La pèrdua de PTEN condueix al desenvolupament de tumors de còlon de manera independent a la senyalització per WNT

Un cop finalitzat l'anàlisi histopatològic, vam voler analitzar si les lesions diagnosticades als còlons dels ratolins de la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}E2F-1 presentaven una activació aberrant de la senyalització per WNT, ja que la majoria dels adenomes colorectals humans presenten mutacions en *APC* i la pèrdua d'aquest gen es considera un esdeveniment iniciador de la tumorigènesi per la via canònica. Donat que aquestes mutacions resulten en la translocació a nucli de β -Catenina, vam voler determinar per immunohistoquímica el seu patró d'expressió.

Tal com es mostra a la figura 43, l'anàlisi immunohistoquímic va evidenciar que la pèrdua de PTEN, amb independència de l'expressió d'E2F-1, no va alterar en cap cas la localització de β -Catenina. En

Resultats

els ratolins deficients per PTEN, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}$, la immunoexpressió de β -Catenina conservava la seva localització citoplasmàtica i de membrana en totes les condicions. A més, pel que fa als animals $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$, $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}$ i $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$, la manca d'expressió del factor de transcripció E2F-1 no va causar tampoc la translocació nuclear de la β -Catenina.

Així doncs, aquest patró de localització de la β -Catenina permet descartar que la via WNT es trobi implicada en la tumorigènesi desencadenada per la pèrdua de PTEN.

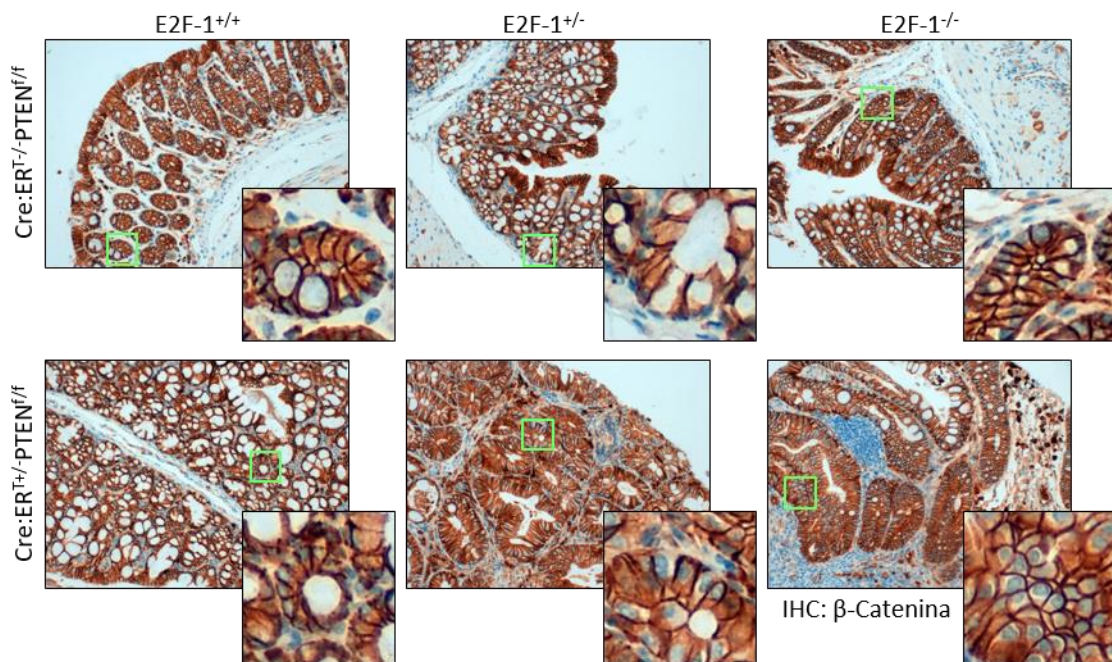


Figura 43: Els tumors de còlon deficients per PTEN no presenten activació aberrant de la via WNT. Imatges representatives de la immunohistoquímica de PTEN al còlon dels ratolins de tots sis genotips possibles (10x).

1.5 L'absència d'E2F-1 dóna lloc a una reducció de l'apoptosi en les lesions de còlon deficients per PTEN

A continuació, en un intent per elucidar el mecanisme molecular pel qual el factor de transcripció E2F-1 controla el desenvolupament i el creixement dels tumors de còlon induïts per la pèrdua de PTEN, vam considerar en primer lloc certes evidències prèvies que demostren que E2F-1 es troba específicament involucrat en la regulació de l'apoptosi (Engelmann and Pützer, 2012). Per tal determinar si aquest rol d'E2F-1 era rellevant en el nostre model, vam realitzar un assaig TUNEL en lesions de còlon provinents de ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$. Tal com es mostra a la figura 44 amb els talls histològics, el TUNEL va revelar que l'absència d'E2F-1 causava una

reducció del número de cèl·lules apoptòtiques presents a les lesions de còlon propera al 20% en comparació amb aquelles desenvolupades pels animals $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/+}}$, que conserven per tant, l'expressió del factor de transcripció.

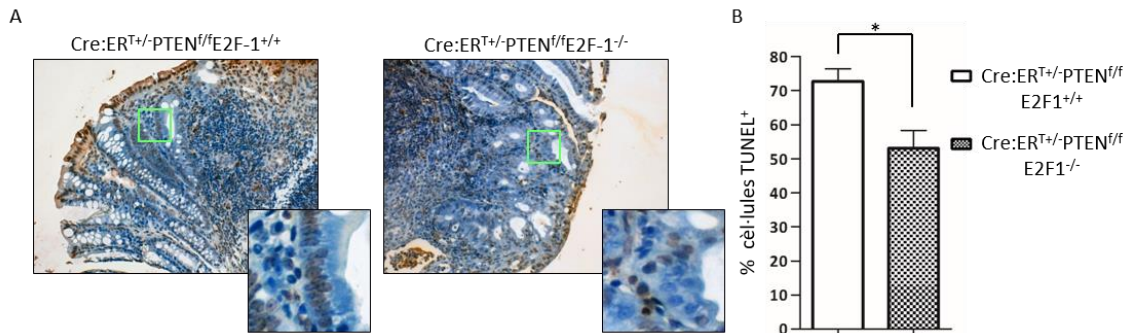


Figura 44: Les lesions de còlon deficientes per E2F-1 presenten una disminució de l'apoptosi. (A) Imatges representatives de l'assaig TUNEL en les lesions de còlon induïdes per la pèrdua de PTEN en ratolins $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/+}}$ i $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{-/-}}$ (20x). (B) Quantificació del TUNEL. Les dades provenen de n=5 animals per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana \pm s.e.m. * $P < 0.05$, segons l'anàlisi t-test.

Així doncs, els nostres resultats suggereixen que la reducció en l'apoptosi observada en els animals deficientes per E2F-1 podria contribuir a la taxa de creixement tumoral a còlon.

1.6 La manca d'E2F-1 provoca una activació exacerbada de les MAPKs i a una acumulació del dany al DNA a les lesions de còlon induïdes per la pèrdua de PTEN

Finalment, vam voler caracteritzar les alteracions moleculars desencadenades per la pèrdua d'E2F-1 que permeten incrementar la incidència i la progressió de les lesions tumorals a còlon induïdes per la deficiència en PTEN. Així, es va analitzar per Western blot l'expressió de diverses proteïnes implicades en diversos processos cel·lulars relacionats amb la tumorigènesi emprant llisats de teixit de còlon tumoral de ratolins $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/+}}$, $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{+/-}}$ i $\text{Cre:ER}^{\text{T+/-}}\text{PTEN}^{\text{f/f}}\text{E2F-1}^{\text{-/-}}$.

En primer lloc, vam observar que la doble deficiència de PTEN i E2F-1 donava lloc a una hiperactivació de la via RAS-MAPK, que es reflectia amb un increment en la forma fosforilada de JNK, p38 i ERK1/2, sense alterar els nivells de la proteïnes totals, i amb una acumulació de la proteïna B-Raf. A més, en els ratolins deficientes per PTEN que presentaven pèrdua monoal·lèlica o bial·lèlica d'E2F-1 s'observava també un augment de l'expressió de p-p53 (Ser15), p53 i p-H2AX, suggerint en conjunt un increment en el dany al DNA. No obstant, no es van detectar diferències pel que fa a l'expressió de Mlh-1. Finalment, tampoc es van veure variacions en els nivells proteics dels inhibidors de cicle cel·lular p16 i p27, Ciclina D1 ni p-eIF4E.

Resultats

Val la pena destacar que l'animal número 4 dels ratolins amb genotip $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}$ representava un cas excepcional ja que presentava molt poques lesions tumorals al còlon. Aquest fenotip tumoral disminuït podria explicar les diferències moleculars observades entre aquest animal i la resta del seu grup pel que fa a l'expressió de les diferents proteïnes analitzades.

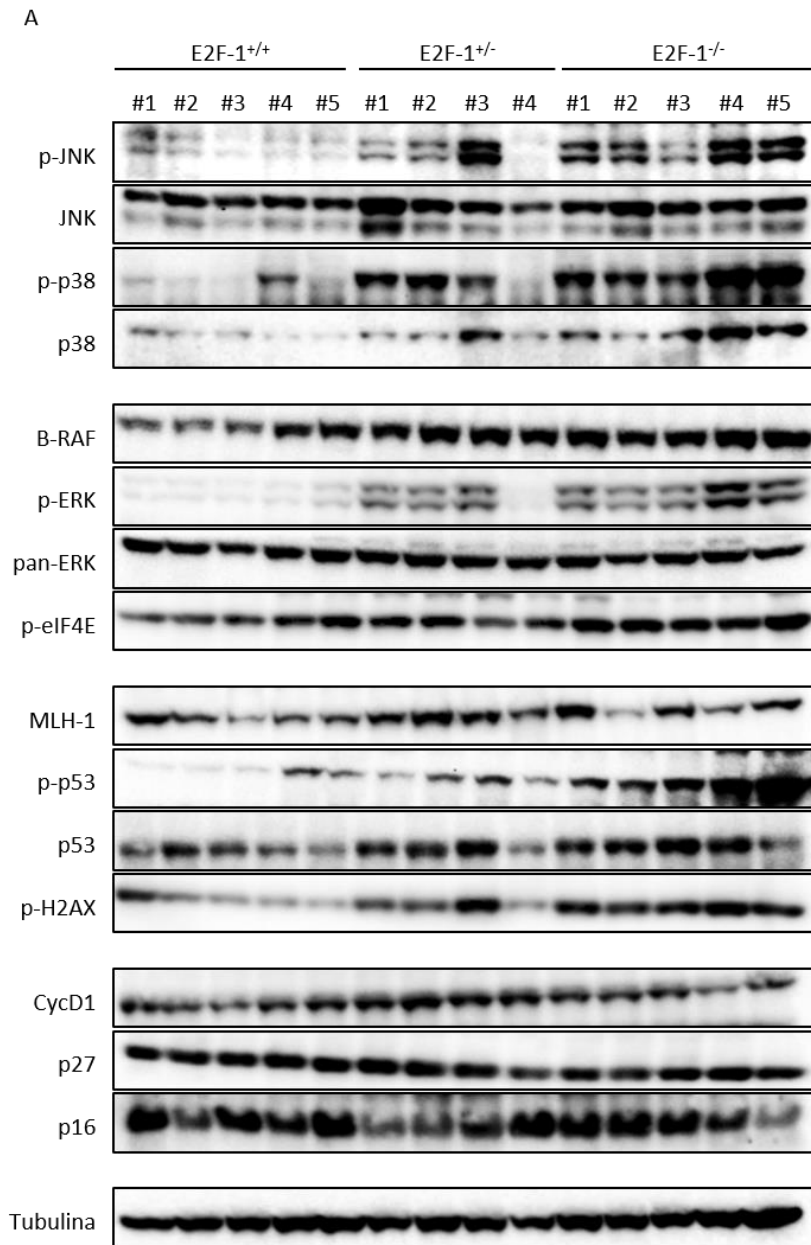


Figura 45: Els ratolins deficients per PTEN i E2F-1 presenten una hiperactivació de la via RAS-MAPK i una acumulació del dany al DNA. (A) Avaluació de l'expressió de diverses proteïnes relacionades amb tumorigènesi per Western blot a partir de llisats de còlon tumoral de ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}$, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-}$. La tubulina s'empra com a control de càrrega.

B

	E2F-1 ^{+/+}	E2F-1 ^{-/-}	p-value
Expressió relativa p-JNK SEM	0,751 ± 0,078	2,457 ± 0,202	***p=0,0005
Expressió relativa p-p38 SEM	1,679 ± 0,678	9,239 ± 1,665	***p=0,0006
Expressió relativa B-RAF SEM	1,517 ± 0,286	4,007 ± 0,404	***p=0,0010
Expressió relativa p-ERK SEM	1,824 ± 0,673	24,900 ± 4,065	**p=0,0043
Expressió relativa p-p53 SEM	1,179 ± 0,333	3,594 ± 0,508	**p=0,0055
Expressió relativa p53 SEM	1,098 ± 0,139	2,336 ± 0,205	**p=0,0015
Expressió relativa p-H2AX SEM	0,612 ± 0,107	1,372 ± 0,043	***p=0,0010

Figura 45: Continuació. Els ratolins deficients per PTEN i E2F-1 presenten una hiperactivació de la via RAS-MAPK i una acumulació del dany al DNA. (B) Quantificació de les bandes immunoreactives mitjançant anàlisi de densitometria emprant el software *Image J* per als ratolins amb genotip Cre:ER^{T+/+}PTEN^{fl/fl}E2F-1^{+/+} (E2F-1^{+/+}) i Cre:ER^{T+/+}PTEN^{fl/fl}E2F-1^{-/-} (E2F-1^{-/-}). Els valors relatius s'expressen emprant la tubulina com a referència. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001, segons anàlisi t-test.

2. Estudi de la implicació de l'axis Ciclina D-CDK4/6 en les neoplàsies induïdes per la pèrdua de PTEN

2.1 La pèrdua de PTEN dóna lloc a un increment de l'expressió de Ciclina D1 en endometri, tiroides i pròstata

Estudis previs al nostre treball han demostrat que la pèrdua de PTEN condueix a una divisió cel·lular aberrant, que és un dels trets característics del fenotip tumoral (Mirantes et al., 2013). A més, s'ha descrit que PTEN influencia l'expressió de la Ciclina D1, malgrat que els resultats al respecte són encara força controvertits (Paramio et al., 1999; Radu et al., 2003; Weng et al., 2001).

Per aquest motiu, en el segon objectiu d'aquest treball, ens vam plantejar en primer lloc, intentar determinar l'efecte de la pèrdua de PTEN sobre l'expressió de la Ciclina D1, en diferents teixits epitelials emprant el nostre model murí *knock-out* de *Pten* induïble per Tamoxifè: Cre:ER^TPTEN^{f/f} (Mirantes et al., 2013).

Així doncs, a partir de llisats de cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí i de llisats de teixit de tiroide i pròstata es va observar per Western blot que aquelles mostres que havien perdut l'expressió de PTEN presentaven majors nivells de Ciclina D1 en comparació amb les mostres control, que per tant, retenien l'expressió del gen supressor tumoral.

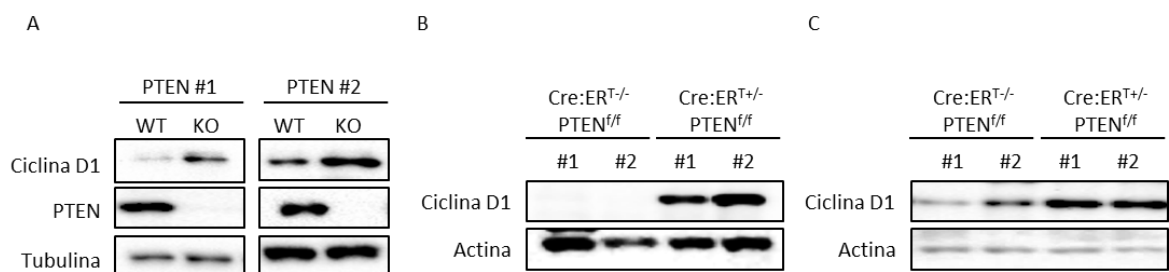


Figura 46: La deleció de PTEN dóna lloc a increment de l'expressió de Ciclina D1. (A) Avaluació de l'expressió de la Ciclina D1 per Western blot a partir de llisats de cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri murí. La tubulina s'empra com a control de càrrega. (B-C) Avaluació de l'expressió de la Ciclina D1 per Western blot amb llisats de proteïna total de tiroide (B) i pròstata (C). L'actina s'empra com a control de càrrega.

A més, aquests resultats es van corroborar gràcies a la immunohistoquímica de Ciclina D1 a endometri, tiroide i pròstata. De nou, vam comprovar que la pèrdua del gen supressor tumoral donava lloc a un increment de la expressió de Ciclina D1 en tots tres teixits analitzats.

Resultats

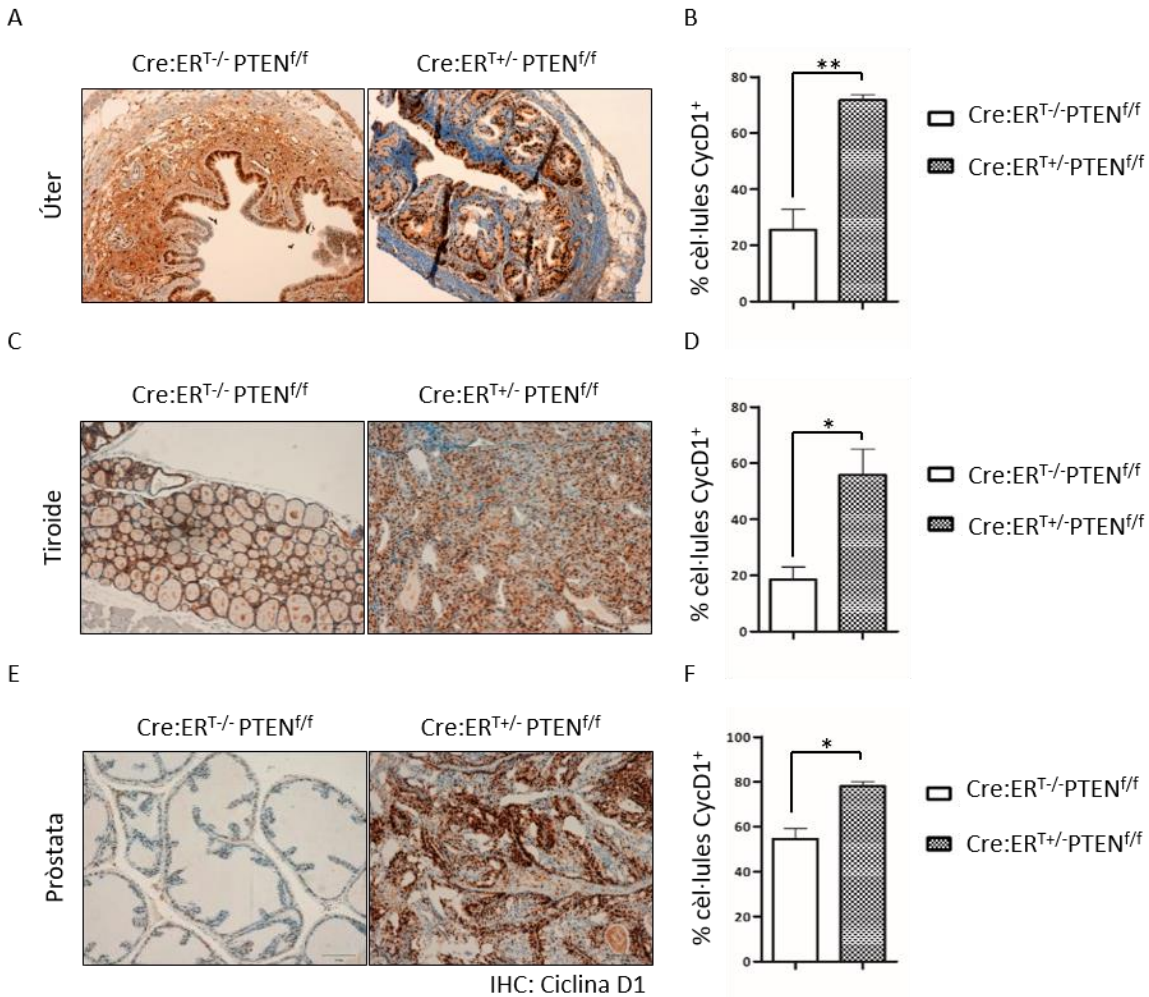


Figura 47: La deleció de PTEN dona lloc a un increment de l'expressió de la Ciclina D1. (A, C i E) Imatges representatives de la immunohistoquímica de Ciclina D1 a endometri (A), tiroide (C) i pròstata (E) de ratolins Cre:ERT^{-/-}-PTEN^{f/f} i Cre:ERT^{+/-}-PTEN^{f/f} 6 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè (10x). (B, D i F) Quantificació de la immunohistoquímica de Ciclina D1 per als tres teixits analitzats. Els valors s'han obtingut amb n=5 per a cada genotip, i s'expressen com la mitjana ± s.e.m. *P<0.05 **P<0.01, segons anàlisi t-test.

Finalment, aquest augment en l'expressió de la Ciclina D1 correlacionava a la perfecció amb un increment de l'expressió del marcador de proliferació Ki-67.

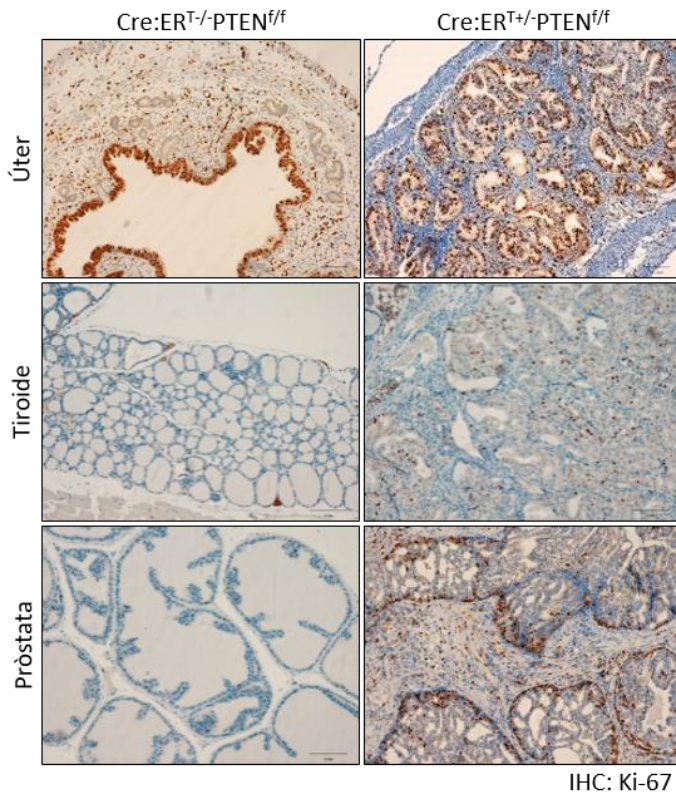


Figura 48: La deleció de PTEN dona lloc a increment de l'expressió de Ki-67. Imatges representatives de la immunohistoquímica de Ki-67 a úter, tiroide i pròstata de ratolins $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ 6 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè (10x).

En conjunt, tots aquests resultats suggereixen que la pèrdua de PTEN condueix a un increment de l'expressió de la Ciclina D1.

2.2 Generació del model murí $Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1$

Després de comprovar que la deleció de PTEN donava lloc a un increment de l'expressió de la Ciclina D1, vam voler caracteritzar la implicació d'aquesta ciclina i del seu augment d'expressió en la tumorigènesi induïda per la deficiència en PTEN.

Amb aquest objectiu, vam generar en primer lloc, el model murí $Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1$, a partir del creuament de l'animal *knock-out* de *Pten* induïble per Tamoxifè ($Cre:ER^TPTEN^{f/f}$) amb el ratolí *knock-out* de *Ccnd1* (en endavant, $CycD1^{-/-}$). Tal es com es pot veure a la figura 49, es va seguir un protocol de tres creuaments, emprant com a fundadors els ratolins amb genotip $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ i $CycD1^{-/-}$. D'aquesta manera, es van obtenir ratolins amb el genotip desitjat $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}$, i els corresponents controls, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+}$. A més, els ratolins amb el genotip $Cre:ER^{T-/-}$

Resultats

PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} van ser utilitzats com a controls de la deleció exclusiva de la Ciclina D1. En aquest punt, és important remarcar que tots els controls emprats en aquest treball provenen de la mateixa colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1, per tal d'assegurar que tots els animals analitzats presenten del mateix fons genètic. Així, és possible evitar errors a l'hora d'avaluar el fenotip dels animals i tenir la certesa de què els efectes observats es deuen al genotip d'estudi i no, a diferents fons genètics.

Com que estàvem interessats en estudiar la implicació de la Ciclina D1 en els tumors deficients en PTEN, la colònia es va mantenir de manera que la deleció de PTEN fos bial·lèlica en tots els animals que expressaven la recombinasa, i només variés el grau d'ablació de la Ciclina D1.

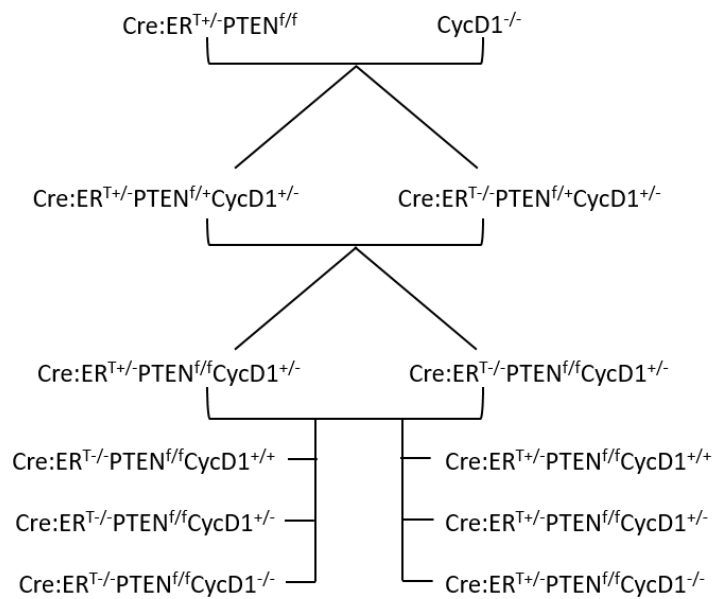


Figura 49: Estratègia de cria per a la generació del model animal Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1.

És important remarcar que els nostres ratolins *knock-out* de *Ccnd1* són molt petits, tenen una viabilitat reduïda i presenten defectes neurològics. Aquest fenotip va comprometre extremament la viabilitat dels animals Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}, i per tant, va limitar el número de ratolins que es van poder avaluar en aquest estudi.

2.3 Efecte de l'absència de Ciclina D1 en les neoplàsies de pròstata i endometri i les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN

Un cop establerta la colònia Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1 i obtinguts tots els genotips d'interès, vam procedir a caracteritzar l'efecte de la pèrdua de la Ciclina D1 en les neoplàsies de pròstata i endometri, i en les

hiperplàsies de tiroide originades a conseqüència de la pèrdua de PTEN. Així, vam utilitzar femelles i mascles $Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}$, $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}$ d'entre 5-7 setmanes d'edat i amb un pes superior als 15 g. Com s'ha comentat amb anterioritat, els ratolins *knock-out* de *Ccnd1* presenten una mida molt inferior en comparació amb els seus germans *wild-type*. Per aquest motiu, vam monitoritzar exhaustivament el pes d'aquests animals abans de començar qualsevol protocol experimental a fi d'evitar morts prematures. L'esquema experimental que es va seguir es detalla a la figura 50. Poc temps després del deslletament, els ratolins van rebre intraperitonealment una única dosi de Tamoxifè, per tal d'induir la deleció de PTEN, i es van sacrificar a les 4-6 setmanes posteriors. Finalment, després de l'anàlisi macroscòpic, les pròstates, les tiroides i els endometris dels animals es van incloure en parafina per tal de dur a terme l'anàlisi histopatològic.

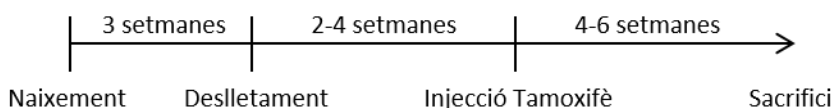


Figura 50: Disseny experimental per a l'anàlisi dels animals de la colònia $Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1$. Breument, els ratolins de tots els genotips reben una única dosi de Tamoxifè per via intraperitoneal entre les 5-7 setmanes de vida, i se sacrifiquen 4-6 setmanes després de la inducció de la deleció de PTEN.

En primer lloc, tal com s'observa a la figura 51, gràcies a l'avaluació macroscòpica es va determinar que l'absència de Ciclina D1 no reduïa la mida de les pròstates dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}$ en comparació amb les dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+}$. A més, l'anàlisi histopatològic pels patòlegs a cegues va deixar palès que no hi havia diferències histològiques remarcables entre ambdós genotips. Tots els ratolins analitzats presentaven hgPIN amb independència del genotip.

Resultats

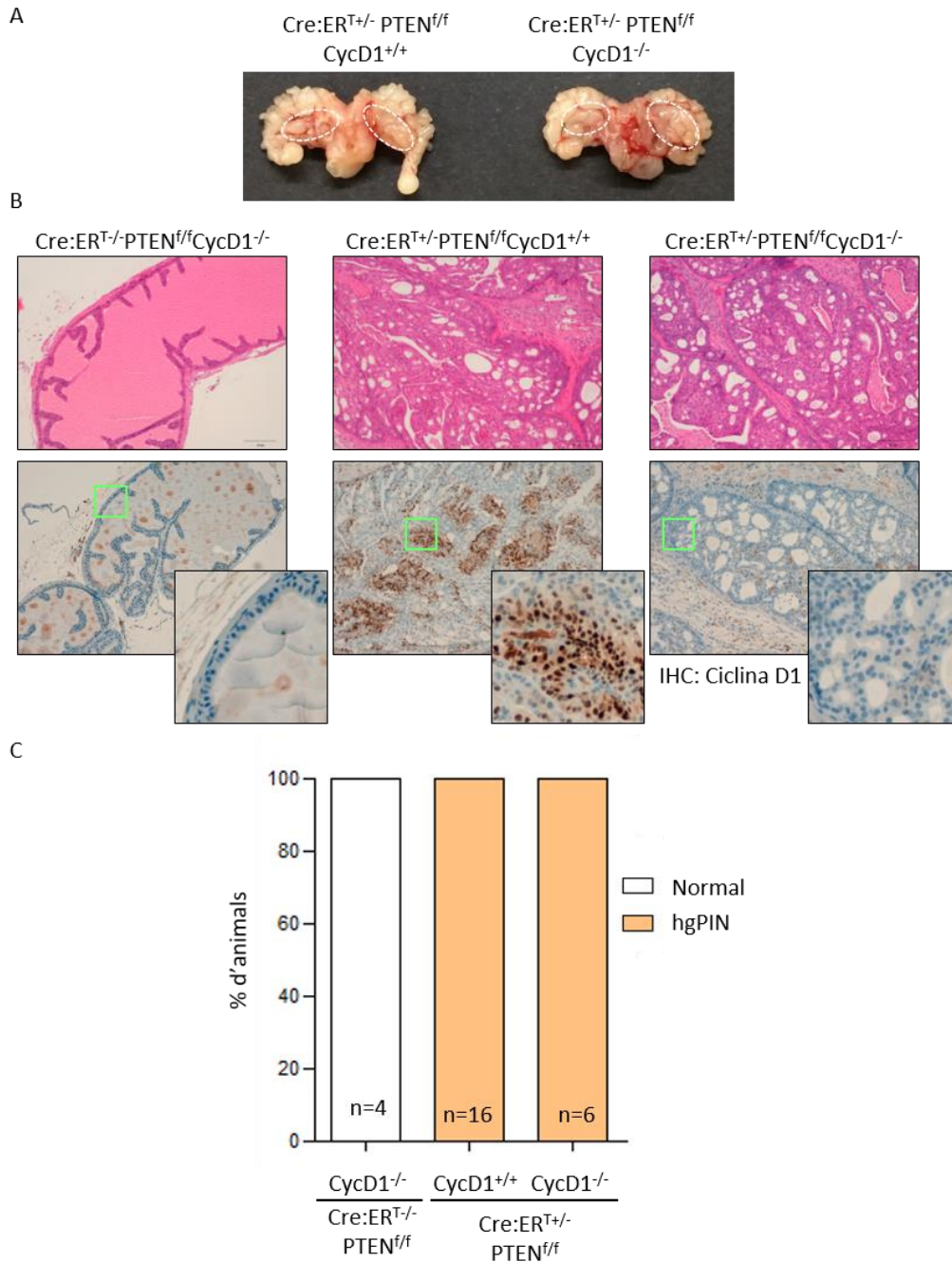


Figura 51: La Ciclina D1 és dispensable en les neoplàsies prostàtiques induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Comparació de pròstates *wild-type* i *knock-out* per a la Ciclina D1 a les 4-6 setmanes després de la deleció de PTEN. (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E (panell superior) i de la immunohistoquímica de Ciclina D1 (panell inferior) a les pròstates de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}, Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} (10x). (C) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat. hgPIN significa *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*.

Pel que fa a la tiroide, de nou es va determinar que no existien diferències macroscòpiques ni histològiques entre els dos genotips experimentals. Així, la manca de Ciclina D1 no disminuïa ni la mida de les glàndules ni el grau de les lesions.

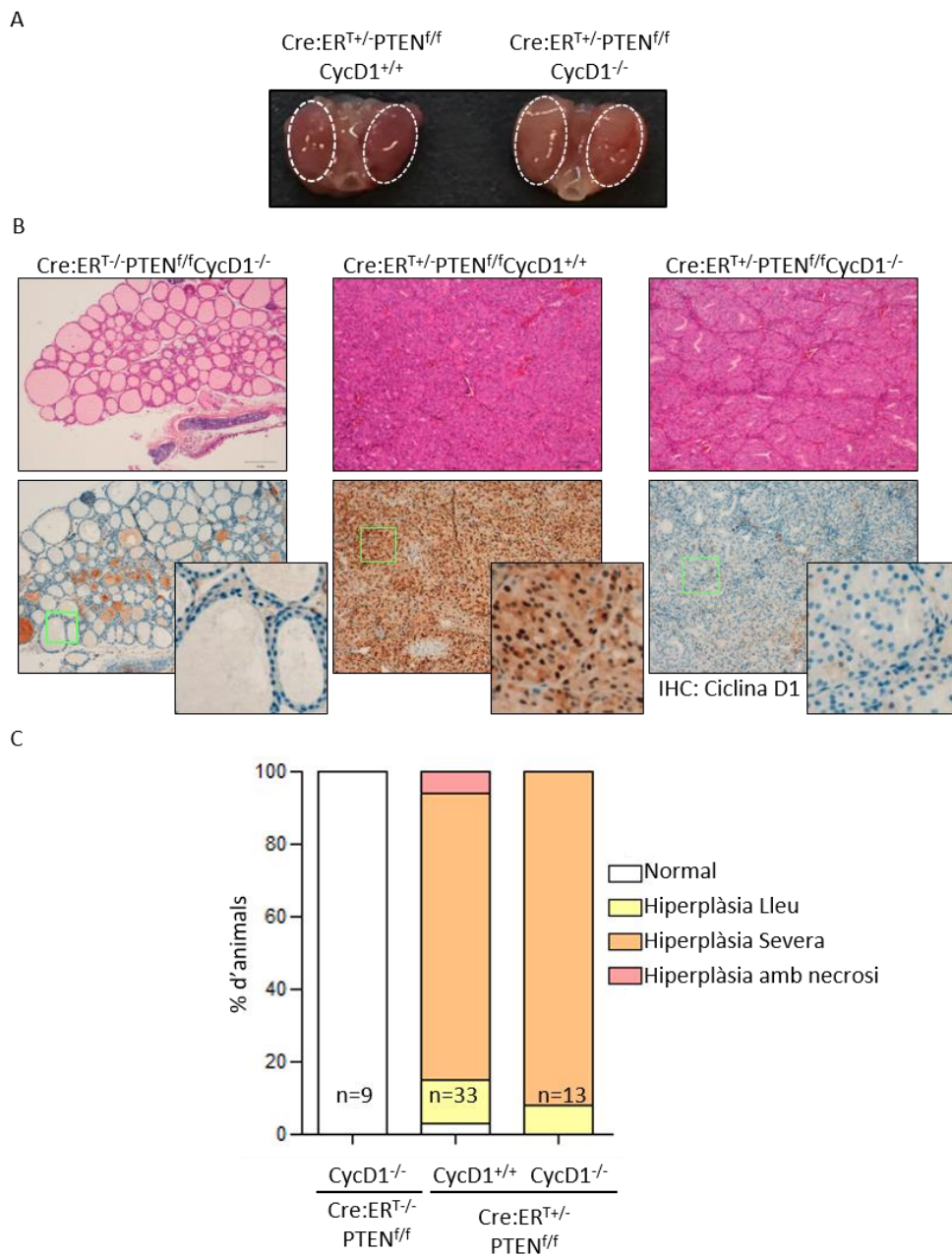


Figura 52: La Ciclina D1 és dispensable en les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Comparació de tiroides *wild-type* i *knock-out* per a la Ciclina D1 a les 4-6 setmanes després de la deleció de PTEN. (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E (panell superior) i de la immunohistoquímica de Ciclina D1 (panell inferior) a les tiroides de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}, Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+} i Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} (10x). (C) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat.

Resultats

Finalment, els resultats van ser diferents per a l'endometri. Si bé no es van detectar diferències estadísticament significatives, la manca de Ciclina D1 va conduir a una lleugera disminució de la incidència i la progressió de les lesions endometrials induïdes per la pèrdua de PTEN. La gran majoria dels ratolins Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} van desenvolupar hiperplàsies complexes, i només un 17% van presentar EIN. Per contra, la incidència d'EIN va ser del 53% en els animals Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+}.

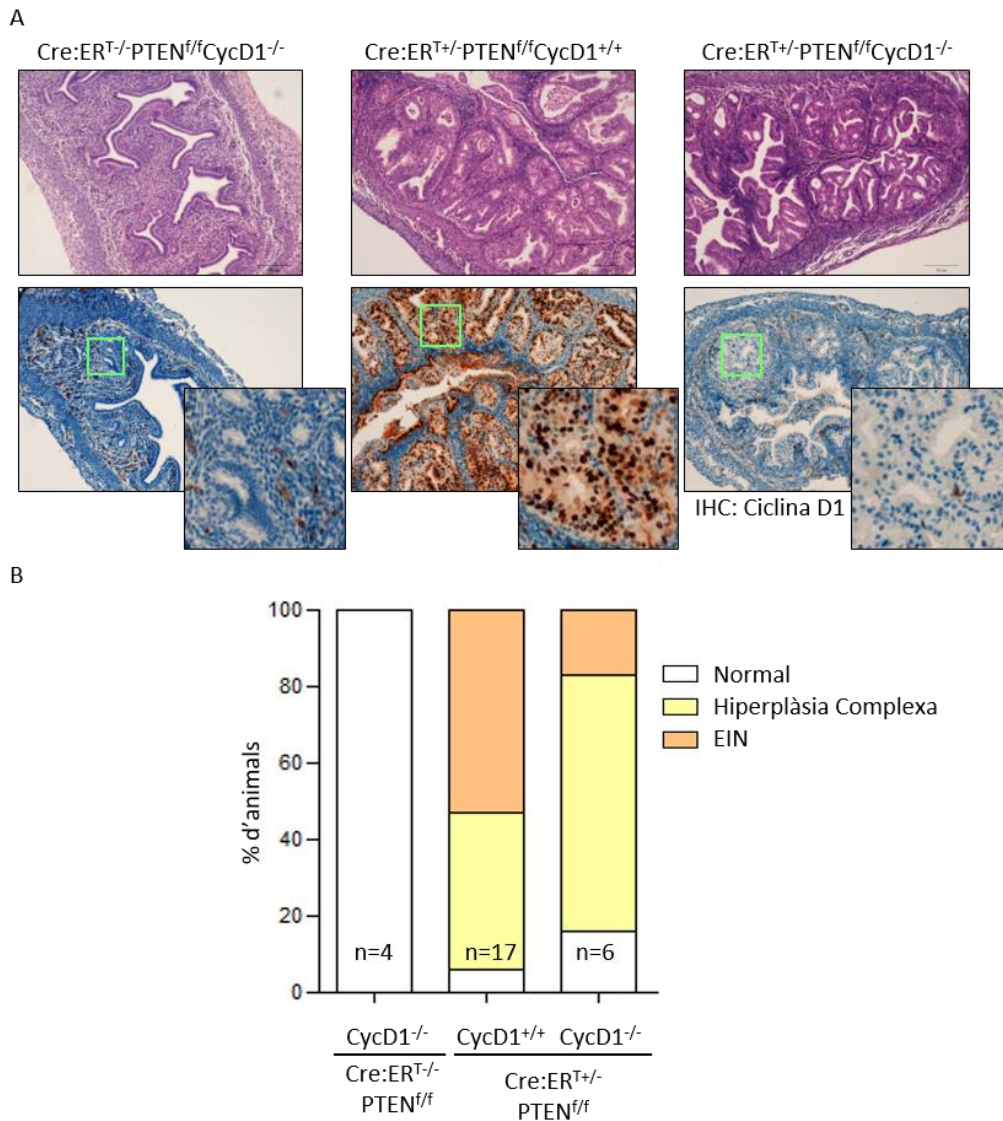


Figura 53: L'absència de Ciclina D1 dóna lloc a una reducció de les lesions endometrials induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E (panell superior) i de la immunohistoquímica de Ciclina D1 (panell inferior) als úters de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}, Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+} i Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} (10x). (B) Quantificació de l'avaluació de les lesions diagnosticades. No s'observen diferències segons l'anàlisi Chi quadrat. EIN significa *endometrial intraepithelial neoplasia*.

En conclusió, els resultats obtinguts fins al moment deixen entreveure que l'absència de Ciclina D1 podria exercir un efecte protector sobre la incidència i la progressió de les neoplàsies endometrials induïdes per la pèrdua de PTEN. Per contra, les neoplàsies prostàtiques i les hiperplàsies de tiroide, també deficientes per a PTEN, són independents de l'expressió de Ciclina D1.

2.4 L'absència de Ciclina D1 no redueix la proliferació de les neoplàsies sòlides induïdes per la pèrdua de PTEN

Tot seguit, vam estudiar l'efecte de la deficiència de Ciclina D1 sobre la proliferació i el cicle cel·lular en els tumors d'endometri i pròstata, i en les hiperplàsies de tiroides originades per la pèrdua de PTEN. En primer lloc, gràcies a la tinció de Ki-67, es va determinar que l'absència de Ciclina D1 no modificava la taxa de proliferació de cap dels tres teixits analitzats deficientes per PTEN.

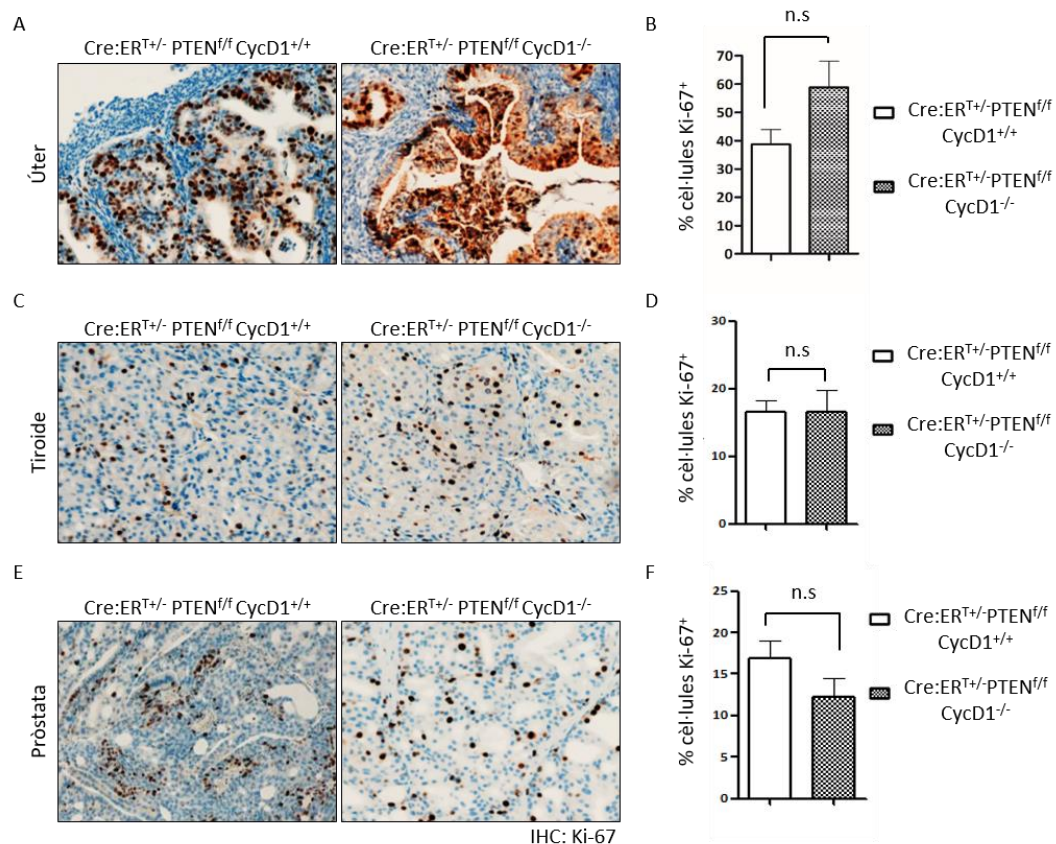


Figura 54: La manca de Ciclina D1 no modifica l'expressió de Ki-67. (A, C i E) Imatges representatives de la tinció per Ki-67 a endometri (A), tiroide (C) i pròstata (E) de ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-} (10x). (B, D i F) Quantificació de la immunohistoquímica de Ki-67 per als tres teixits analitzats. Els valors s'obtenen amb n=5 per a cada grup i es representen com la mitjana ± s.e.m. No s'observen diferències significatives segons l'anàlisi t-test.

Resultats

A continuació, per Western blot, es va analitzar l'expressió de diversos components del cicle cel·lular implicats en la transició G1/S. De nou, tal com es mostra a la figura 55, es observa que la manca de Ciclina D1 no produïa canvis en l'expressió de les proteïnes analitzades en cap dels genotips d'estudi.

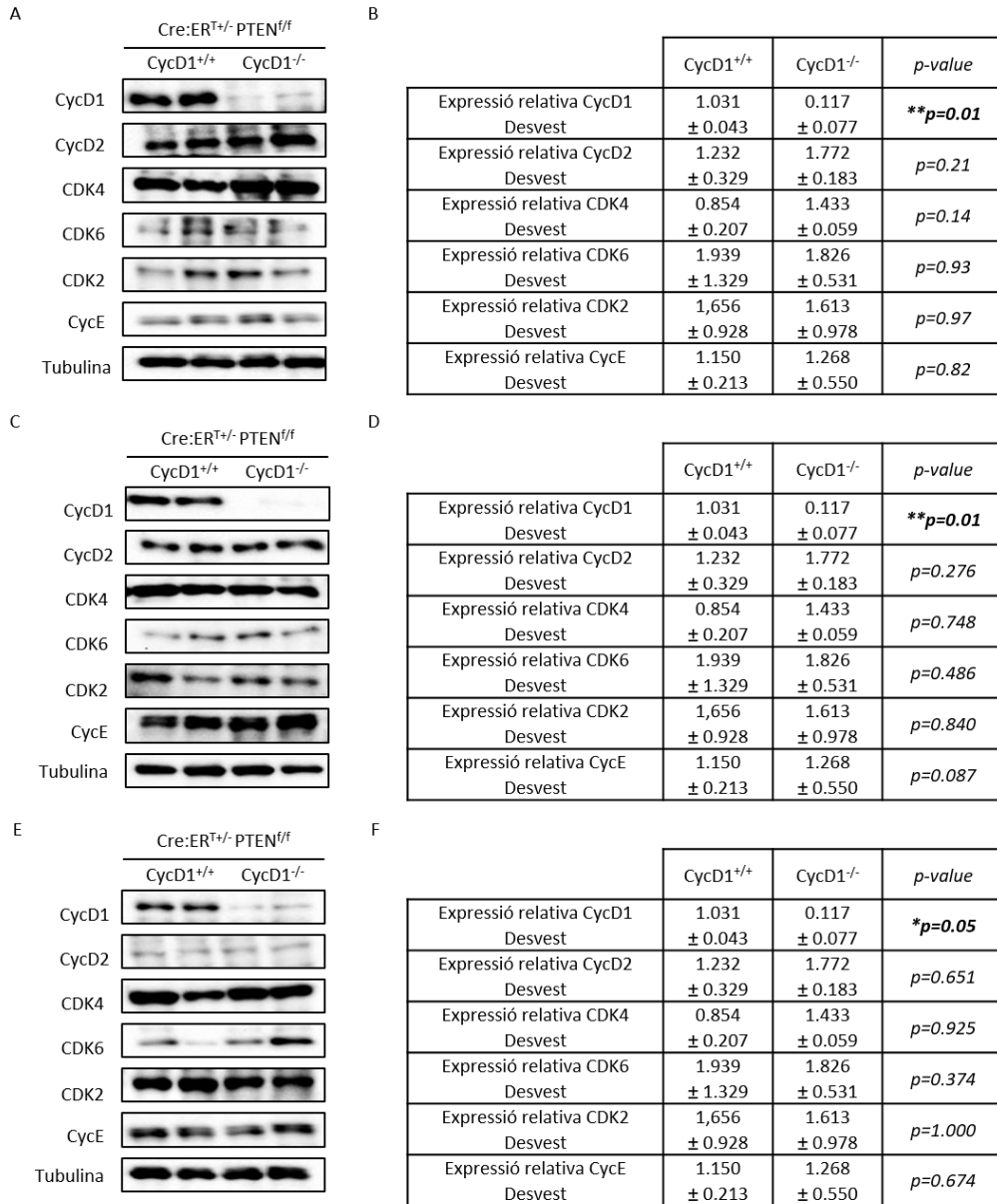


Figura 55: L'absència de Ciclina D1 no modifica l'expressió de proteïnes implicades en la transició G1/S. (A, C i E) Avaluació de l'expressió de Ciclina D1 (CycD1), Ciclina D2 (CycD2), CDK4, CDK6 i Ciclina E (CycE) mitjançant Western blot a úter (A), tiroide (C) i pròstata (E) de ratolins Cre:ERT^{+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{+/+} i Cre:ERT^{+/+}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}. La tubulina s'empra com a control de càrrega. (B, D i F) Quantificació de les bandes immunoreactives mitjançant anàlisi de densitometria emprant el software *Image J*. Els valors relatius s'expressen emprant la tubulina com a referència. *P<0.05 **P<0.01, segons anàlisi t-test.

Finalment, vam analitzar l'expressió de la forma fosforilada de RB (p-RB) en la Serina 780, donat que es fosforila específicament per la CDK4/6 i és una de les dianes més conegudes de l'eix Ciclina D-CDK4/6. Tal com es mostra a la figura 56, la tinció de p-RB (Ser780) va revelar que la manca de Ciclina D1 no donava lloc a una disminució de la fosforilació de RB.

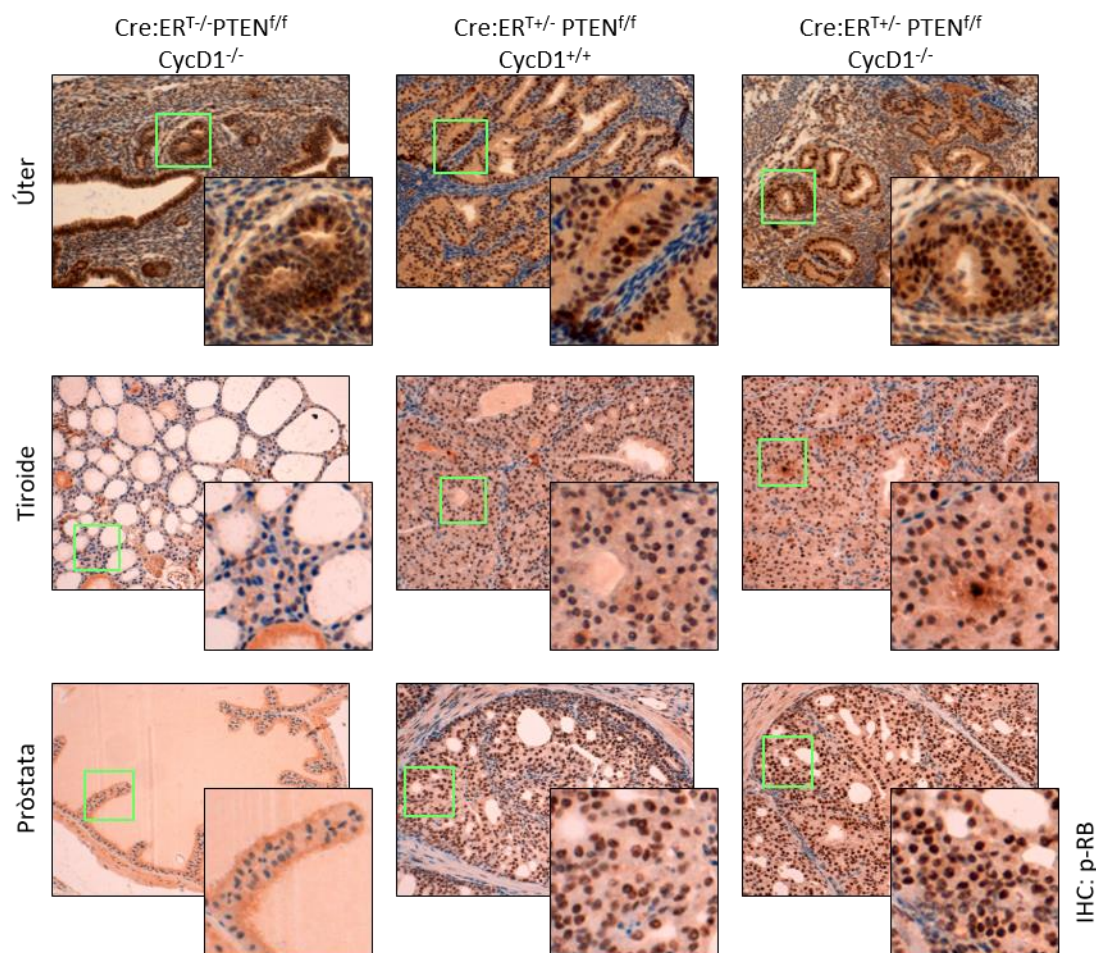


Figura 56: L'absència de Ciclina D1 no dona lloc a una disminució dels nivells de p-RB. Imatges representatives de la immunohistoquímica de p-RB (Ser780) a úter (panell superior), tiroide (panell central) i pròstata (panell inferior) de ratolins Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff}CycD1^{-/-}, Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff}CycD1^{+/-} i Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff}CycD1^{-/-} (10x).

En conjunt, tots aquests resultats suggereixen que la pèrdua d'expressió de Ciclina D1 no exerceix un efecte antiproliferatiu ni condueix al bloqueig de l'activitat de l'eix Ciclina D-CDK4/6 en cap dels tres tipus tumorals estudiats.

2.5 La inhibició específica de CDK4/6 desencadena un efecte antiproliferatiu en cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí deficientes per PTEN

Després de demostrar *in vivo*, amb el model de ratolí Cre:ER^TPTEN^{f/f}CycD1, que l'absència de Ciclina D1 no disminuïa la proliferació dels tumors deficientes per PTEN ni causava el bloqueig del cicle cel·lular a nivell de l'axis Ciclina D-CDK4/6, vam pensar que pot ser les altres Ciclines D, com són la Ciclina D2 i la Ciclina D3, compensaven l'efecte de la manca de la Ciclina D1.

En primer lloc, per tal de fonamentar la nostra hipòtesi, vam estudiar si la pèrdua de PTEN conduïa també a un augment de l'expressió de les Ciclines D2 i D3, de manera anàloga al que succeïa amb la Ciclina D1. Amb aquest objectiu, es van establir cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}, que mantenen o no l'expressió de PTEN, respectivament, després del tractament amb Tamoxifè. Per mitjà de la tècnica de RT-qPCR, vam concloure que la pèrdua de PTEN desencadenava un increment de l'expressió de totes tres Ciclines D, no només de la Ciclina D1. Aquests resultats suggereixen que l'absència d'una única Ciclina D pot no ésser suficient per bloquejar eficientment l'axis Ciclina D-CDK4/6.

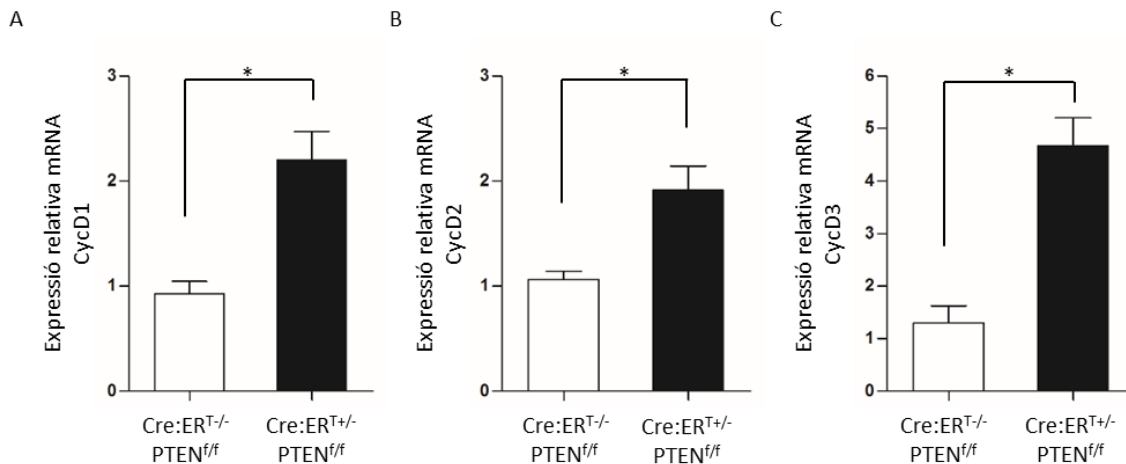


Figura 57: La pèrdua de PTEN dona lloc a un increment de l'expressió de les tres Ciclines D. (A-C) Anàlisi per RT-qPCR de l'expressió del mRNA de la Ciclina D1 (A), Ciclina D2 (B) i Ciclina D3 (C) en cultius 3D de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}. Els valors s'obtenen a partir d'una n=4 (preparacions independents de mRNA) i es representen com la mitjana ± s.e.m. *P<0.05, segons anàlisi t-test.

Arran d'aquesta descoberta, vam voler avaluar si la inhibició específica de CDK4/6 presentava un efecte directe sobre la proliferació cel·lular, a diferència de l'ablació d'una única Ciclina D. Així, vam emprar el Palbociclib, que és un inhibidor selectiu de CDK4/6 i que no presenta efecte sobre la resta de CDKs. Es van establir cultius tridimensionals amb cèl·lules epitelials endometrials de ratolins

Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}, tractades o no amb Tamoxifè per induir l'escissió de PTEN. Quan els cultius van assolir la mida adequada, es van tractar amb Palbociclib a una dosi de 5 μ M durant 48 h. Tal com es mostra a la figura 58, es va observar que el tractament amb l'inhibidor donava lloc a una disminució de la mida glandular.

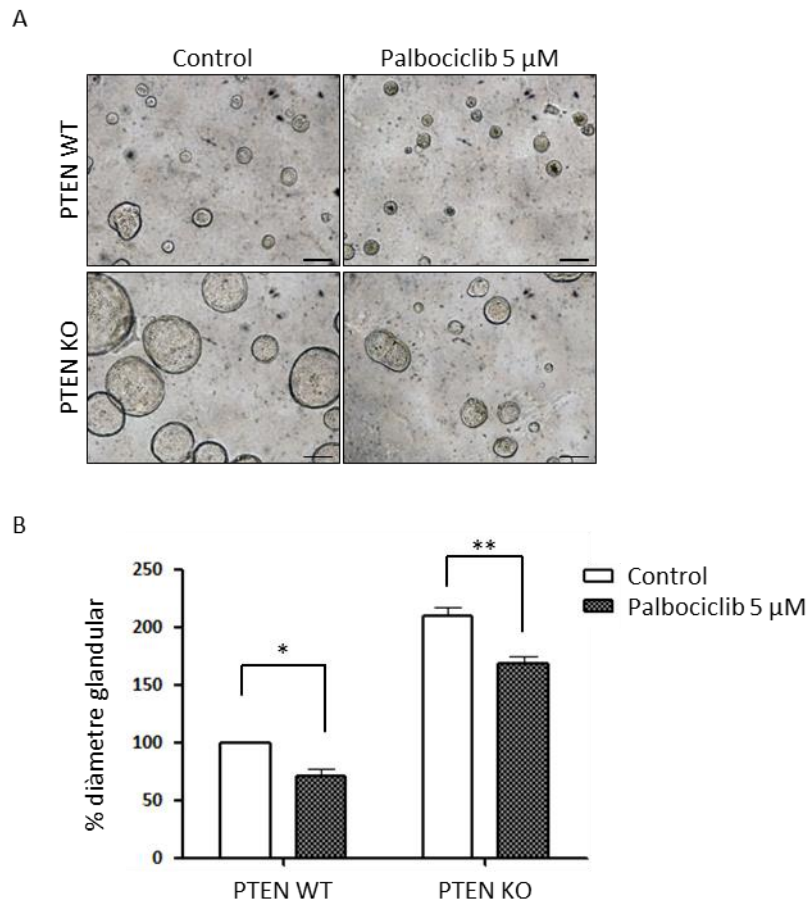
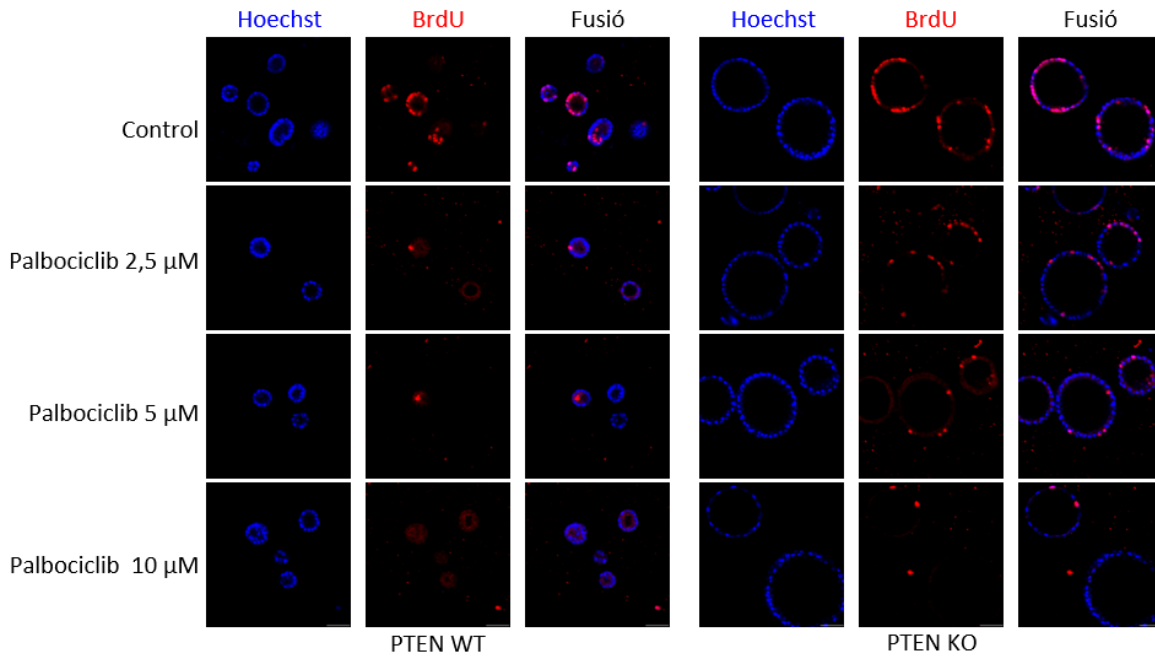


Figura 58: El tractament amb Palbociclib disminueix el diàmetre de les glàndules de cultius tridimensionals. (A) Imatges representatives de contrast de fase de cultius 3D de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} tractats (PTEN KO) o no (PTEN WT) amb Tamoxifè per induir la deleció de PTEN, i tractats o no amb Palbociclib (5 μ M) durant 48 hores. Barres: 100 μ M. (B) Mesura dels diàmetres glandulars. Les dades provenen de n=3 experiments independents. Les barres d'error representen la mitjana \pm s.e.m. *P<0.05 **P<0.01, segons anàlisi t-test.

A més, per demostrar un efecte directe del Palbociclib sobre la proliferació, es va dur a terme un assaig BrdU sobre els mateixos cultius, tractats amb diferents dosis de Palbociclib (2,5; 5 i 10 μ M). Finalment, vam comprovar que el tractament amb l'inhibidor també reduïa el nombre de cèl·lules que incorporaven la BrdU.

Resultats

A



B

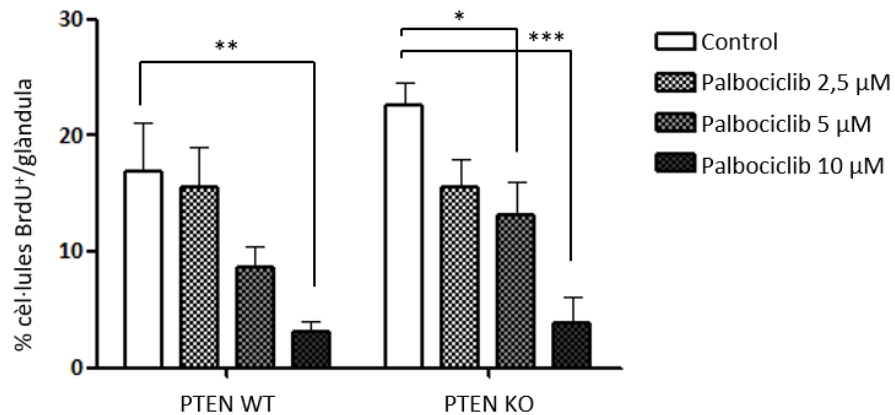


Figura 59: El tractament amb Palbociclib disminueix el número de cèl·lules que incorporen la BrdU. (A) Imatges representatives de la immunofluorescència de BrdU en cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins Cre:ER^{T+}/PTEN^{f/f} tractats (PTEN KO) o no (PTEN WT) amb Tamoxifè per induir la deleció de PTEN, i tractats o no amb Palbociclib a 2,5; 5 i 10 μM durant 48 hores. Els nuclis s'evidencien amb la tinció amb Hoechst. Barres d'error: 50 μM. (B) Quantificació del número de cèl·lules positives per a la immunofluorescència de BrdU per glàndula. Les dades provenen de n=3 replicats experimentals i els valors s'expressen com la mitjana ± s.e.m. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001, segons anàlisi t-test.

Per tant, els nostres resultats demostren que la inhibició específica de CDK4/6 efectuada pel Palbociclib desencadena una disminució de la proliferació de les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí *in vitro*.

2.6 El tractament amb Palbociclib redueix la incidència i la progressió dels carcinomes endometrials deficients per PTEN *in vivo*

Els resultats obtinguts *in vitro* amb els cultius tridimensionals ens van incitar a investigar l'efecte del Palbociclib *in vivo* en el model *knock-out* de *Pten* induïble per Tamoxifè.

Per començar, vam avaluar l'efecte antiproliferatiu de l'inhibidor en femelles Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}, tractades amb Tamoxifè. Així, dues setmanes després de la inducció de la deleció de PTEN, les femelles es van començar a tractar amb 100 mg de Palbociclib per Kg de pes corporal del ratolí (100 mg/kg). El fàrmac es va administrar diàriament per via oral durant 21 dies, i els animals controls es van tractar amb el vehicle seguint la mateixa pauta d'administració. Passat aquest temps, els ratolins es van sacrificar per al seu posterior anàlisi.

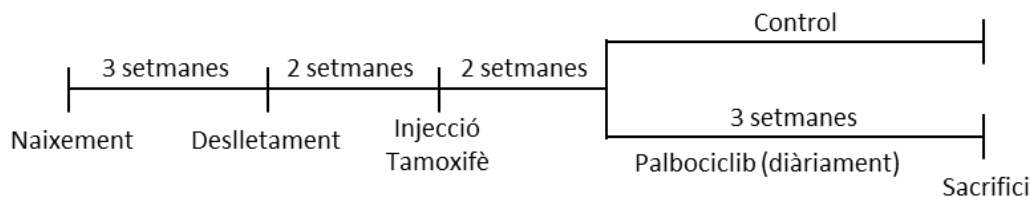


Figura 60: Representació esquemàtica del tractament amb Palbociclib *in vivo*. Breument, 2 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè, els animals es comencen a tractar diàriament amb Palbociclib a una dosi de 100 mg/kg per via oral durant 21 dies. Passat aquest període de temps, els animals se sacrifiquen per al seu posterior anàlisi.

L'anàlisi histopatològic dels úters va revelar que el tractament amb Palbociclib donava lloc a una reducció de les lesions endometrials. Les femelles tractades amb vehicle van desenvolupar majoritàriament EIN (67%) i hiperplàsia complexa (33%), mentre que la majoria de les femelles que havien rebut Palbociclib van ser diagnosticades d'hiperplàsia (40%) i hiperplàsia complexa (40%). Només un 10% dels animals d'aquest grup va desenvolupar EIN, i fins i tot, un 10% més va conservar una histologia normal.

Resultats

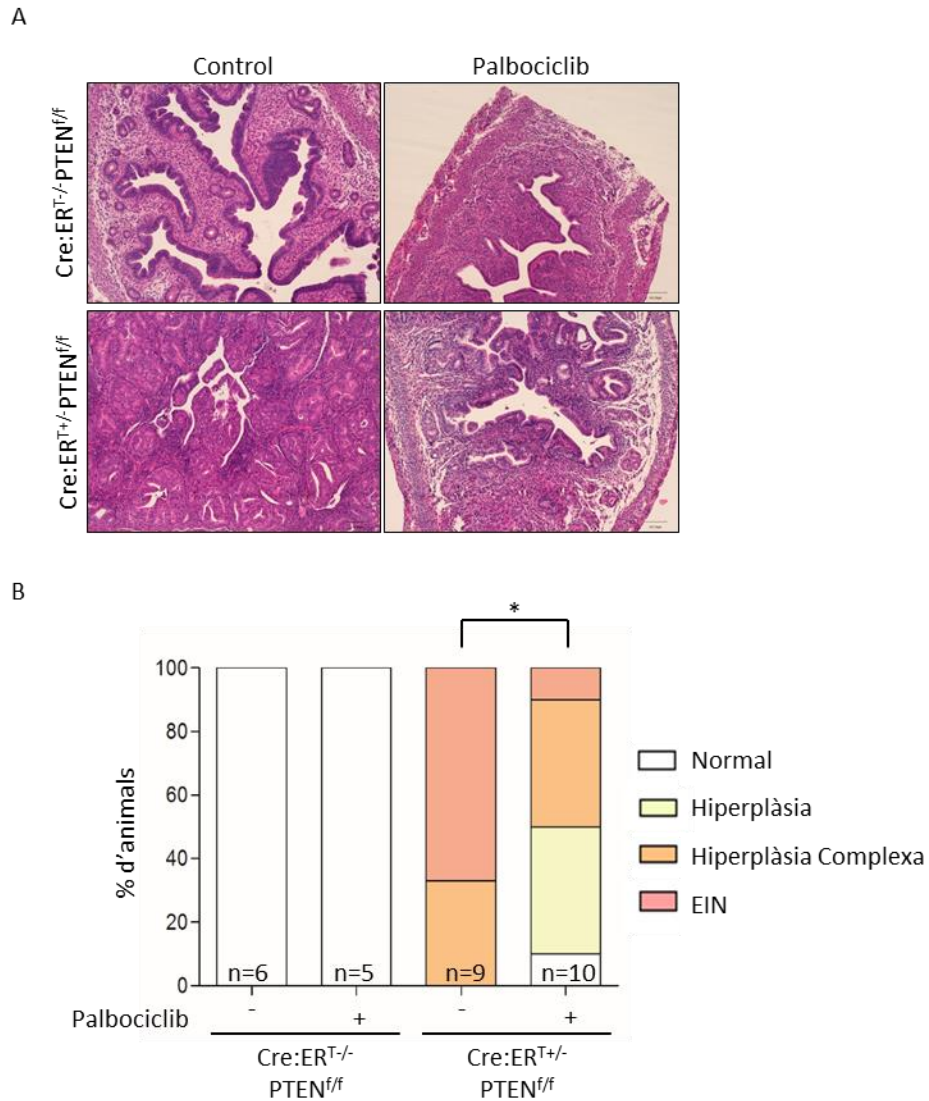


Figura 61: El tractament amb Palbociclib redueix les neoplàsies endometrials originades per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E d'endometris de ratolins femella Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Palbociclib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. *P<0.05, segons l'anàlisi Chi quadrat. EIN significa *endometrial intraepithelial neoplasia*.

A més, vam poder comprovar també que els úters de les femelles Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractades amb Palbociclib presentaven menor expressió del marcador de proliferació Ki-67, en comparació amb aquelles que havien estat tractades amb el vehicle.

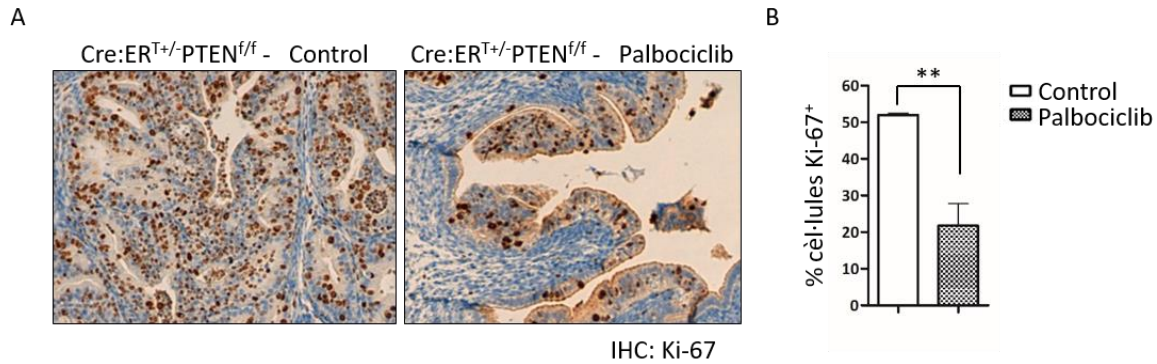


Figura 62: Els úters de les femelles Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} tractades amb Palbociclib durant 21 dies presenten menor expressió del marcador de proliferació Ki-67. (A) Imatges representatives de la tinció de Ki-67 a l'endometri de ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib durant 21 dies (10x). (B) Quantificació de la immunohistoquímica de Ki-67. Els valors s'obtenen a partir d'una n=5 de cada grup i es representen com la mitjana \pm s.e.m. **P<0.01, segons l'anàlisi t-test.

Així, vam poder concloure que el Palbociclib no només desencadenava un efecte antiproliferatiu *in vitro* sinó també, *in vivo*, a l'endometri de ratolí. Per tant, els nostres resultats suggereixen que el tractament amb l'inhibidor exerceix un efecte beneficiós sobre les neoplàsies endometrials causades per la pèrdua de PTEN.

Encoratjats per aquests bons resultats, i donat que els ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} també desenvolupen neoplàsies de pròstata i hiperplàsies de tiroide, vam decidir estudiar l'efecte del Palbociclib també en aquestes patologies, seguint el mateix protocol experimental .

Així, inicialment, tal com es pot observar en les figures 63 i 64, vam poder observar que els ratolins Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} tractats amb Palbociclib presentaven unes pròstates i unes tiroides de menor mida i pes que els animals del mateix genotip tractats amb vehicle. A més, el tractament amb Palbociclib també donava lloc a una disminució de l'expressió del marcador de proliferació Ki-67 en ambdós teixits.

Resultats

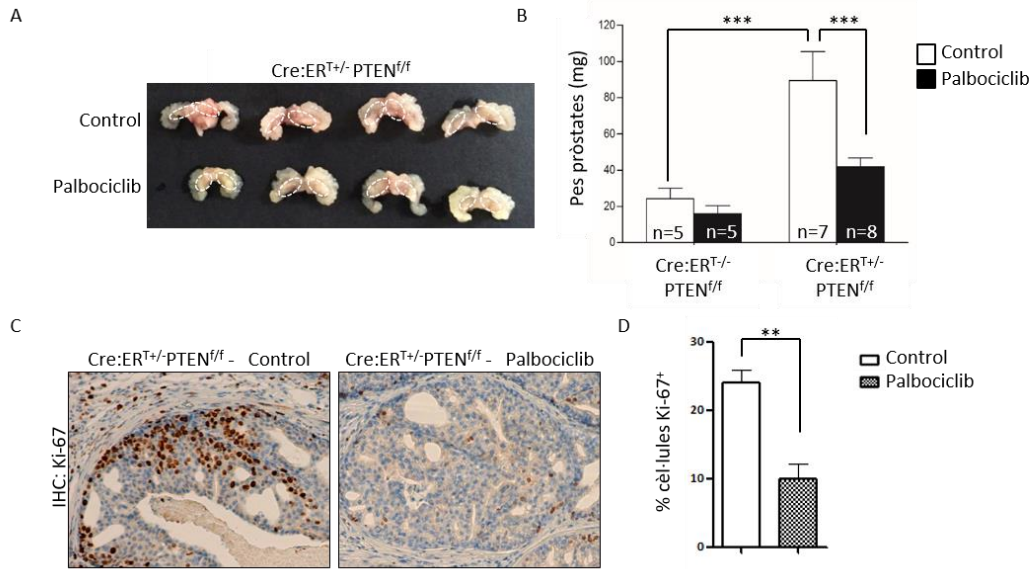


Figura 63: El Palbociclib redueix el pes i proliferació de les pròstates de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff}. (A) Imatges macroscòpiques de les pròstates de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff} tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Quantificació del pes de les pròstates analitzades. ***P<0.001, segons l'anàlisi t-test. (C) Imatges representatives de la immunohistoquímica de Ki-67 a les pròstates de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff} tractats amb vehicle o Palbociclib. (D) Quantificació de la tinció de Ki-67. Les dades s'obtenen amb n=5 per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana ± s.e.m. **P<0.01, segons l'anàlisi t-test.

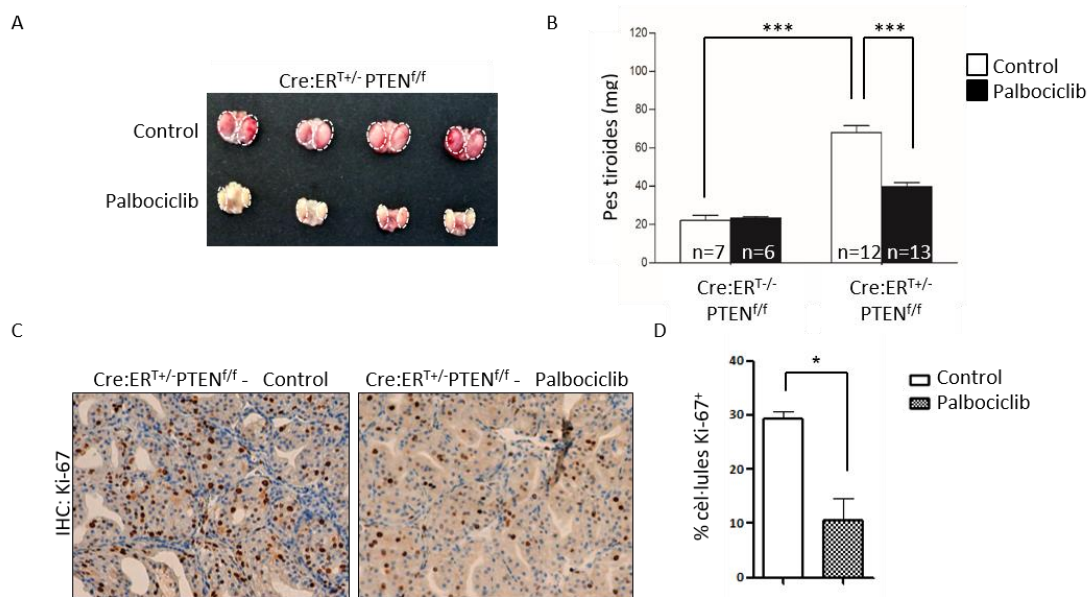


Figura 64: El Palbociclib redueix el pes i la proliferació de les tiroides de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff}. (A) Imatges macroscòpiques de les tiroides de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff} tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Quantificació del pes de les tiroides analitzades. ***P<0.001, segons l'anàlisi t-test. (C) Imatges representatives de la immunohistoquímica de Ki-67 a les tiroides de ratolins Cre:ER^{T+/}-PTEN^{ff} tractats amb vehicle o Palbociclib. (D) Quantificació de la tinció de Ki-67. Les dades s'obtenen amb n=5 per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana ± s.e.m. *P<0.05, segons l'anàlisi t-test.

No obstant això, sorprenentment, l'anàlisi histopatològic de les pròstates va deixar palès que el Palbociclib no disminuïa la incidència de les lesions presents, ja que tots els ratolins van presentar hgPIN amb independència del tractament rebut, vehicle o inhibidor.

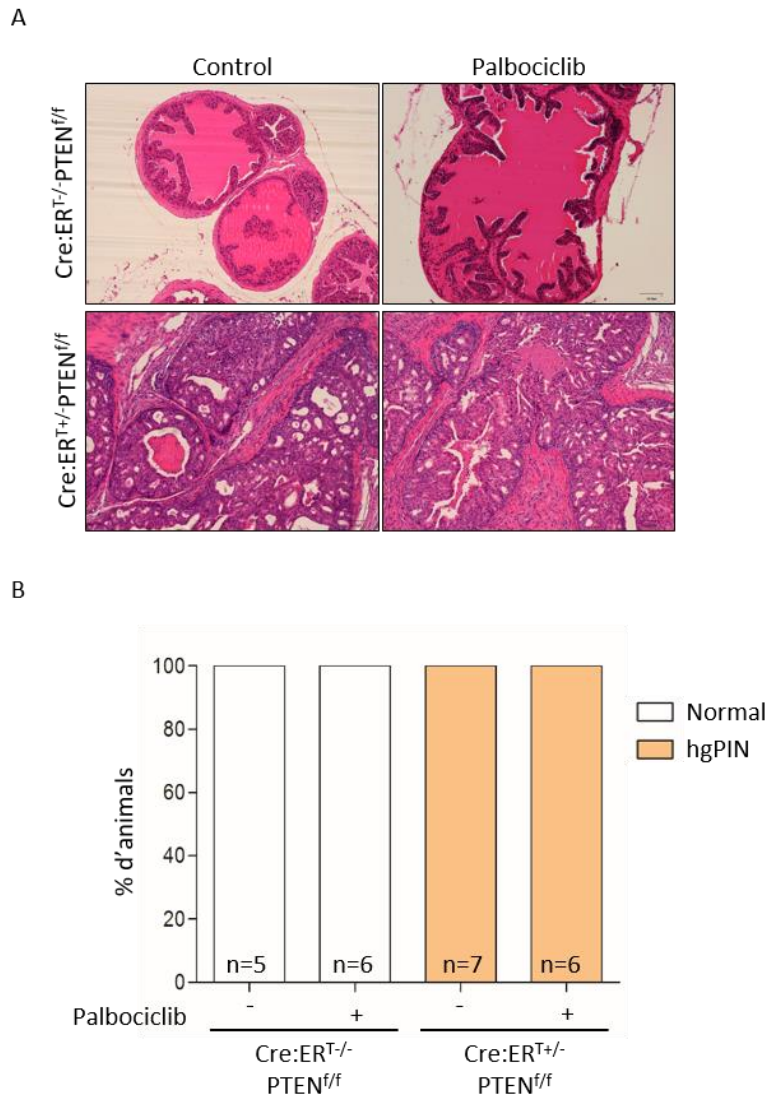


Figura 65: El tractament amb Palbociclib no redueix les neoplàsies de pròstata induïdes per pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de pròstates de ratolins Cre:ERT^{-/-}PTEN^{ff/ff} i Cre:ERT^{+/-}PTEN^{ff/ff} tractats amb vehicle o Palbociclib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat. hgPIN significa *high-grade prostatic intraepithelilla neoplasia*.

De manera anàloga al resultats obtinguts amb les pròstates, novament el Palbociclib no va mostrar efecte terapèutic sobre la histologia de les lesions de les tiroïdes i tots els ratolins van desenvolupar hiperplàsia lleu o severa de tiroïdes, amb independència del grup experimental.

Resultats

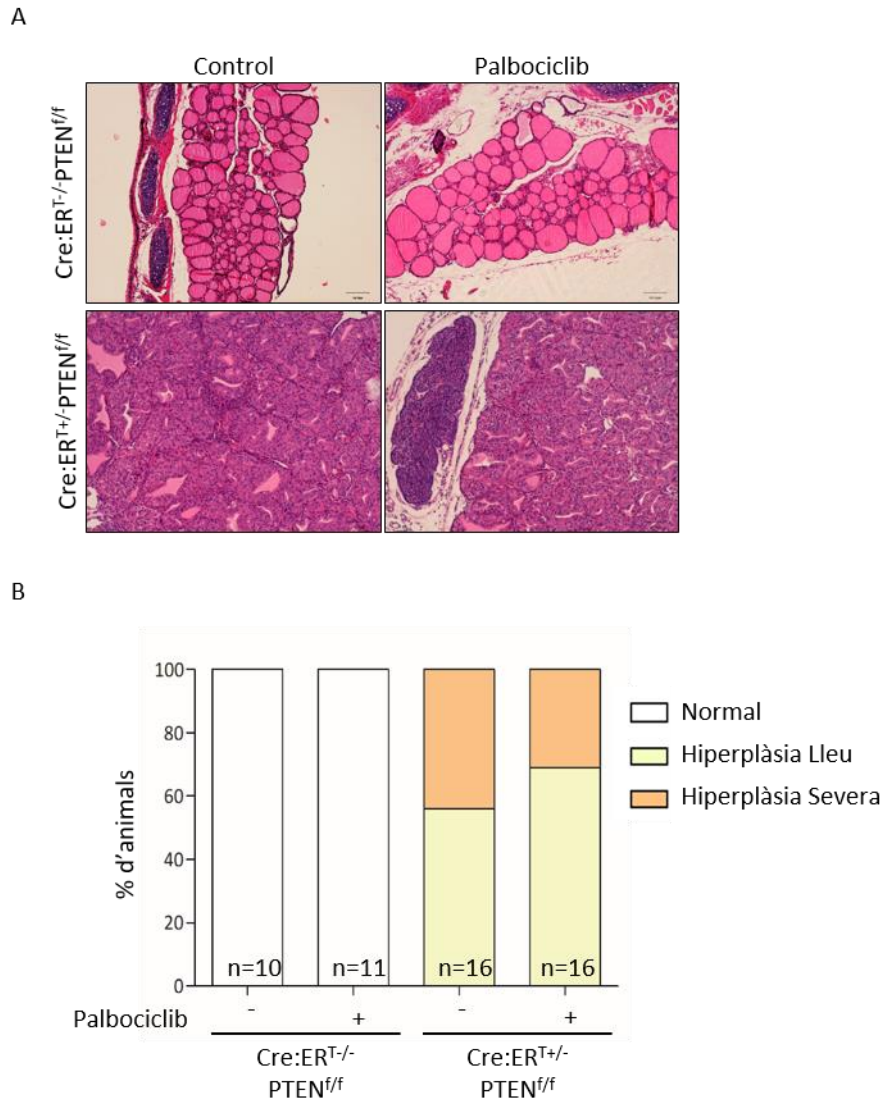


Figura 66: El tractament amb Palbociclib no redueix les hiperplàsies de tiroide induïdes per pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de tiroides de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat.

En conjunt, els nostres resultats indiquen que el Palbociclib no presenta el mateix efecte terapèutic en les diferents patologies d'estudi, malgrat que totes tres s'indueixen per una mutació en comú, la pèrdua de PTEN.

2.7 Les diferents respostes al tractament amb Palbociclib correlacionen amb l'estat de fosforilació de RB en la Serina 780 *in vivo*

Després de comprovar que les tres patologies analitzades, és a dir, les neoplàsies endometrials, les neoplàsies prostàtiques i les hiperplàsies de tiroide, responien de manera diferent al tractament amb Palbociclib *in vivo*, i que per tant, l'eficàcia de l'inhibidor era variable en funció del teixit analitzat, vam decidir estudiar el mecanisme molecular que governava aquest fenomen.

En aquest cas, vam plantejar-nos administrar un tractament agut de Palbociclib als ratolins Cre:ER^{T+/-} PTEN^{ff}. Així, els animals es van tractar només durant tres dies consecutius, a una dosi diària de l'inhibidor de 75, 100 o 150 mg/kg, començant el tractament dues setmanes després de la injecció de Tamoxifè. De nou, els animals controls van rebre vehicle seguint la mateixa pauta d'administració. Els ratolins es van sacrificar 6 hores després de la darrera administració del fàrmac.

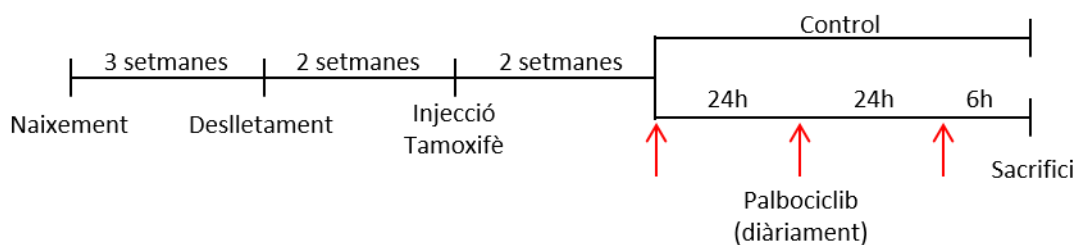


Figura 67: Representació esquemàtica del tractament agut amb Palbociclib *in vivo*. Breument, 2 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè, els animals es comencen a tractar amb Palbociclib, i el fàrmac s'administra només durant tres dies consecutius a tres dosis diferents, 75, 100 o 150 mg/kg. Passat aquest període de temps, els animals se sacrifiquen per al seu posterior anàlisi.

Després del processament de les mostres, es va realitzar, en primer lloc, una immunohistoquímica per avaluar els nivells de fosforilació de la proteïna RB a la Serina 780. Es va comprovar que el tractament agut amb Palbociclib donava lloc a una reducció de l'expressió de p-RB només a l'endometri, amb les tres dosis analitzades. Per contra, l'administració del fàrmac, a qualsevol de les dosis emprades, no va modificar els nivells de p-RB ni a la pròstata ni a la tiroide.

Resultats

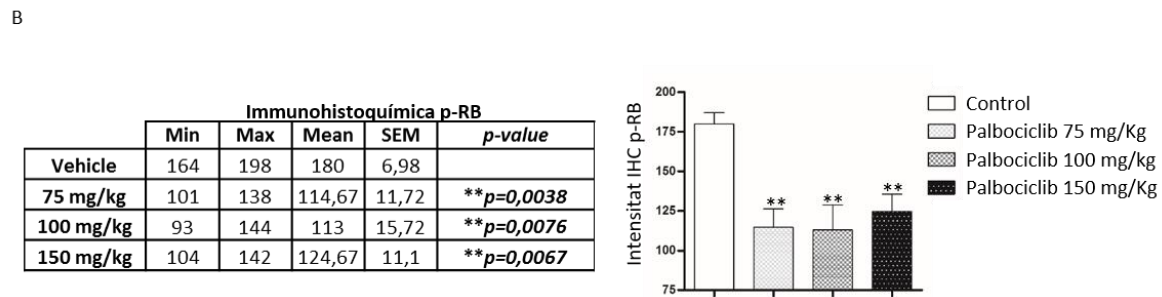
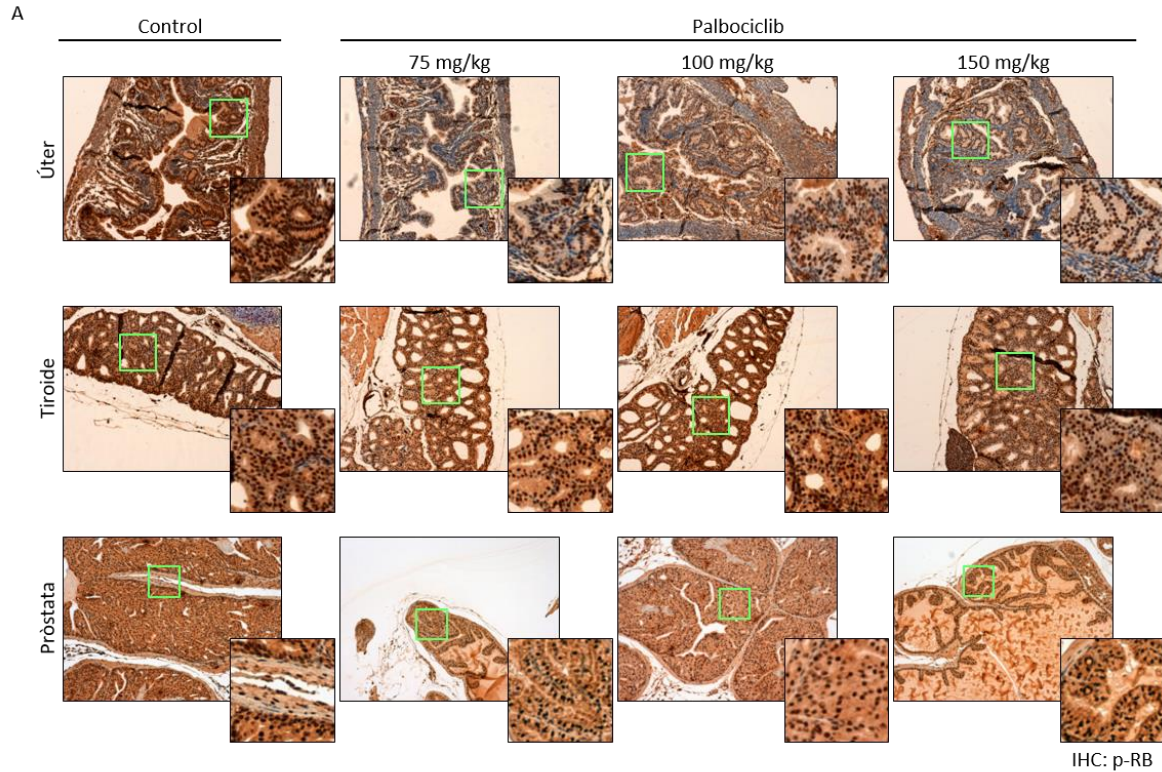


Figura 68: El tractament agut amb Palbociclib disminueix l'expressió de p-RB a l'endometri, però no a la pròstata ni a la tiroide, dels ratolins Cre:ER^{T+}/PTEN^{f/f}. (A) Imatges representatives de la immunohistoquímica de p-RB (Ser780) a endometri (panell superior), tiroide (panell central) i pròstata (panell inferior) de ratolins Cre:ER^{T+}/PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib durant tres dies consecutius i a tres dosis diferents. (B) Quantificació de la immunohistoquímica de p-RB a l'endometri emprant el sistema automàtic ACIS III. Les dades provenen de n=3 de cada grup i els valors s'expressen com la mitjana ± s.e.m. ****P<0.01**, segons l'anàlisi t-test.

Encoratjats per aquestes observacions, vam voler estudiar també l'efecte de tractaments més llargs amb Palbociclib sobre els nivells de p-RB. En aquest cas, i tal com es mostra a la figura 69, l'anàlisi immunohistoquímic va revelar que l'administració de l'inhibidor durant 21 dies no disminuïa l'expressió de p-RB en cap dels tres teixits analitzats.

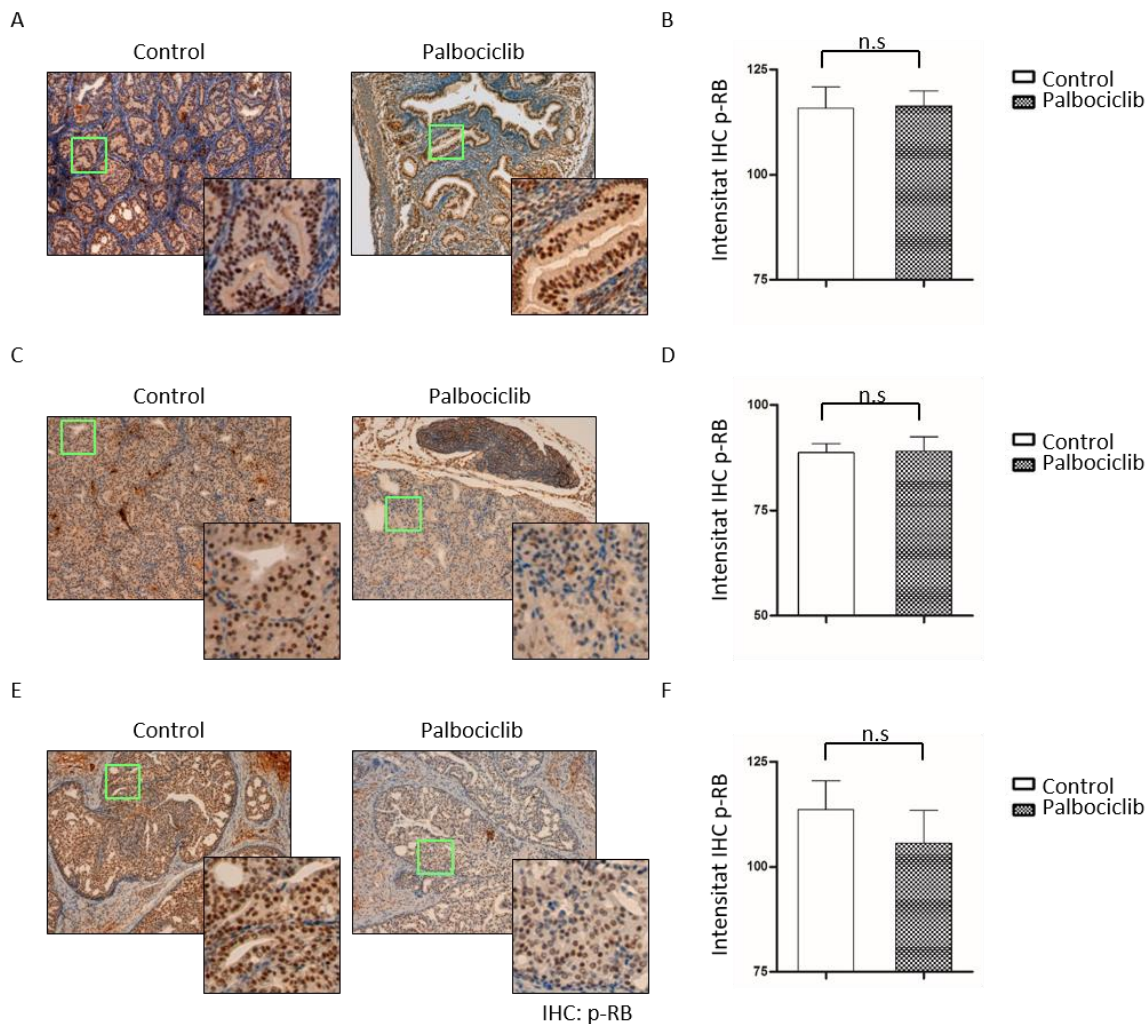


Figura 69: El tractament de 21 dies amb Palbociclib no redueix l'expressió de p-RB. (A, C i E) Imatges representatives de la immunohistoquímica de p-RB (Ser780) a endometri (A), tiroide (C) i pròstata (E) de ratolins Cre:ER^{T+/-}/PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib durant 21 dies. (B,D i F) Quantificació de la immunohistoquímica de p-RB a endometri (B), tiroide (D) i pròstata (F) emprant el sistema automàtic ACIS III. Les dades provenen de n=6 de cada grup i els valors s'expressen com la mitjana \pm s.e.m. No s'observen diferències segons l'anàlisi t-test.

Així doncs, en conclusió, el nivell d'expressió de p-RB només es redueix a l'endometri, i no a la pròstata ni a la tiroide, com a conseqüència d'un tractament agut amb Palbociclib. Per tant, sembla que el fàrmac és capaç de bloquejar d'alguna manera l'axis Ciclina D-CDK4/6 a temps curts. No obstant, l'estat de fosforilació de la proteïna es recupera quan el tractament s'allarga en el temps.

Per tal de trobar una possible explicació a aquest fenomen, vam analitzar per Western blot el nivell d'expressió de diverses proteïnes implicades en senyalització tumoral i cicle cel·lular, en mostres d'endometri de ratolins Cre:ER^{T+/-}/PTEN^{f/f} tractats durant 21 dies amb Palbociclib.

Resultats

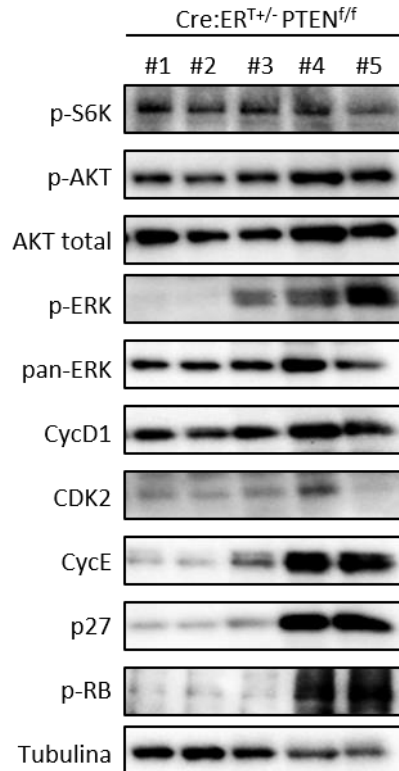


Figura 70: El tractament de 21 dies amb Palbociclib dóna lloc a dos possibles escenaris diferents. Anàlisi per Western blot de l'expressió de diverses proteïnes implicades en senyalització tumoral i cycle cel·lular en mostres d'endometri de ratolins Cre:ER^{T+/-} PTEN^{f/f} tractats durant 21 dies amb Palbociclib (CycD1: Ciclina D1, CycE: Ciclina E).

Sorprenentment, els resultats obtinguts ens van plantejar dos possibles escenaris diferents en funció del nivell d'expressió de determinades proteïnes. Per una banda, algunes femelles presentaven alts nivells de p-ERK, Ciclina D1, Ciclina E, p27 i p-RB. Per l'altra, i en contraposició, la resta de femelles analitzades van mostrar una menor expressió de totes elles, p-ERK, Ciclina D1, Ciclina E, p27 i p-RB. A més, no es van observar diferències en els nivells de p-AKT, p-S6K i CDK2 entre ambdues situacions.

Alguns treballs previs d'altres grups descriuen que en absència d'activitat de l'eix Ciclina D-CDK4/6 i amb baixa activitat dels inhibidors de CDKs, com ara p27, l'eix Ciclina E-CDK2 pot fosforilar RB (Barrière et al., 2007; Geng et al., 2001; Kozar et al., 2004). En conjunt, sembla que els nostres resultats poden encaixar amb aquestes observacions prèvies. Així, encara que el Palbociclib bloqueja l'activitat de l'axis Ciclina D-CDK4/6, les Ciclines D encara poden continuar unint-se a inhibidors de CDKs, permetent així, que el complex Ciclina E-CDK2 fosforili a RB.

2.8 El tractament crònic amb Palbociclib alenteix la progressió de les neoplàsies endometrials originades per pèrdua de PTEN *in vivo*

Una vegada avaluats els beneficis terapèutics que el tractament de 21 dies amb Palbociclib presentava sobre les neoplàsies endometrials deficientes en PTEN, vam voler estudiar la resposta d'aquesta patologia a tractaments crònics amb el fàrmac. De nou, el tractament va començar dues setmanes després de la injecció amb Tamoxifè. En aquest cas, les femelles Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f} van rebre 5 dosis de Palbociclib de 100 mg/kg a la setmana, fins al moment en què van requerir l'eutanàsia. Es va administrar el mateix tractament als ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f} per controlar la toxicitat. Finalment, els animals control van rebre vehicle seguint el mateix esquema.

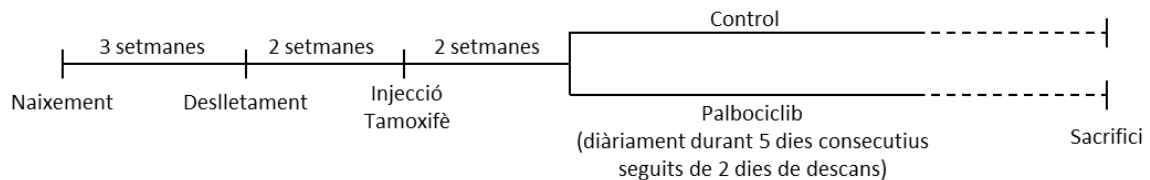


Figura 71: Representació esquemàtica del tractament crònic amb Palbociclib *in vivo*. Breument, 2 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè, els animals es comencen a tractar 5 cops a la setmana amb Palbociclib a una dosi de 100 mg/kg per via oral fins el moment que requereixen l'eutanàsia.

Tal com s'observa a la figura 72, el tractament amb Palbociclib permetia allargar la supervivència de les femelles Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}. La mitjana de supervivència de les femelles tractades amb el fàrmac va ser de 47 dies, mentre que aquest valor es va reduir a 32 dies per als ratolins control. Tots els ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f} tractats amb l'inhibidor es van mostrar actius i sans fins al final de l'experiment, suggerint una bona tolerància als efectes tòxics del fàrmac a la dosi emprada.

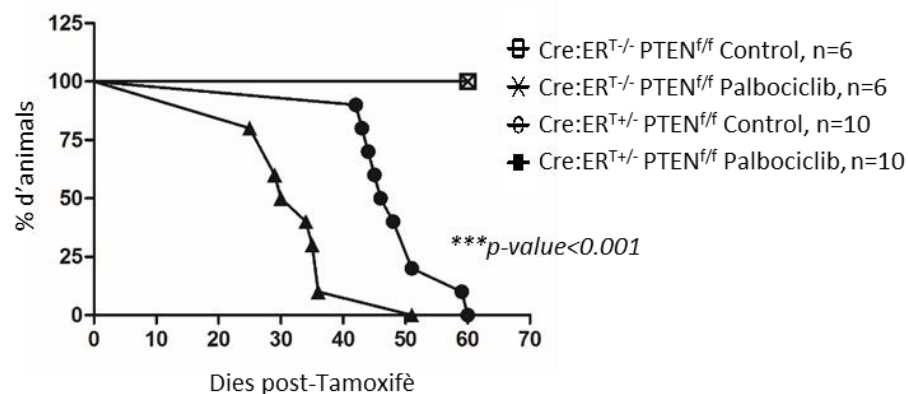


Figura 72: El tractament crònic amb Palbociclib augmenta la supervivència dels animals Cre:ER^{T+/+}-PTEN^{f/f}. Corba de Kaplan-Meier de la supervivència dels 4 grups analitzats. ***P<0.001, mitjançant anàlisi Mantel-Cox.

Resultats

A continuació, la valoració histològica dels úters va revelar que la majoria de les femelles $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ van desenvolupar hiperplàsies complexes i EIN, amb independència del tractament. Per tant, el tractament amb Palbociclib no era suficient per eliminar completament la patologia.

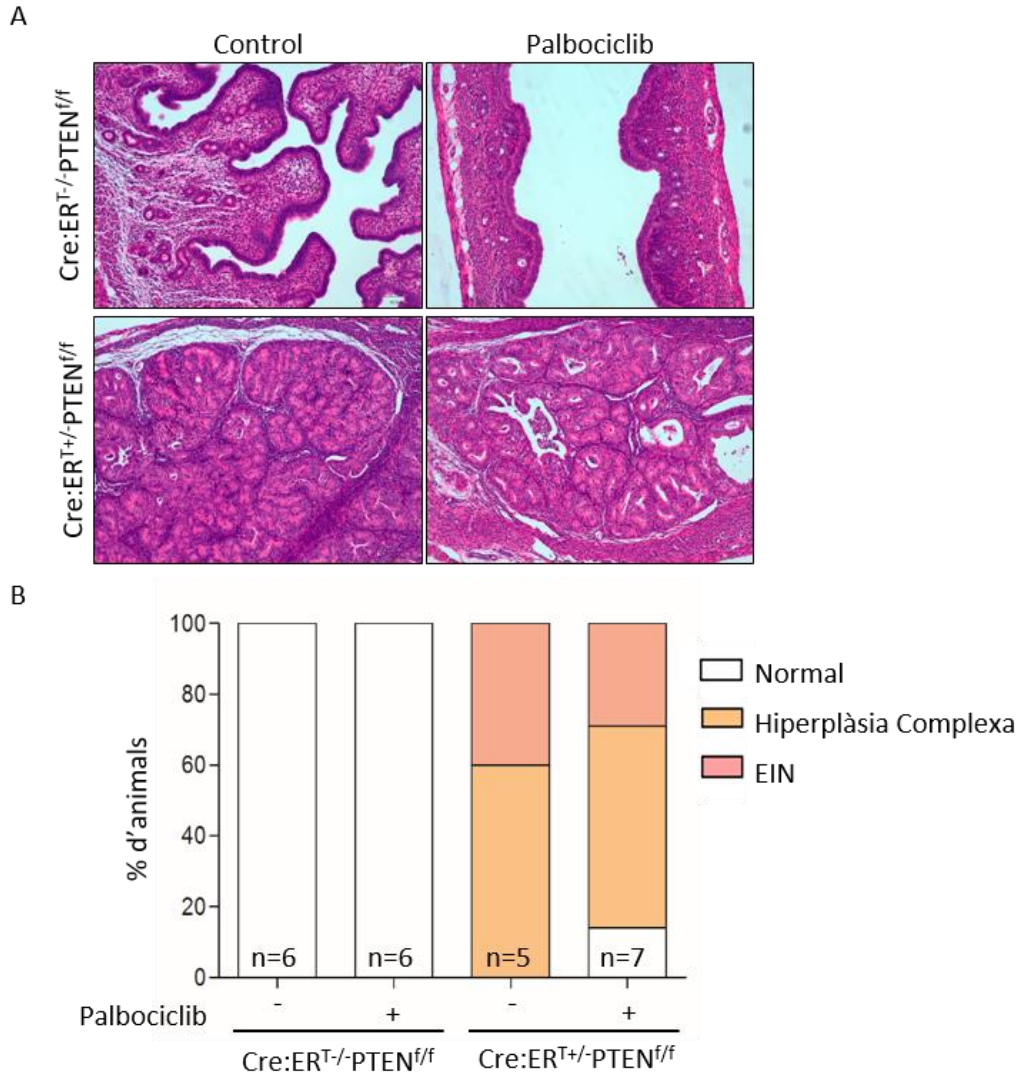


Figura 73: El tractament crònic amb Palbociclib no redueix les neoplàsies d'endometri induïdes per pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E d'endometris de ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ i $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ tractats amb vehicle o Palbociclib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat. EIN significa *endometrial intraepithelial neoplasia*.

Donat que les femelles $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ també desenvolupen hiperplàsia de tiroide, vam avaluar l'efecte del tractament crònic amb Palbociclib sobre aquesta patologia. Segons s'observa a la figura 74, no es van observar diferències macroscòpiques ni histològiques entre les tiroides dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}$ tractats amb vehicle o amb Palbociclib.

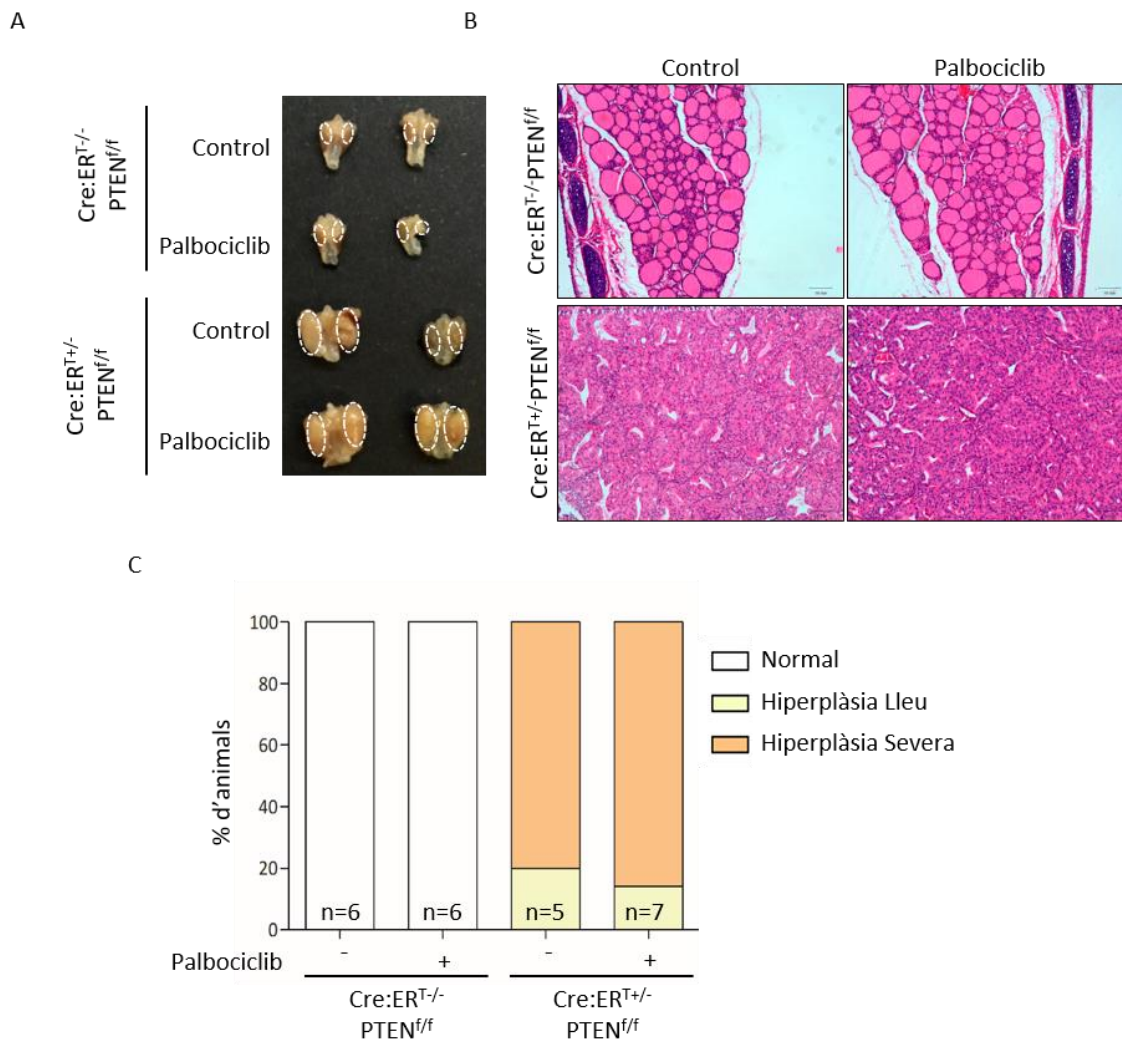


Figura 74: El tractament crònic amb Palbociclib no redueix les hiperplàsies de tiroide induïdes per pèrdua de PTEN. (A) Imatges macroscòpiques de les tiroïdes de ratolins Cre:ER^T/-PTEN^{f/f} i Cre:ER^T+/-PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Imatges representatives de la tinció amb H-E de les tiroïdes de ratolins amb genotip Cre:ER^T/-PTEN^{f/f} i Cre:ER^T+/-PTEN^{f/f} tractats amb vehicle o Palbociclib (10x). (C) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat.

Per tant, en conjunt, els nostres resultats suggereixen que el tractament amb Palbociclib presenta només un efecte terapèutic beneficiós en les neoplàsies d'endometri, alentint el seu desenvolupament i progressió. D'aquesta manera, permet incrementar així la supervivència dels ratolins. No obstant, l'administració de Palbociclib no causa la regressió de la patologia.

Resultats

2.9 El Palbociclib redueix la proliferació *in vitro* de les línies cel·lulars humanes de carcinoma endometrial

Alguns treballs de la literatura descriuen que el Palbociclib redueix la proliferació de múltiples línies cel·lulars humanes tumorals (Fry et al., 2004). Per això, després de demostrar l'efecte antitumoral del fàrmac en les neoplàsies endometrials deficientes en PTEN en un model de ratolí, vam voler determinar el seu potencial terapèutic en diferents models humans de carcinoma d'endometri.

Així doncs, primerament, es van tractar dues línies cel·lulars humanes de carcinoma d'endometri, HEC-1A i MFE-296, amb dosis creixents de Palbociclib durant 48 hores i a continuació, es va avaluar la seva viabilitat amb un assaig MTT. Les dues línies analitzades van mostrar sensibilitat al tractament de manera dosi dependent.

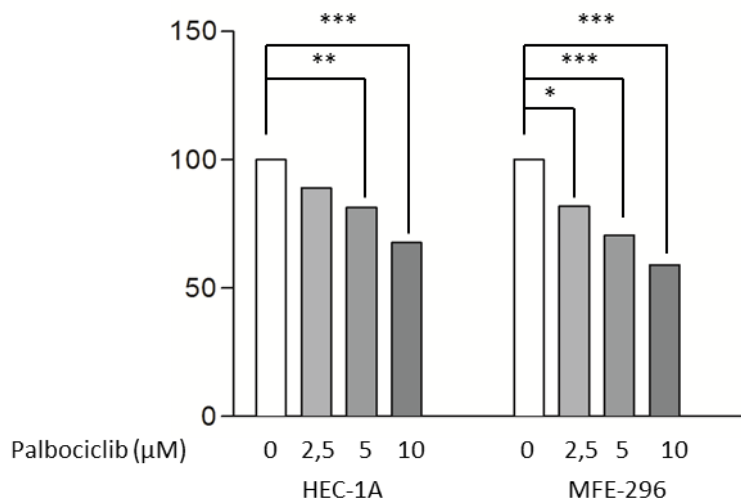


Figura 75: El tractament amb Palbociclib disminueix la viabilitat de les línies humanes de càncer d'endometri *in vitro*. Les dues línies cel·lulars es van tractar amb concentracions creixents de Palbociclib durant 48 hores. La viabilitat cel·lular es va mesurar amb l'assaig MTT. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni.

A continuació, les mateixes cèl·lules HEC-1A i MFE-296 es van tractar amb dues dosis diferents de l'inhibidor (5 i 10 µM) durant 48 h per tal de dur a terme l'anàlisi de distribució de cicle cel·lular emprant el citòmetre de flux. Es va observar que ambdues línies tractades amb el fàrmac es trobaven aturades a la fase G1 del cicle cel·lular, de manera que semblava que el Palbociclib evitava l'entrada de les cèl·lules a la fase S.

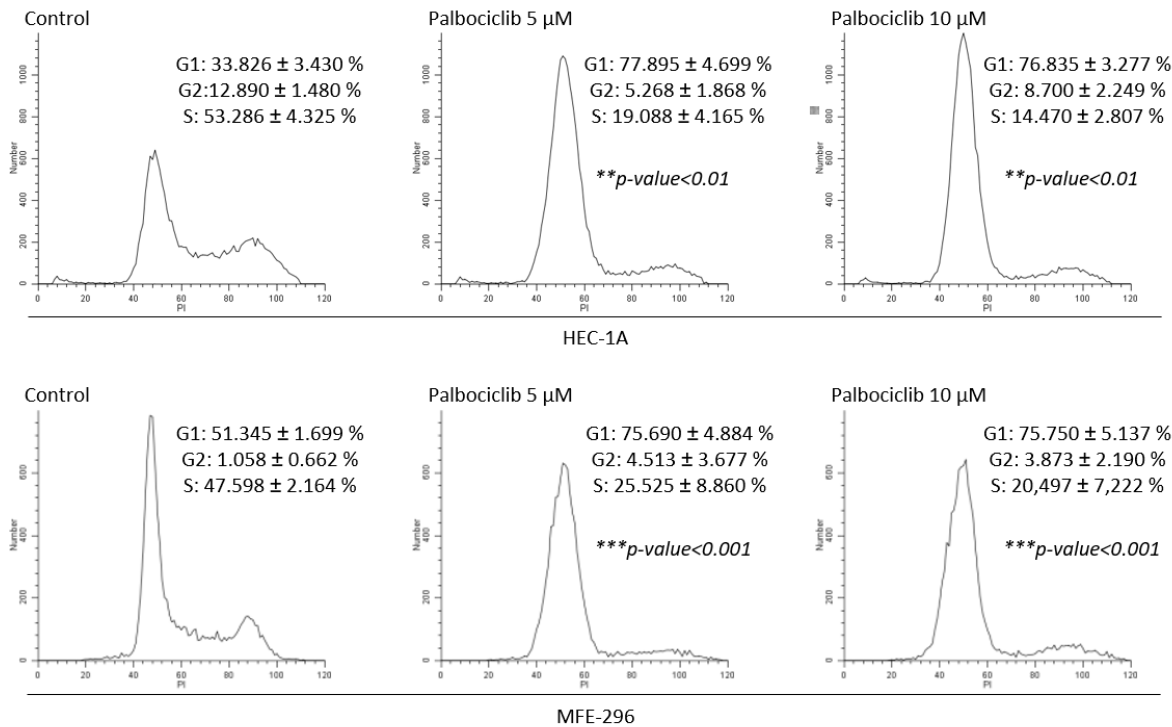
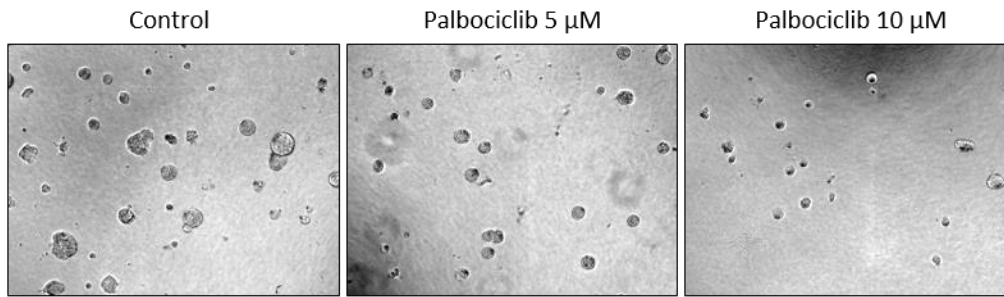


Figura 76: El tractament amb Palbociclib indueix aturada en fase G1 del cicle cel·lular. (A) Després de 48 h de tractament amb Palbociclib a les dosis de 5 i 10 µM, les cèl·lules HEC-1A i MFE-296 es tenyeixen amb iodur de propidi per avaluar el contingut de DNA amb citometria de flux. Els resultats provenen de tres experiments diferents. **P<0.01 ***P<0.001, mitjançant anàlisi one-way ANOVA, seguit del test de Tukey per comparacions múltiples.

Finalment, es va establir un cultiu tridimensional amb les cèl·lules HEC-1A, que es va tractar amb Palbociclib a dues dosis diferents, 5 i 10 µM, durant 48 hores. Passat aquest temps, es van mesurar els diàmetres dels esferoides de les diferents condicions, i com es mostra a la figura 77, es va observar que els esferoides analitzats presentaven una reducció significativa de la mida glandular de manera dosi dependent amb el tractament amb Palbociclib. Aquest experiment no es va poder realitzar amb la línia cel·lular MFE-296, ja que aquestes cèl·lules no creixen en tres dimensions sobre el Matrigel®, sinó que s'expandeixen pel llit, colonitzant-lo.

Resultats

A



B

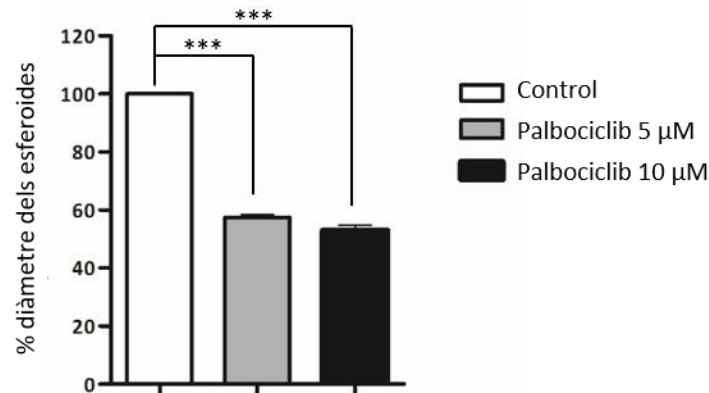


Figura 77: El tractament amb Palbociclib disminueix el diàmetre dels esferoides de línia cel·lular HEC-1A en cultiu tridimensional. (A) Imatges representatives de contrast de fase de cultius 3D de la línia cel·lular HEC-1A tractats o no amb Palbociclib (5 i 10 μM) durant 48 hores. (B) Mesura dels diàmetres dels esferoides. Les dades provenen de n=3 experiments independents. Els valors es presenten com la mitjana \pm s.e.m. ***P<0.001, mitjançant anàlisi one-way ANOVA, seguit del test de Tukey per comparacions múltiples.

En conjunt, els resultats d'aquests experiments deixen palès que el Palbociclib exerceix un efecte antiproliferatiu *in vitro* en les línies humanes de carcinoma d'endometri.

2.10 El Palbociclib redueix el creixement de les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri *in vivo*

Un cop demostrat l'efecte antiproliferatiu que el Palbociclib exerceix sobre les línies cel·lulars d'endometri *in vitro*, vam voler analitzar l'activitat d'aquest fàrmac sobre les mateixes línies *in vivo*, aprofitant que les cèl·lules HEC-1A i MFE-296 són capaces de generar *xenografts* quan s'injecten en ratolins immunodeprimits SCID.

Així doncs, les cèl·lules es van injectar de manera subcutània a l'esquena dels ratolins SCID i es va anar monitoritzant el creixement tumoral setmanalment, fins que els xenografts van assolir una mida de 100 mm³. Arribats en aquest punt, els ratolins portadors d'aquests tumors es van començar a tractar amb Palbociclib. L'inhibidor es va administrar diàriament durant 15 dies per via oral i a una dosi de 150 mg/kg.

Com es pot observar en a les figura 78 i 79, els tumors establerts amb ambdues línies cel·lulars HEC-1A i MFE-296 en ratolins tractats amb Palbociclib presentaven un volum menor en comparació amb els que no havien rebut el fàrmac. A més, la reducció del creixement tumoral observada correlacionava perfectament amb una disminució de la tinció del marcador de proliferació Ki-67.

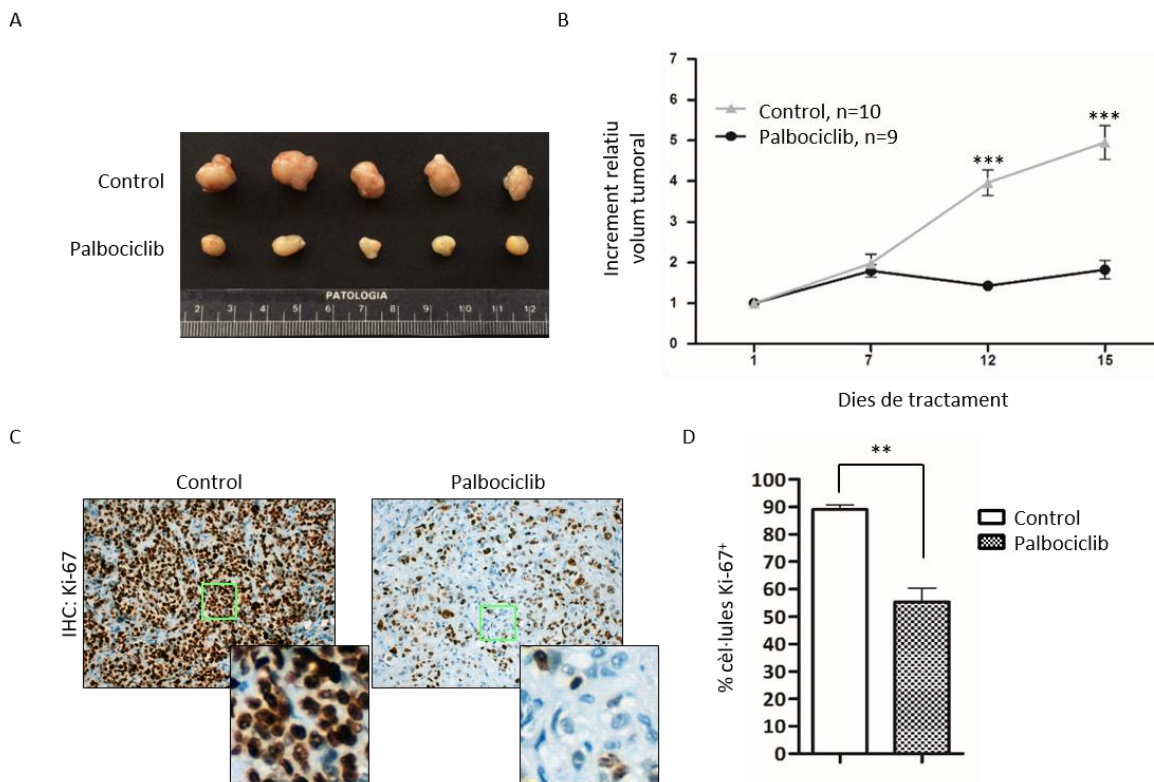


Figura 78: El tractament amb Palbociclib redueix el creixement *in vivo* dels tumors subcutanis establerts amb les línies cel·lulars d'endometri HEC-1A. Els animals SCID portadors dels tumors subcutanis es van tractar amb 150 mg/kg de Palbociclib diàriament durant 15 dies. (A) Comparació de tumors establerts amb HEC-1A tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Gràfica del creixement tumoral en el temps de tumors de cèl·lules HEC-1A. *** $P < 0.001$, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni. (C) Imatges representatives de la tinció amb Ki-67 dels tumors subcutanis de HEC-1A provinents de ratolins tractats amb vehicle o Palbociclib. (D) Quantificació de la tinció de Ki-67 en els tumors establerts amb la línia cel·lular HEC-1A. Les dades provenen de $n=4$ animals per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana \pm s.e.m. ** $P < 0.01$, segons anàlisi t-test.

Resultats

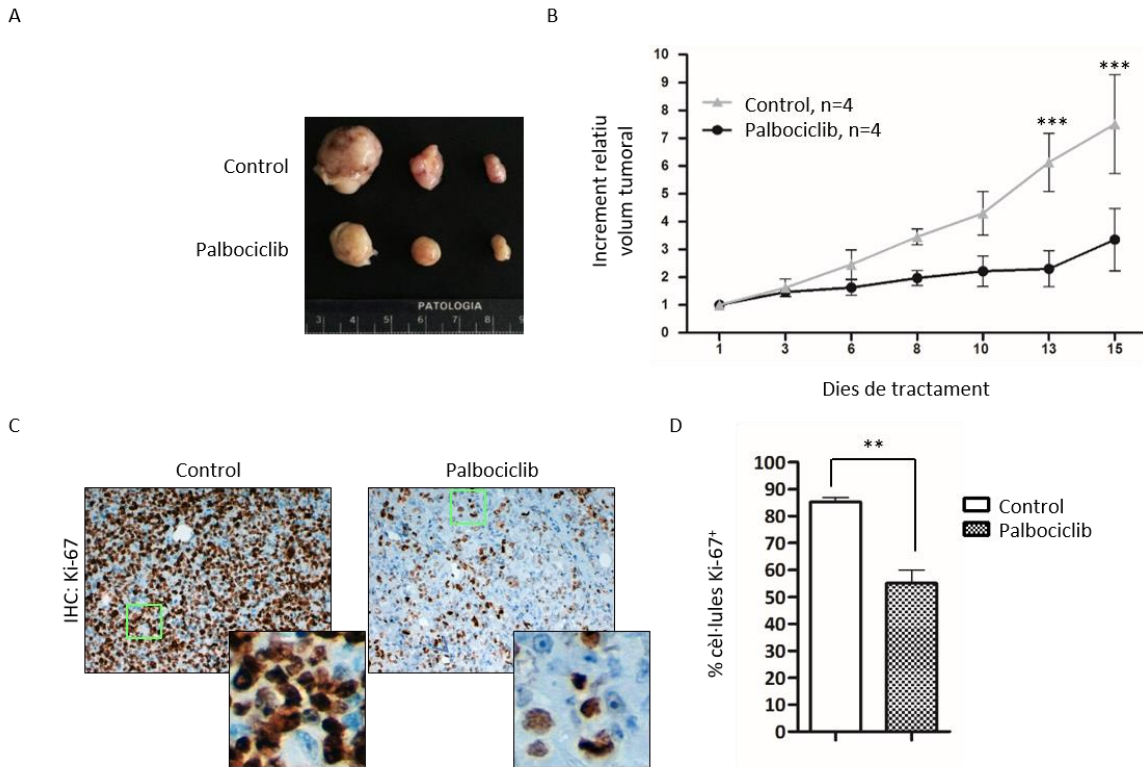


Figura 79: El tractament amb Palbociclib redueix el creixement *in vivo* dels tumors subcutanis establerts amb les línies cel·lulars d'endometri MFE-296. Els animals SCID portadors dels tumors subcutanis es van tractar amb 150 mg/kg de Palbociclib diàriament durant 15 dies. (A) Comparació de tumors establerts amb MFE-296 tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Gràfica del creixement tumoral en el temps de tumors de cèl·lules MFE-296. *** $P < 0.001$, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni. (C) Imatges representatives de la tinció amb Ki-67 dels tumors subcutanis de MFE-296 provinents de ratolins tractats amb vehicle o Palbociclib. (D) Quantificació de la tinció de Ki-67 en els tumors establerts amb la línia cel·lular MFE-296. Les dades provenen de $n=4$ animals per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana \pm s.e.m. ** $P < 0.01$, segons anàlisi t-test.

Per tant, aquests resultats indiquen que el Palbociclib inhibeix el creixement dels tumors subcutanis desenvolupats per les cèl·lules HEC-1A i MFE-296 quan s'injecten en ratolins SCID.

2.11 El Palbociclib presenta un efecte antitumoral en el càncer d'endometri humà

Un cop definit l'efecte antitumoral que el Palbociclib presenta en el carcinoma d'endometri amb diversos models animals i línies cel·lulars tumorals humanes, vam voler fer un pas enllà per testar l'eficàcia del fàrmac en aquesta patologia emprant un model de PDX (*patient-derived tumor xenografts*). Aquesta aproximació representa un model pre-clínic més avançat que ofereix resultats més acurats i predictius pel que fa al resultat clínic de la teràpia, i permet superar així, les limitacions dels models pre-clínics tradicionals respecte a la transferència dels resultats. Així doncs, es va generar

un PDX amb l'establiment de tumors subcutanis a partir d'una mostra humana primària de carcinoma endometrial endometriode deficient per PTEN.

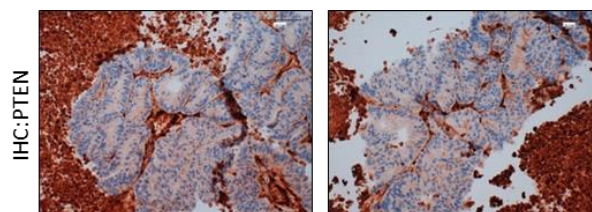


Figura 80: Mostra humana del carcinoma endometrial endometriode deficient per PTEN emprat per establir els PDXs. Imatges representatives de la tinció per PTEN.

Primerament, es van establir els xenografs trasplantant subcutàniament petites peces del tumor en femelles de ratolí Swiss nude, i la mida dels tumors es va monitoritzar fins que van assolir un volum de 200 mm³. En aquest moment, es va començar el tractament amb l'inhibidor, que va ser administrat diàriament durant 10 dies, a una dosi de 150 mg/kg per via oral.

Tal com es pot observar a la figura 81, el tumors establerts en ratolins tractats amb Palbociclib presentaven un volum menor en comparació amb els no tractats.

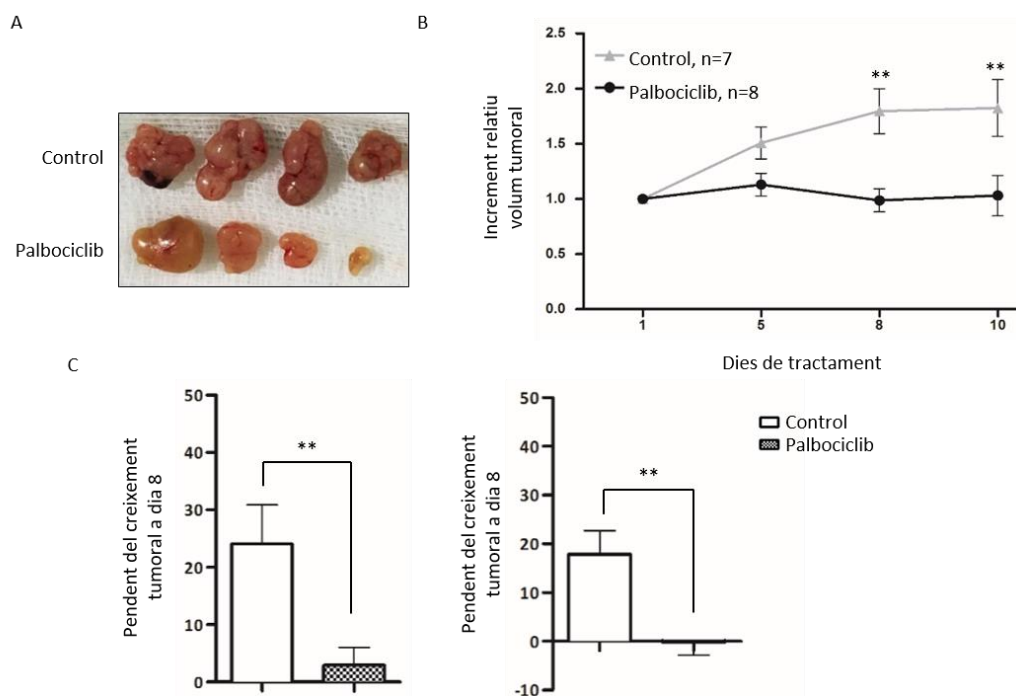


Figura 81: El tractament amb Palbociclib redueix el creixement in vivo dels tumors PDX. Els animals portadors dels tumors subcutanis es van tractar amb 150 mg/kg de Palbociclib diàriament durant 10 dies. (A) Comparació representativa dels tumors tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Gràfica del creixement tumoral dels PDXs en el temps. **P<0.01, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni. (C) Pendent del creixement tumoral a dia 8 i 10 del tractament. **P<0.01, mitjançant anàlisi t-test.

Resultats

A més, aquesta reducció observada en el creixement tumoral correlacionava perfectament amb una disminució de la taxa de proliferació, tal com es va comprovar mitjançant la tinció de Ki-67.

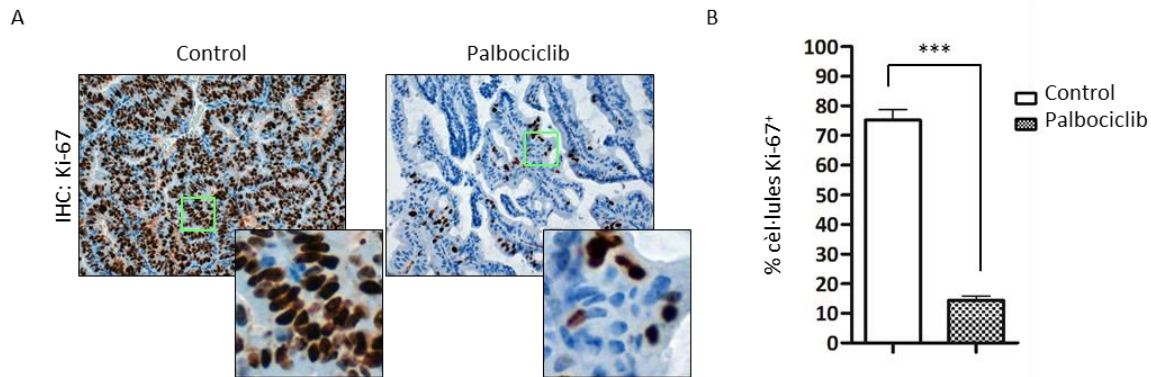


Figura 82: El tractament amb Palbociclib disminueix l'expressió de Ki-67 en els PDXs. (A) Imatges representatives de la tinció amb Ki-67 dels tumors PDX provinents de ratolins tractats amb vehicle o Palbociclib. (B) Quantificació de la tinció de Ki-67 en els PDXs establerts. Les dades provenen de n=3 animals per a cada grup i els valors s'expressen com la mitjana ± s.e.m. ***P<0.001, segons anàlisi t-test.

Finalment, es va determinar també, mitjançant anàlisi immunohistoquímic, que els tumors dels ratolins tractats amb el fàrmac no experimentaven una reducció dels nivells de p-RB després de 10 dies de tractament en comparar-los amb els tumors dels ratolins tractats amb el vehicle.

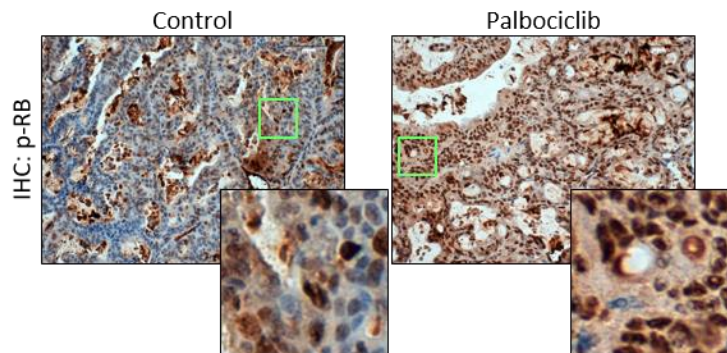


Figura 83: El tractament de 10 dies amb Palbociclib no redueix l'expressió de p-RB. Imatges representatives de la immunohistoquímica de p-RB (Ser780) als PDXs tractats amb vehicle o Palbociclib.

Per tant, els resultats obtinguts amb el model PDX permeten concloure novament que el tractament amb el fàrmac Palbociclib és capaç d'inhibir el creixement dels tumors endometrials.

3. Avaluació de l'efecte de l'inhibidor multiquinasa Regorafenib en el tractament de tumors sòlids deficients per PTEN

3.1 El tractament amb Regorafenib redueix la viabilitat *in vitro* de línies cel·lulars de càncer d'endometri, pròstata i tiroide

Treballs anteriors del nostre grup van demostrar que les línies de càncer d'endometri humanes eren sensibles al tractament amb l'inhibidor multiquinasa Sorafenib (Llobet et al., 2010). Seguint aquesta línia d'estudi, vam decidir estudiar l'efecte d'un nou inhibidor multiquinasa anomenat Regorafenib. Ambdós fàrmacs es troben estructuralment relacionats i presenten un perfil bioquímic similar però no idèntic (Strumberg and Schultheis, 2012).

Així doncs, ens vam plantejar testar l'eficàcia del Regorafenib en les línies cel·lulars d'endometri, i també en línies de càncer de tiroide i pròstata, per tal de poder comparar les respostes entre els diferents tipus tumorals. Amb aquest motiu, es van tractar cèl·lules MFE-296, IK, Cal-62, FTC-133 i R'A amb dosis creixents de Regorafenib durant 48 hores, i es va avaluar la viabilitat cel·lular emprant un assaig MTT. Les cinc línies cel·lulars estudiades van mostrar sensibilitat al tractament amb l'inhibidor de manera dosi dependent.

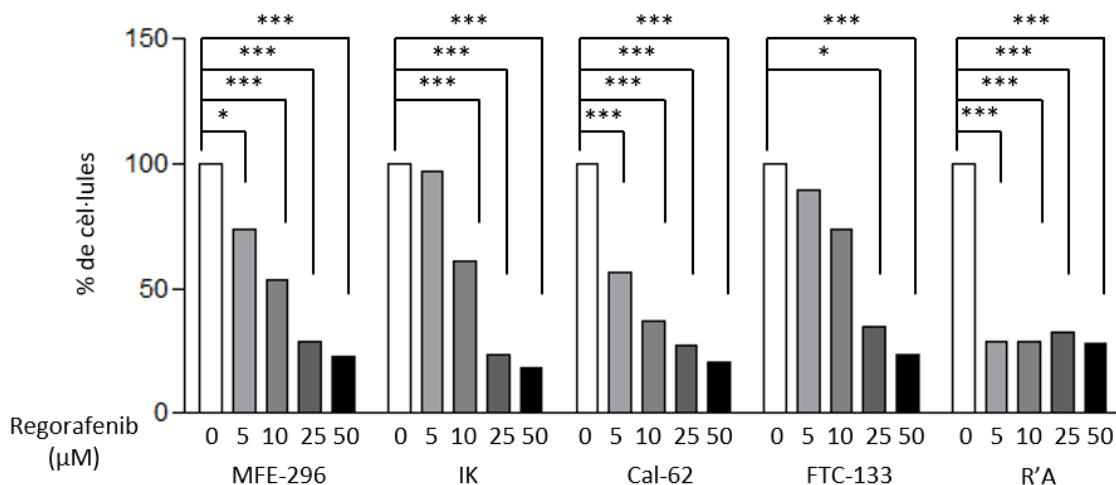


Figura 84: El tractament amb Regorafenib disminueix la viabilitat de les línies cel·lulars de càncer d'endometri, tiroide i pròstata *in vitro*. Les diferents línies cel·lulars es van tractar amb concentracions creixents de Regorafenib durant 48 hores. La viabilitat cel·lular es va mesurar amb l'assaig MTT. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni.

Resultats

3.2 El tractament amb Regorafenib disrupta la senyalització de la via PI3K/AKT en les línies de càncer d'endometri, tiroide i pròstata *in vitro*

A continuació, després de comprovar que totes les línies analitzades presentaven sensibilitat al Regorafenib, vam voler caracteritzar l'efecte d'aquest tractament a nivell molecular. Donat que els receptors tirosina quinasa, dianes del Regorafenib, són els principals activadors de la via PI3K/AKT vam pensar que l'inhibidor podria estar provocant alteracions en la senyalització d'aquesta via.

Per estudiar-ho, es van tractar les mateixes línies cel·lulars amb dosis creixents de l'inhibidor durant 16 hores, i es va analitzar l'expressió de diversos components de la via de senyalització PI3K/AKT i d'altres proteïnes relacionades per Western blot.

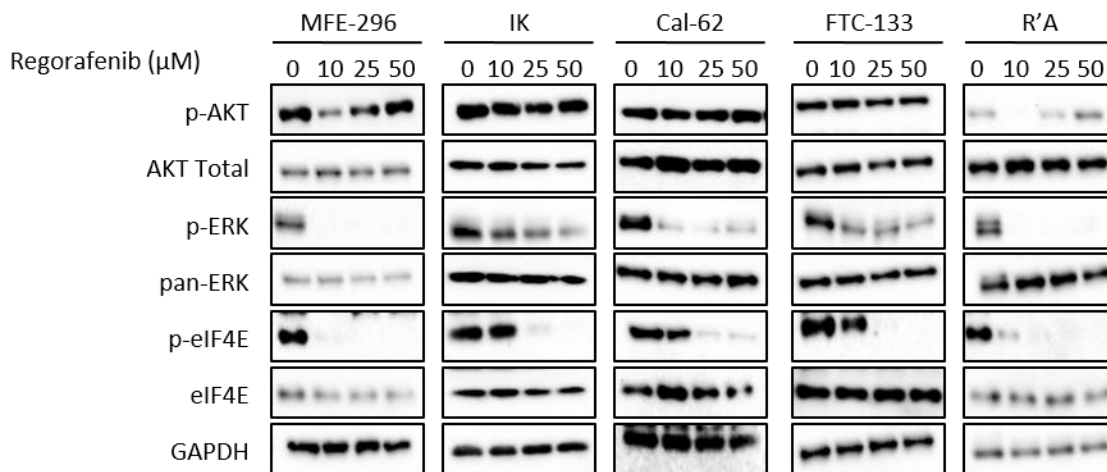


Figura 85: El tractament amb Regorafenib induïx una disminució dels nivells de p-ERK i p-eIF4E *in vitro* en línies de càncer d'endometri, tiroide i pròstata. Les diferents línies cel·lulars van ser tractades amb concentracions creixents de Regorafenib durant 16 hores. Tot seguit, es va avaluar l'efecte del fàrmac sobre diferents components de vies de senyalització cel·lular importants en carcinogènesi mitjançant Western blot. La GAPDH s'empra com a control de càrrega.

Tal com es mostra a la figura 85, el tractament amb Regorafenib causava una disruptió de la via en les cinc línies cel·lulars, bàsicament a través de p-eIF4E, tot i que l'efecte no era idèntic en totes elles. Així doncs, la fosforilació d'eIF4E va disminuir de manera dràstica amb el tractament amb Regorafenib, fins i tot a la dosi més baixa, a les cèl·lules MFE-296 i R'A. A més, en aquestes dues línies cel·lulars també es va observar una davallada dels nivells de p-AKT a la dosi de 10 μM, tot i que es recuperava l'expressió a dosis superiors. La resta de línies cel·lulars, IK, Cal-62 i FTC-133, també van experimentar una disminució en els nivells de p-eIF4E, principalment a 25 i 50 μM. No obstant, la fosforilació d'AKT no va patir alteracions en cap de les tres darreres línies analitzades.

Per altra banda, també es va observar que l'administració de Regorafenib donava lloc a una davallada en els nivells de p-ERK, que seguia un patró similar al observat per a p-eIF4E. En les cèl·lules MFE-296 i R'A es produïa una disminució completa de l'expressió de la forma fosforilada d'ERK, mentre que en IK, Cal-62 i FTC-133 aquest efecte no era total a cap de les dosis testades.

En conjunt, aquests resultats ens suggereixen que el Regorafenib causa una disrupció de la via PI3K/AKT sobretot a través de la reducció de l'expressió de p-eIF4E. No obstant, no es tracta de l'únic mecanisme molecular implicat, ja que el tractament amb l'inhibidor també podria estar alterant altres vies de senyalització, com es pot deduir de la disminució dels nivells de p-ERK.

3.3 El tractament amb Regorafenib *in vivo* redueix la hiperplàsia de tiroide causada per la deficiència en PTEN, però no presenta efecte terapèutic en les neoplàsies de pròstata i endometri induïdes per la pèrdua del gen

Després de demostrar l'eficàcia *in vitro* del Regorafenib sobre les línies cel·lulars de càncer d'endometri, pròstata i tiroide, i de comprovar l'efecte inhibitori del tractament sobre la via de senyalització PI3K/AKT, vam decidir avaluar el seu potencial terapèutic *in vivo* emprant el model *knock-out* de *Pten* induïble per Tamoxifè (Cre:ER^TPTEN^{f/f}) (Mirantes et al., 2013). Donat que aquests ratolins presenten una hiperactivació de la via PI3K/AKT com a conseqüència de la pèrdua de PTEN, vam pensar que el tractament amb Regorafenib, i la conseqüent inhibició dels receptors tirosina quinasa, podria presentar un avantatge terapèutic sobre les patologies tumorals que desenvolupen aquests animals: hiperplàsia de tiroide i neoplàsia prostàtica i endometrial.

Així doncs, per aquest treball, es van emprar tant mascles com femelles Cre:ER^T-PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+}-PTEN^{f/f}, i l'esquema experimental que es va seguir es mostra a la figura 86. Com es pot veure, cinc setmanes després del naixement dels ratolins, es va injectar Tamoxifè als animals per tal d'induir la deleció de PTEN, i tres setmanes després, es va començar el tractament amb el fàrmac. El Regorafenib es va administrar diàriament per via oral a una dosi de 60 mg/kg durant 21 dies consecutius. Passat aquest temps, els animals van ser sacrificats per al seu posterior anàlisi macroscòpic i anatomopatològic.

Resultats

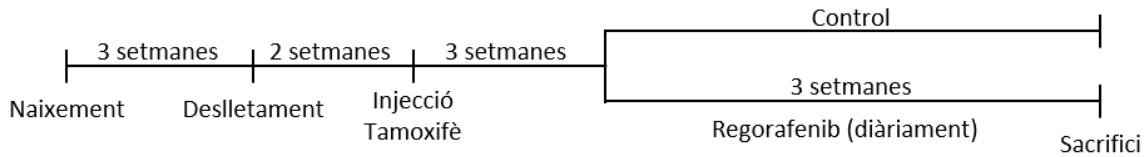


Figura 86: Representació esquemàtica del tractament amb Regorafenib *in vivo*. Breument, 3 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè, els animals es comencen a tractar diàriament amb Regorafenib a una dosi de 60 mg/kg per via oral durant 21 dies. Passat aquest període de temps, els animals se sacrifiquen per al seu posterior anàlisi.

En primer lloc, l'anàlisi macroscòpic dels animals va revelar que el tractament amb Regorafenib donava lloc a una important reducció en la mida i el pes de les tiroides dels ratolins Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}. De fet, les tiroides deficientes en PTEN tractades amb el fàrmac eren molt similars, en quant a pes i mida, a les dels ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f}, i que per tant, conservaven l'expressió del gen.

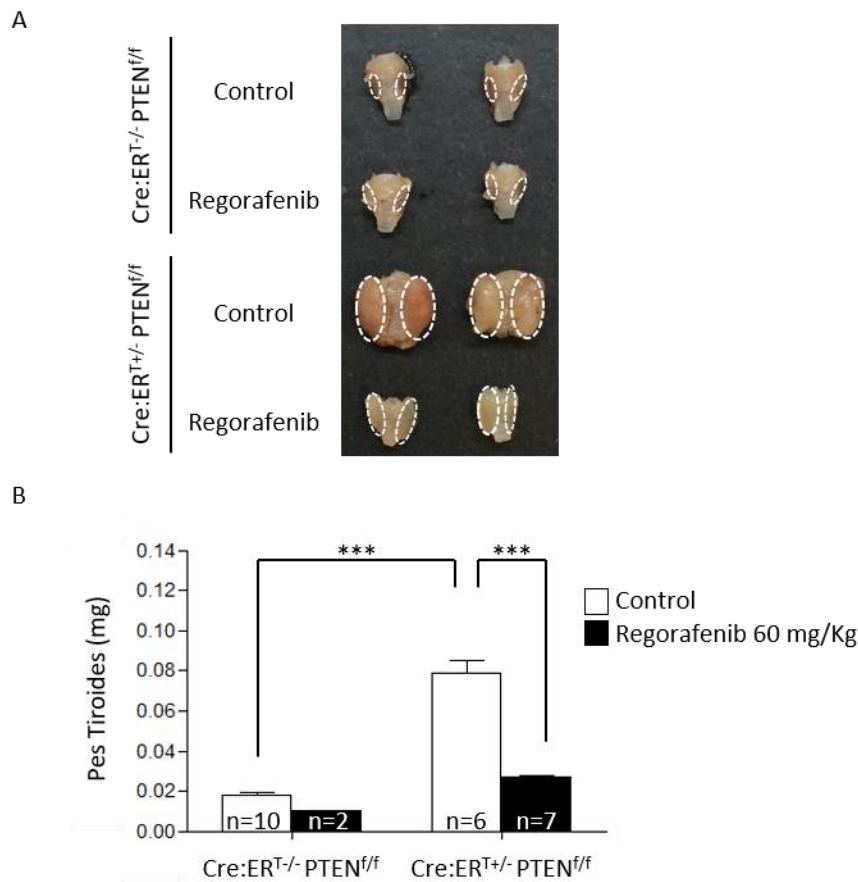


Figura 87: El tractament amb Regorafenib redueix la mida de la tiroide en ratolins Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}. (A) Imatges representatives de les tiroides de ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib. (B) Quantificació del pes de les tiroides. ***P<0.001, mitjançant anàlisi two-way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni.

Després de l'anàlisi macroscòpic, les tiroïdes es van incloure en parafina per a la seva posterior avaluació histopatològica, i es va confirmar que el tractament amb Regorafenib disminuïa la incidència de les lesions hiperplàsiques de la tiroide originades per la pèrdua de PTEN en els ratolins Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{ff}.

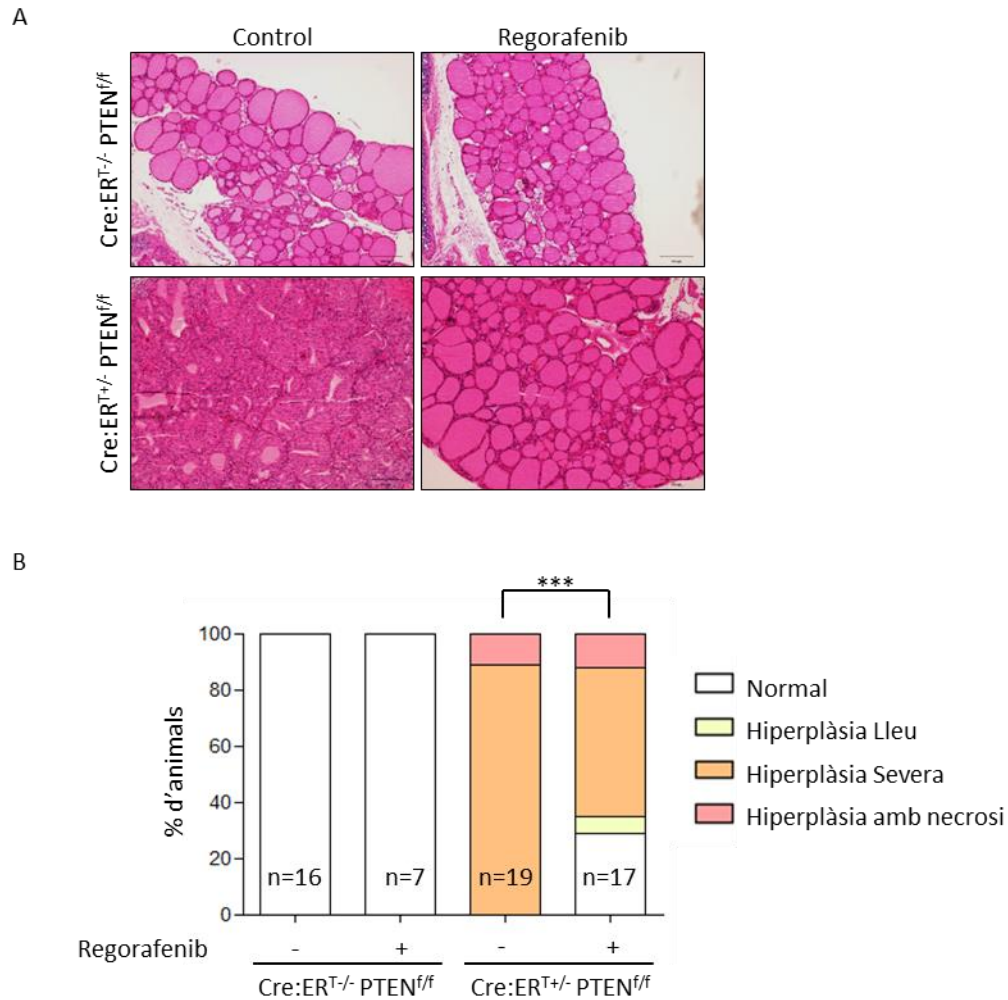


Figura 88: El tractament amb Regorafenib redueix la hiperplàsia de tiroide induïda per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de tiroïdes de ratolins Cre:ER^{T-/-}-PTEN^{ff} i Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{ff} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. ***P<0.001, mitjançant anàlisi Chi quadrat.

Donat que els animals Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{ff} també desenvolupen neoplàsia de pròstata o d'endometri, a més d'hiperplàsia de tiroide, vam voler estudiar també l'efecte del Regorafenib en aquestes dues patologies.

Resultats

En primer lloc, en el cas dels mascles, gràcies a l'avaluació histopatològica es va poder comprovar que el Regorafenib no reduïa el grau de les lesions existents a les pròstates deficientes per PTEN.

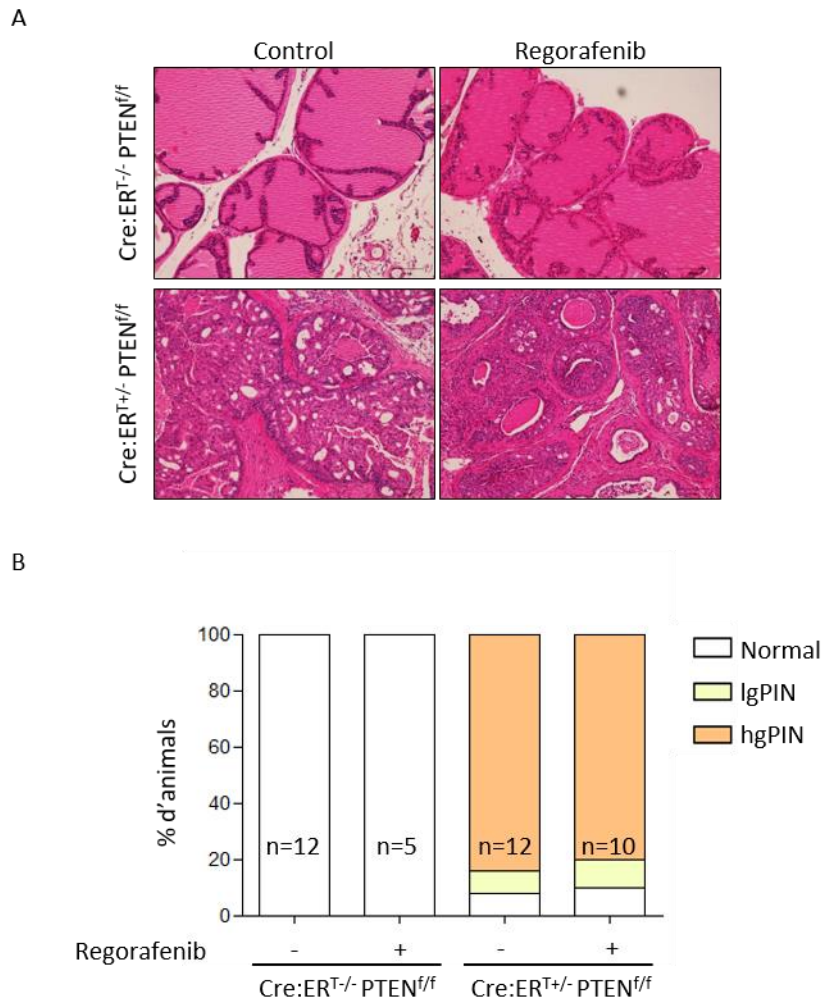


Figura 89: El tractament amb Regorafenib no redueix les neoplàsies de pròstata induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de pròstates de ratolins Cre:ERT^{-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ERT^{+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat. IgPIN significa *low-grade protatic intraepithelial neoplasia* i hgPIN, *high-grade protatic intraepithelial neoplasia*.

Finalment, es van estudiar els úters de les femelles Cre:ERT^{+/-}PTEN^{f/f} tractades amb Regorafenib. De nou, i de manera anàloga als resultats obtinguts per a les pròstates, tal com s'observa a la figura 90 no es van detectar diferències en el diagnòstic de les lesions.

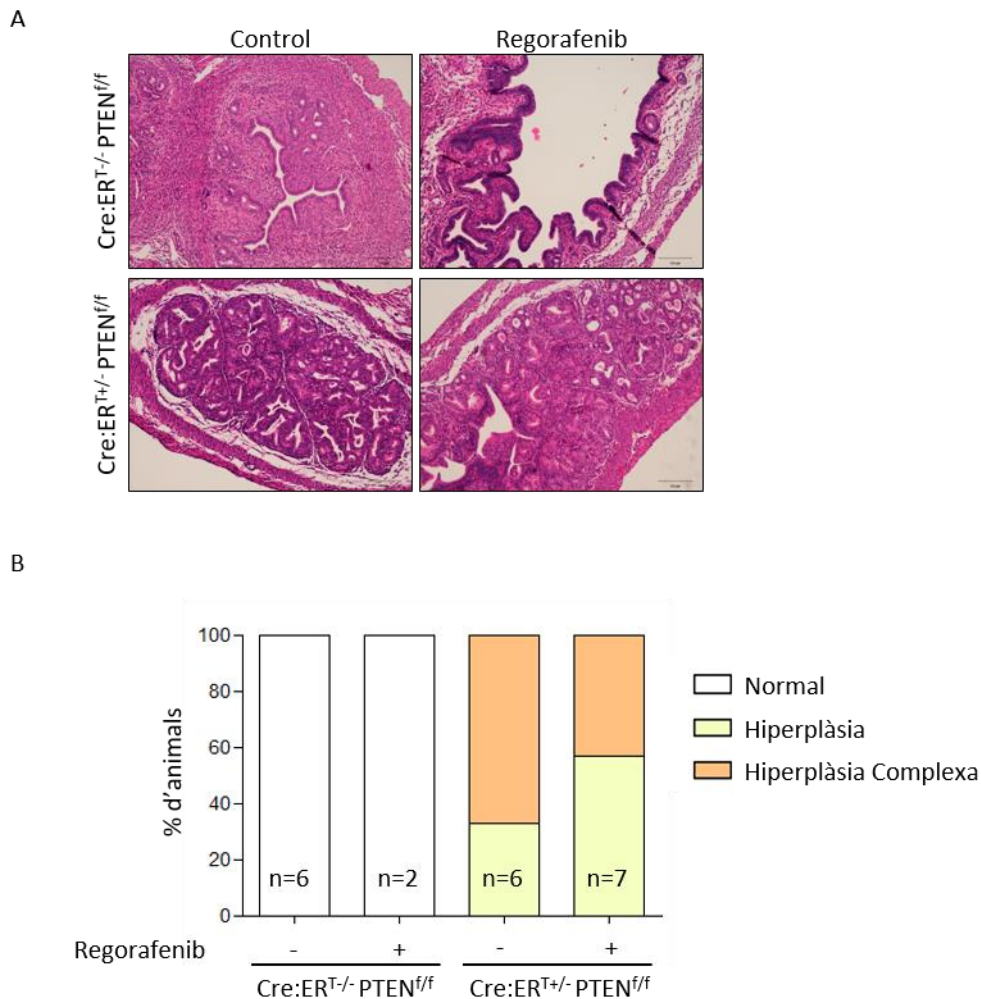


Figura 90: El tractament amb Regorafenib no redueix les neoplàsies endometrials originades per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E d'endometris de ratolins femella Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat.

És important remarcar que en tots aquests experiments es van emprar ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} tractats amb Regorafenib com a control de toxicitat. Després de 21 dies de tractament, el fàrmac va presentar certs nivells de toxicitat tant en els ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} com en els experimentals, que revertia negativament sobre l'estat físic dels animals.

En conjunt, els nostres resultats suggereixen que l'efecte terapèutic del Regorafenib és diferent en funció del tipus tumoral estudiat, encara que les lesions s'indueixin per la mateixa mutació, la pèrdua de PTEN.

3.4 El tractament amb Regorafenib no dóna lloc a la disrupció de la via de senyalització PI3K/AKT *in vivo*

Un cop analitzats els efectes del Regorafenib en el model Cre:ER^TPTEN^{ff}, vam voler caracteritzar l'acció del fàrmac en la senyalització de la via PI3K/AKT *in vivo*, per tal de determinar si es reproduïen els mateixos resultats obtinguts en els experiments *in vitro*. Així, vam analitzar per Western blot l'expressió i activació dels principals components de la via i d'altres proteïnes relacionades a partir de llisats de tiroide, pròstata i úter de ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{ff} tractats o no amb Regorafenib durant 21 dies.

Tal com es mostra a la figura 91, en avaluar l'efecte del Regorafenib sobre la via PI3K/AKT es va comprovar que el tractament amb l'inhibidor no disminuïa l'expressió de la forma fosforilada d'eIF4E a la tiroide, suggerint que el Regorafenib no causa la disrupció de la via PI3K/AKT *in vivo* seguint el mateix patró observat *in vitro*. A més, no es van observar diferències remarcables entre els tres teixits d'interès. Per tant, aquests resultats no van proporcionar una possible explicació per a la diferent activitat terapèutica de l'inhibidor sobre les lesions diagnosticades a tiroide, pròstata i endometri.

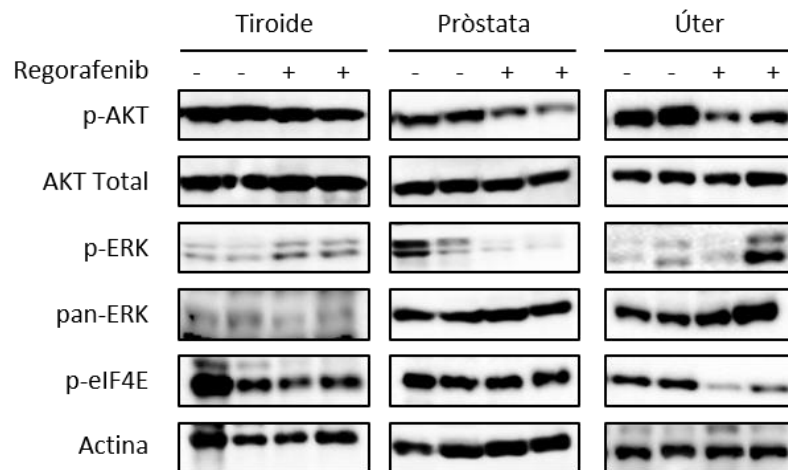


Figura 91: El tractament amb Regorafenib no provoca la disrupció de la via PI3K/AKT ni en les hiperplàsies de tiroide ni en les neoplàsies de pròstata i d'endometri induïdes per la pèrdua de PTEN. Després del tractament de 21 dies, les tiroïdes, les pròstates i els úters dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{ff} control o tractats amb el fàrmac es van dissecar i processar per tal d'analitzar l'expressió de diverses proteïnes implicades en senyalització tumoral per Western blot. L'actina s'empra com a control de càrrega.

Finalment, per mitjà de la immunohistoquímica, es va comprovar que les tiroïdes dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{ff} tractats amb Regorafenib presentaven nivells inferiors de Ciclina D1 en comparar-les

amb les tiroïdes dels seus respectius controls. Pel contrari, aquesta reducció en l'expressió de la Ciclina D1 no s'observava ni a les pròstates ni als endometris dels ratolins Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f} tractats amb l'inhibidor multiquinasa.

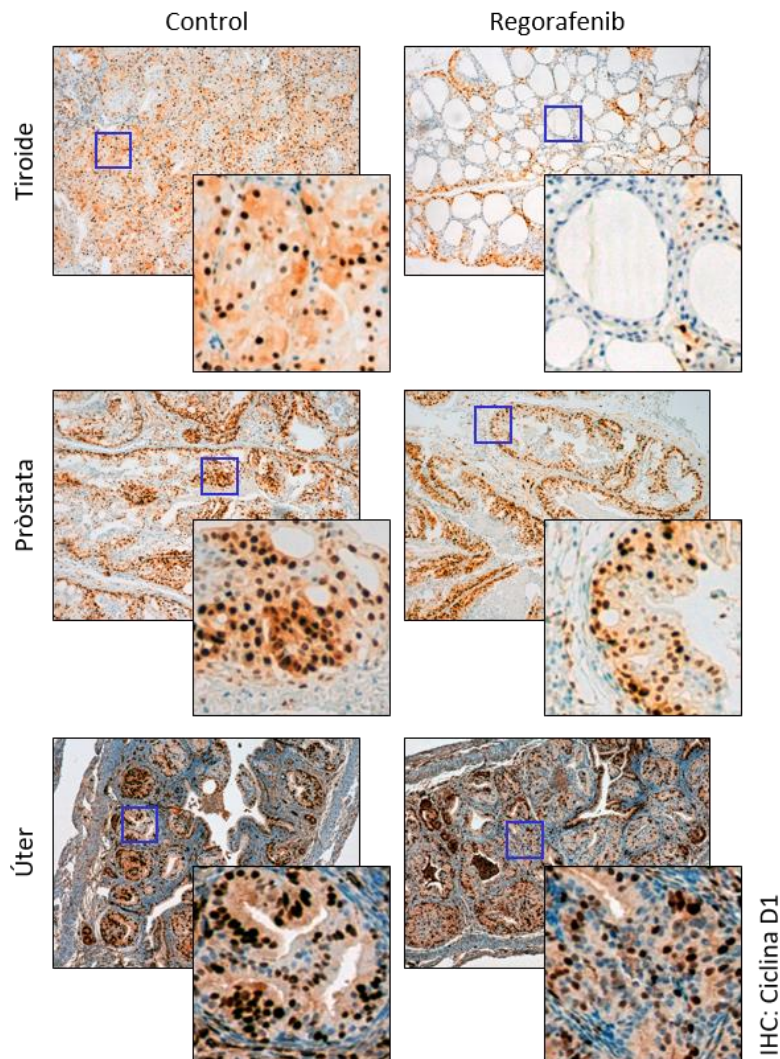


Figura 92: El tractament amb Regorafenib indueix una disminució de l'expressió de la Ciclina D1 en les hiperplàsies de tiroïdes induïdes per la pèrdua de PTEN. Imatges representatives de la tinció de Ciclina D1 a tiroïde, pròstata i úter dels ratolins Cre:ER^{T+/+}PTEN^{f/f} control o tractats amb el fàrmac durant 21 dies (10x).

Per tant, en els nostres resultats deixen entreveure que els mecanismes pels quals el Regorafenib pot exercir el seu efecte *in vitro* poden ser diferents en el model de ratolí *in vivo*, especialment a les tiroïdes, on s'hi observa una millora histològica deguda al tractament. El Regorafenib podria exercir un efecte antiproliferatiu en aquest teixit, i no a pròstata i endometri, que a més, sembla no ser conduït exclusivament per la via PI3K/AKT.

3.5 El tractament amb Regorafenib no elimina les hiperplàsies de tiroide causades per la pèrdua de PTEN

Després de caracteritzar el potencial terapèutic del Regorafenib a curt termini sobre les hiperplàsies de tiroide, vam plantejar-nos avaluar l'efecte, a llarg termini, del tractament de 21 dies. D'aquesta manera, per una banda, aquest experiment ens permetria conèixer l'efecte global d'un tractament curt amb Regorafenib sobre la supervivència dels animals i per l'altra, determinar si el fàrmac era capaç de causar la mort de les cèl·lules tumorals, i per tant, d'eliminar la malaltia.

La pauta d'administració seguida es detalla a la figura 93, i és molt similar al que ja s'havia fet anteriorment. Així, breument, tres setmanes després d'induir la deleció de PTEN amb la injecció de Tamoxifè, es va començar el tractament amb Regorafenib. Els animals van rebre una dosi diària de 60 mg/kg de l'inhibidor per via oral durant 21 dies. A partir d'aquest moment, es va aturar el tractament i els animals es van mantenir amb vida, tot monitoritzant l'estat físic dels ratolins, fins que van requerir l'eutanàsia. Val a dir que aquest experiment només es va realitzar amb mascles, donat que els efectes sobre la tiroide eren anàlegs en ambdós sexes.

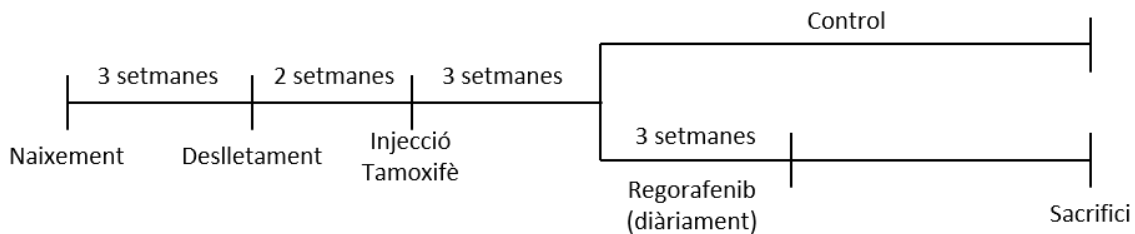


Figura 93: Representació esquemàtica del protocol experimental seguit per avaluar l'efecte a llarg termini del tractament amb Regorafenib durant 21 dies. De manera anàloga a la figura 85, 3 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè, els animals es comencen a tractar diàriament amb Regorafenib a una dosi de 60 mg/kg per via oral durant 21 dies. En aquest cas, passat aquest període de temps, els animals es mantenen sense tractament i amb vida fins que el seu estat de salut requereix l'eutanàsia.

Un cop finalitzat l'experiment, es va poder comprovar en primer lloc que el tractament de 21 dies amb Regorafenib no era suficient per incrementar la supervivència global dels ratolins Cre:ER^{T+/+} PTEN^{f/f}.

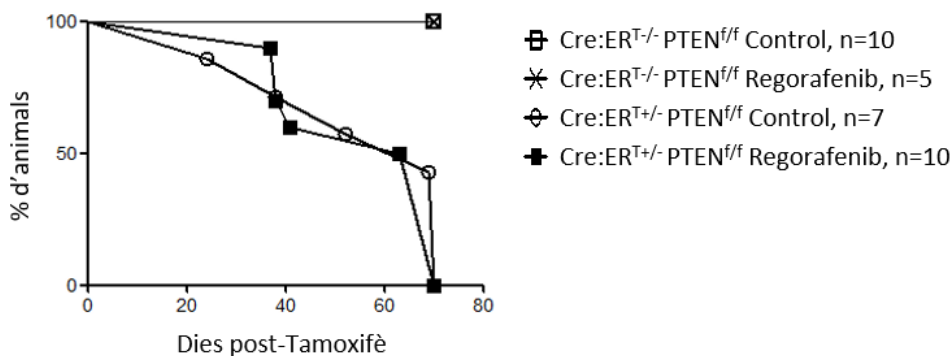


Figura 94: El tractament durant 21 dies amb Regorafenib no incrementa la supervivència dels animals Cre:ER^T/+PTEN^{f/f} a llarg termini. Corba de Kaplan-Meier que mostra la supervivència dels quatre grups analitzats. No s'observen diferències significatives segons el test estadístic Mantel-Cox.

A continuació, a nivell macroscòpic, es va comprovar que la mida de les tiroïdes i les pròstates dels ratolins Cre:ER^T/+PTEN^{f/f} que havien rebut tractament durant 21 dies amb l'inhibidor era comparable a la obtinguda en els animals del grup control. A més, no es van observar alteracions en la mida de les tiroïdes i les pròstates dels animals Cre:ER^T/-PTEN^{f/f}, i que per tant, conservaven l'expressió de PTEN, tractats o no amb Regorafenib.

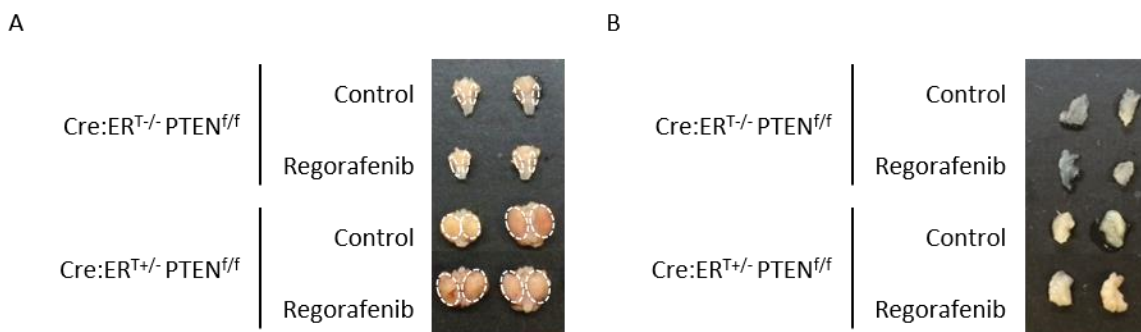


Figura 95: El tractament de 21 dies amb Regorafenib no redueix la mida de les tiroïdes ni de les pròstates a llarg termini. (A) Imatges representatives de les tiroïdes de ratolins Cre:ER^T/-PTEN^{f/f} i Cre:ER^T/+PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib. (B) Imatges representatives de les pròstates de ratolins Cre:ER^T/-PTEN^{f/f} i Cre:ER^T/+PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib.

A continuació, es va dur a terme l'estudi histopatològic gràcies a les tincions d'hematoxilina-eosina, i es comprova que si bé el tractament amb Regorafenib reduïa les lesions de la tiroide a curt termini, no era suficient per eliminar completament les hiperplàsies de tiroide originades per la pèrdua de PTEN. En el moment del sacrifici, no es van observar diferències remarcables en el diagnòstic de les lesions desenvolupades en els ratolins Cre:ER^T/+PTEN^{f/f} tractats o no amb l'inhibidor durant 21 dies.

Resultats

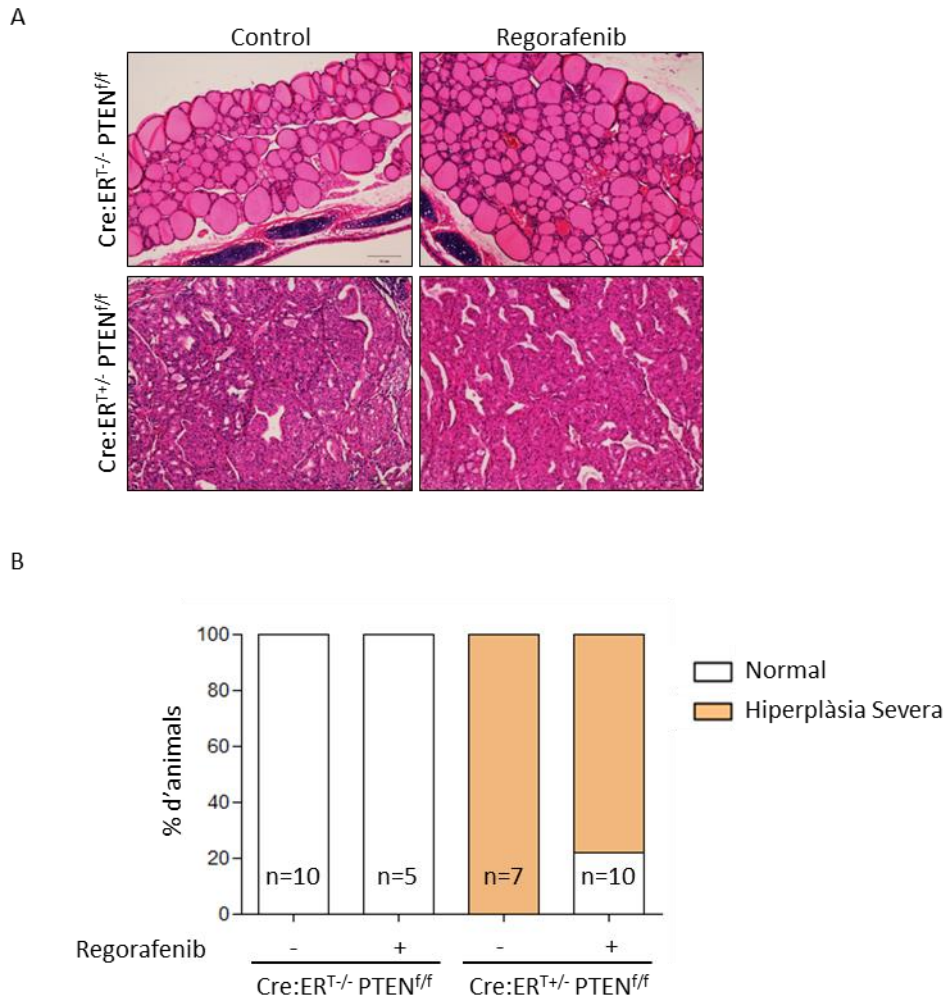


Figura 96: El tractament de 21 dies amb Regorafenib no disminueix, a llarg termini, les lesions hiperplàsiques de la tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de les tiroïdes de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat.

Finalment, i com era d'esperar donats els antecedents amb el fàrmac, segons s'observa a la figura 97 es va determinar que el Regorafenib tampoc reduïa el grau de les lesions diagnosticades a les pròstates.

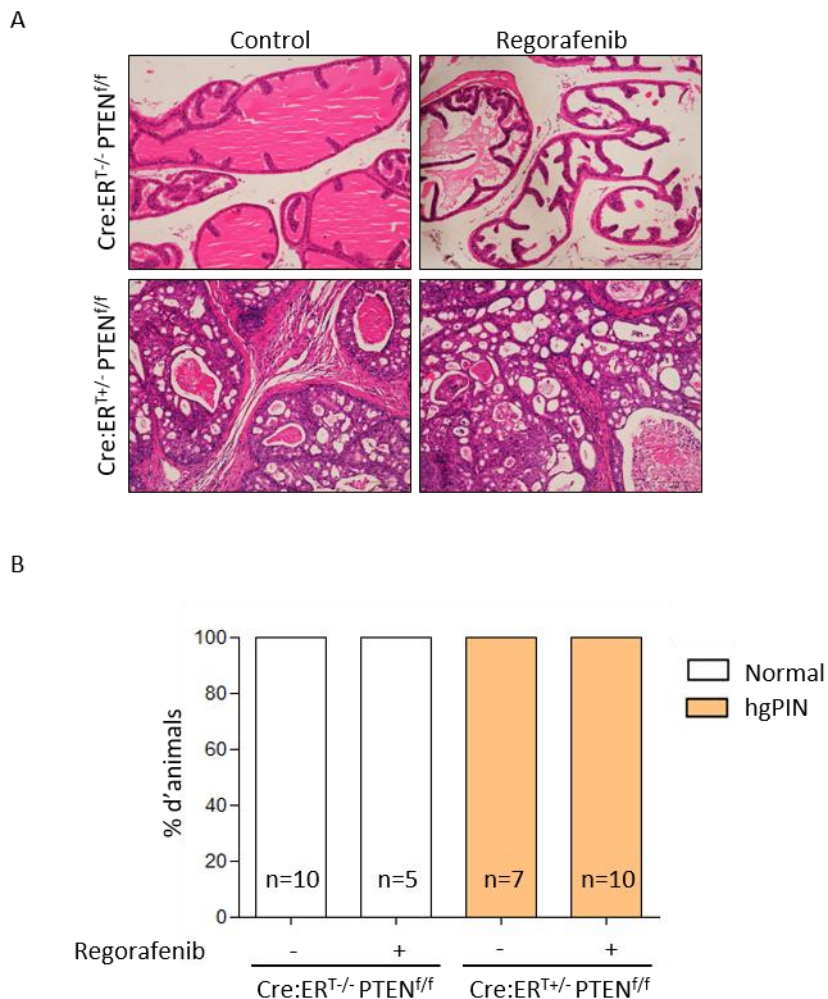


Figura 97: El tractament de 21 dies amb Regorafenib no disminueix, a llarg termini, les neoplàsies de pròstata induïdes per la pèrdua de PTEN. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E de les pròstates de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat. hgPIN significa *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*.

3.6 El tractament crònic amb Regorafenib alenteix el progrés de les hiperplàsies de tiroide originades per la pèrdua de PTEN

Un cop vam haver conclòs que el tractament de 21 dies amb Regorafenib no eliminava les hiperplàsies de tiroide en els ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} ni incrementava la supervivència global dels animals, vam plantejar-nos analitzar els efectes d'un tractament amb l'inhibidor de major durada en el temps.

Com s'ha comentat anteriorment, el tractament de 21 dies amb l'inhibidor multiquinasa posava de manifest una alta toxicitat del fàrmac. Per tal de superar aquests efectes indesitjables, vam dissenyar

Resultats

una nova pauta de dosificació. De nou, l'inici del tractament va tenir lloc tres setmanes després de la injecció de Tamoxifè. Però, el Regorafenib es va administrar a una dosi de 60 mg/kg seguint cicles de 5 dies de tractament diari, seguits de 9 dies de descans, abans de començar el següent cicle. El tractament es va allargar en el temps fins el moment en què els animals van requerir l'eutanàsia. Aquest experiment es va dur a terme només amb mascles.

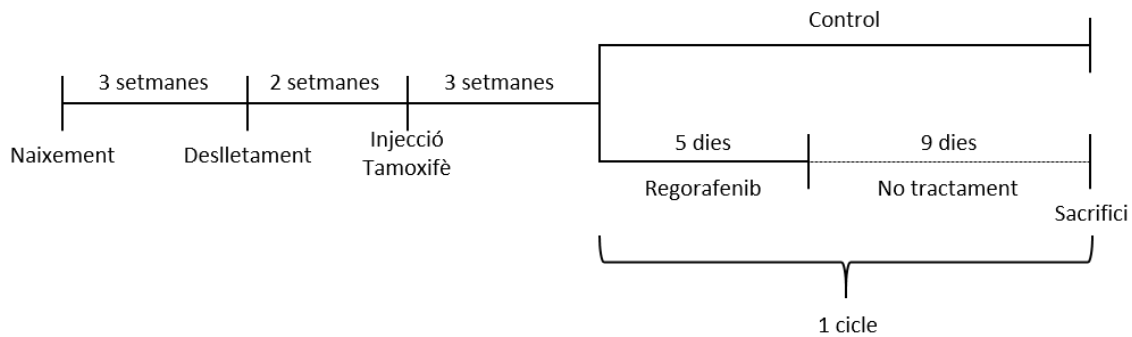


Figura 98: Representació esquemàtica del tractament crònic amb Regorafenib *in vivo*. Breument, els animals es comencen a tractar 3 setmanes després de la injecció de Tamoxifè. Però, en aquest cas, el tractament es realitza per cicles de dues etapes: 5 dies d'administració diària de 60 mg/kg de Regorafenib per via oral i 9 dies de descans, abans de començar el següent cicle. Els animals es mantenen vius fins que requereixen l'eutanàsia.

Sorprenentment, el tractament discontinuat de Regorafenib va allargar la supervivència dels ratolins Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}. Així, la deleció de PTEN reduïa la supervivència mitjana a 37 dies, mentre que el tractament amb Regorafenib va permetre incrementar-la fins als 67 dies. A més, cal remarcar que amb aquesta nova aproximació la toxicitat del fàrmac es va disminuir considerablement, i els ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} tractats amb l'inhibidor van conservar un bon estat de salut durant tot l'experiment.

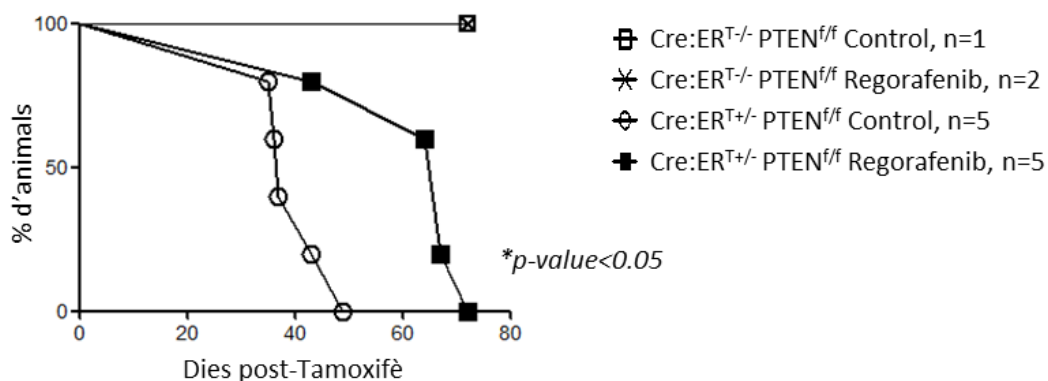


Figura 99: El tractament crònic amb Regorafenib augmenta la supervivència dels animals Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}. Corba de Kaplan-Meier que mostra la supervivència dels 4 grups analitzats. *P<0.05, mitjançant anàlisi Mantel-Cox.

Finalment, es va realitzar l'anàlisi histopatològic de les tiroïdes i les pròstates. Malauradament, i tot i l'increment en la supervivència, el tractament amb Regorafenib no va reduir en cap cas les lesions diagnosticades. Així, el 100% dels animals que van rebre l'inhibidor van desenvolupar hiperplàsia severa de tiroide i hgPIN, tal com es mostra a les figures 100 i 101, respectivament.

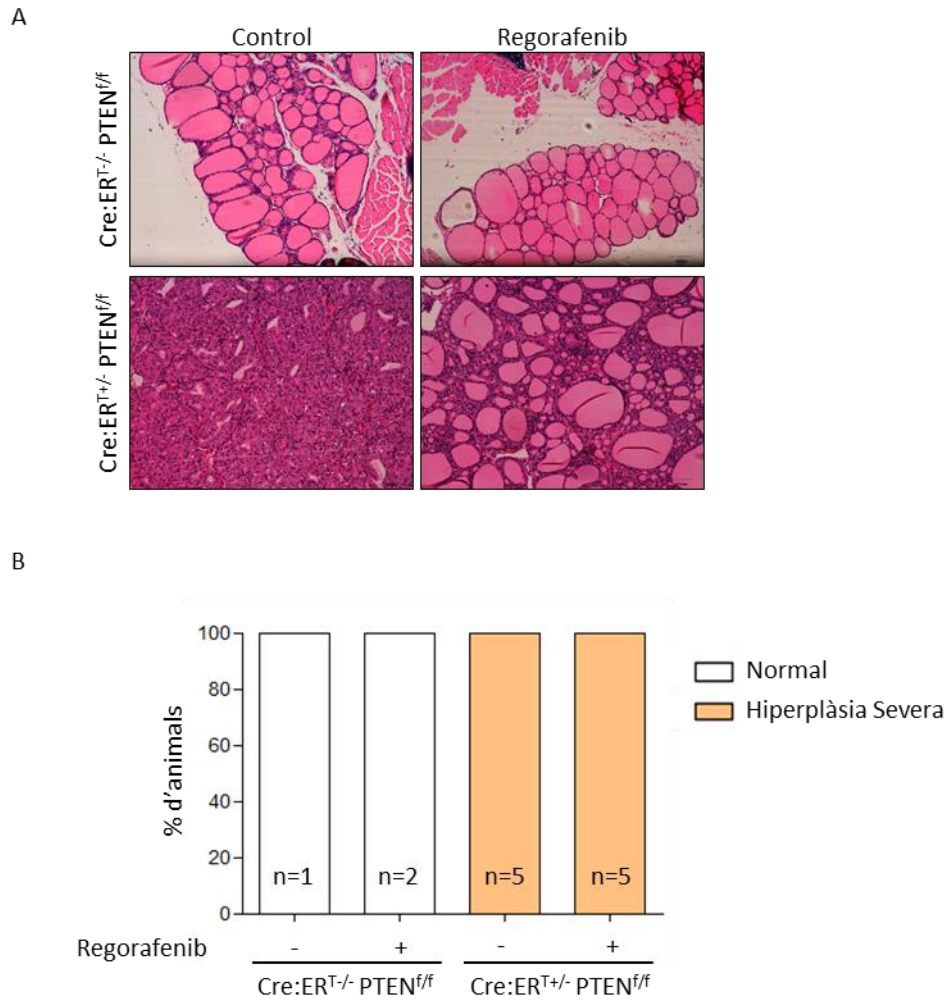


Figura 100: El tractament crònic amb Regorafenib no redueix l'extensió de les lesions diagnosticades a les tiroïdes dels animals Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E a les tiroïdes de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat.

Resultats

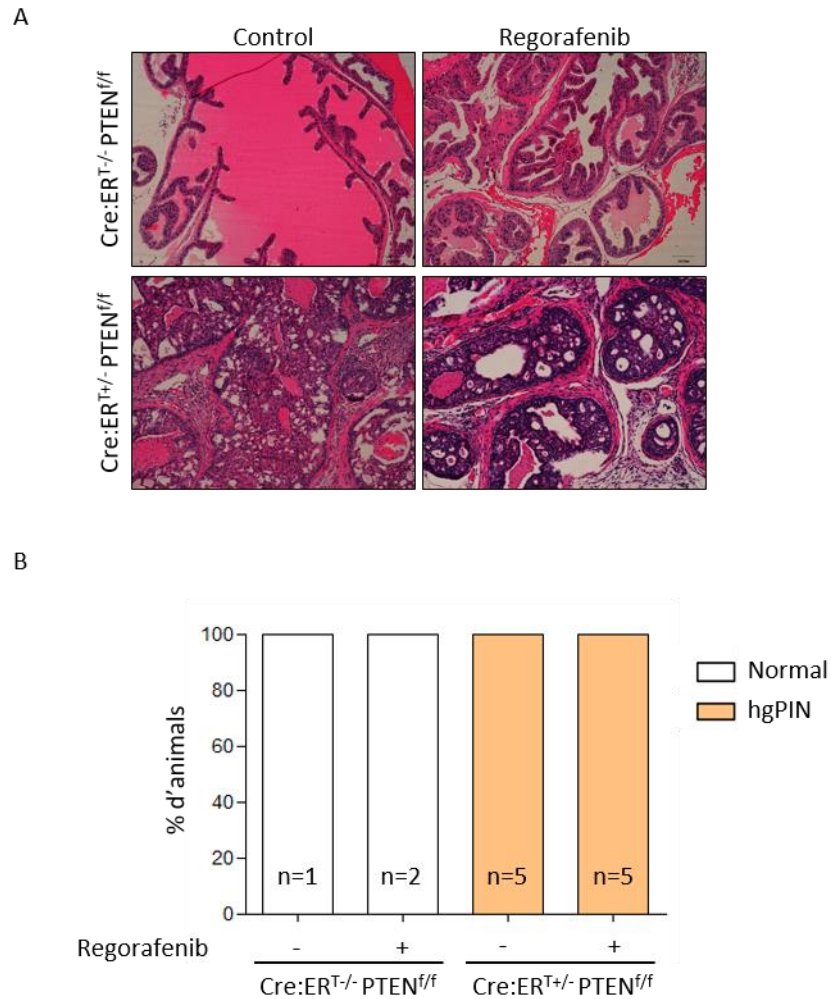


Figura 101: El tractament crònic amb Regorafenib no redueix l'extensió de les lesions diagnosticades a les pròstates dels animals Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}. (A) Imatges representatives de la tinció amb H-E a les pròstates de ratolins Cre:ER^{T-/-}PTEN^{f/f} i Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f} tractats o no amb Regorafenib (10x). (B) Quantificació de les lesions diagnosticades a cada grup. No hi ha diferències significatives segons l'anàlisi Chi quadrat. hgPIN significa *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*.

Per tant, en conjunt els nostres resultats indiquen que malgrat que el Regorafenib és capaç d'alentir l'avenç de les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN, no elimina completament les cèl·lules malignes, i per tant, la malaltia progressa al llarg del temps.

DISCUSSION

1. Estudi de la implicació del factor de transcripció E2F-1 en processos tumorals induïts per la pèrdua de PTEN

La inactivació de PTEN és un esdeveniment freqüent en molts tipus de càncers. En el càncer colorectal, PTEN es troba alterat a partir de la combinació de mecanismes tant genètics com epigenètics que condueixen a la inactivació bial·lèlica del gen supressor tumoral en un 20-30% del casos (Molinari and Frattini, 2013).

Existeixen diversos models animals preclínic que han abordat l'estudi de la implicació de la deleció bial·lèlica de *Pten* en la tumorigènesi intestinal. No obstant, l'anàlisi de la majoria d'aquests models presenta una sèrie de limitacions, que fan que els resultats obtinguts siguin heterogenis i sovint, contradictoris. Així, en primer lloc, alguns autors descriuen que la pèrdua de PTEN per si sola no produeix canvis visibles ni alteracions histològiques de tipus tumoral a còlon (Campbell et al., 1996; el Marjou et al., 2004; Gao et al., 2016; Ireland et al., 2004; Marsh et al., 2008), sinó que es requereix d'altres alteracions genètiques addicionals, com la deficiència d'APC (Langlois et al., 2009; Marsh et al., 2008). A més, en aquells models en què s'aconsegueix el desenvolupament del procés tumoral a còlon, aquest té lloc amb una baixa penetrància i requereix de llargs períodes de latència, que poden fins i tot, superar els 12 mesos (Marsh Durban et al., 2014). Per altra banda, la deleció de *Pten* pot donar-se de manera heterogènia al llarg del tracte gastrointestinal. D'aquesta manera, s'ha descrit també que la pèrdua del gen supressor tumoral pot conduir sorprenentment al desenvolupament d'adenomes i d'adenocarcinomes a intestí prim (Byun et al., 2011), sense afectar la histologia del còlon. Aquest fenomen presenta poca reproductibilitat en humans, on els tumors d'intestí prim són molt rars i infreqüents. En treballs realitzats prèviament al nostre laboratori, s'havien utilitzat els ratolins de la colònia Cre:ER^TPTEN^{ff/ff}, descrita amb anterioritat (Mirantes et al., 2013), però en un fons genètic diferent de l'utilitzat en el present treball. Tal com mostren nombrosos estudis, els nostres resultats corroboren que la modificació del fons genètic permet alterar el fenotip tumoral dels animals d'estudi (Freeman et al., 2006), ja la deleció de *Pten* en el fons genètic mixt original del nostre model no dona lloc a alteracions histològiques a còlon. En qualsevol cas, aquest model supera en gran mesura les limitacions esmentades anteriorment. Així, per exemple, les lesions de tipus tumoral es desenvolupen a còlon com a única regió exclusiva del tracte gastrointestinal, sense afectar, per exemple, la histologia de l'intestí prim. A més, més d'un 40% dels animals presenten lesions entre les 9 i les 12 setmanes després de la injecció de Tamoxifè, de manera que es redueix considerablement el període de latència. Les diferències observades entre el nostre model i tots els anteriors poden ser

Discussió

degudes als diferents promotors emprats per al control de l'expressió de la recombinasa Cre i també, al fons genètic emprat.

Histològicament, en el nostre estudi, les lesions a còlon es classifiquen majoritàriament com adenomes, que poden acabar progressant a adenocarcinomes. A més, en alguns d'aquests adenomes deficients per PTEN es pot distingir el patró de serració. Aquesta observació correlaciona perfectament amb un treball previ que descriu que l'expressió d'una forma mutada constitutivament activa de la PI3K també dona lloc a la formació d'adenomes serrats (Leystra et al., 2012). En conjunt, aquestes evidències suggereixen que aberracions en la via PI3K/AKT poden provocar l'aparició de tumors de còlon que segueixen la via serrada. A més, en ambdós treballs, els tumors s'inicien de manera independent a la senyalització per WNT, que és una de les vies de senyalització més freqüentment alterades en carcinomes de colorectals (Leystra et al., 2012).

El factor de transcripció E2F-1 és encara a dia d'avui una proteïna intrigant que posseeix l'habilitat de regular processos tan antagònics com són la proliferació cel·lular i l'apoptosi. Fins al moment, la seva implicació en la tumorigènesi no està completament definida i se suggereix que el seu comportament pot ésser dependent del tipus de teixit i del context cel·lular (Chen et al., 2009; Xanthoulis and Tiniakos, 2013). En aquest treball, hem estudiat la implicació d'E2F-1 en la carcinogènesi induïda per la pèrdua de PTEN *in vivo*, i molt especialment, en els carcinomes colorectals.

En l'actualitat, l'existència d'una relació funcional entre PTEN i E2F-1 en un context tumoral és pràcticament desconeguda i molts pocs treballs s'han focalitzat completament en aquest àmbit d'estudi. No obstant això, alguns autors han reportat una interconnexió entre ambdues proteïnes, que sovint és força discrepant i limitada a estudis majoritàriament *in vitro*. Per una banda, s'ha observat que el restabliment de l'expressió de PTEN en cèl·lules deficients per al gen supressor tumoral condueix a una disminució de l'expressió d'E2F-1 en cèl·lules de glioblastoma (Li et al., 2009). Per l'altra, s'ha descrit que la pèrdua d'expressió d'E2F-1 incrementa l'expressió de PTEN en una línia cel·lular de carcinoma gàstric (Wang et al., 2011). Contràriament, s'ha demostrat també que la transcripció de *PTEN* s'activa en alliberar-se E2F de la repressió de RB en un model *in vitro* d'osteosarcoma, i se suggereix, que E2F-1 podria actuar com a activador de la transcripció de *PTEN*. Aquesta relació és important per a l'apoptosi mitjançada per E2F, ja que la manca d'expressió PTEN permet a les cèl·lules sobreviure i superar els estímuls apoptòtics induïts per E2F-1 (Morales et al., 2014). En el nostre treball, l'anàlisi immunohistoquímic i per Western blot ha revelat que la deficiència d'E2F-1 no modifica substancialment l'expressió proteica de PTEN a còlon *in vivo*. De nou, sembla lògic

pensar que el paper d'E2F-1 en l'expressió de PTEN podria ésser també específic del tipus cel·lular i del context analitzat.

Tal com es comentava anteriorment, es considera que E2F-1 presenta dualitat de funcions. Inicialment, es va considerar un oncogen, i existeixen diversos treballs que recolzen aquesta hipòtesi. Així, per exemple, s'ha observat una major expressió d'E2F-1 en tumors de mama, de bufeta i de tiroide, en comparació amb el teixit normal, que correlaciona amb un major índex proliferatiu (Saiz et al., 2002; Zacharatos et al., 2004). A més, aquest increment de l'expressió s'associa a un pitjor pronòstic en casos càncer de pulmó i melanoma (Gorgoulis et al., 2002; Nelson et al., 2006). Pel contrari, existeixen també evidències que remarquen funcions supressores tumorals per a E2F-1, essent especialment rellevant la informació aportada pel ratolí *knock-out* del factor de transcripció, que és propens al desenvolupament de tumors (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996). També s'ha descrit que la sobreexpressió d'E2F-1 mitjançada per adenovirus en cèl·lules de glioma desencadena l'apoptosi i inhibeix el creixement tumoral tant *in vitro* com *in vivo* (Fueyo et al., 1998). En aquest sentit, el nostre model d'estudi exemplifica a la perfecció el paradigma d'E2F-1 i el seu rol en tumorigènesi dependent del tipus tissular i del context cel·lular. Mentre que la manca d'E2F-1 no afecta el desenvolupament de les neoplàsies endometrials i prostàtiques deficientes per PTEN, sí que causa un increment significatiu de la incidència i la progressió de la tumorigènesi a còlon en absència del gen supressor tumoral. Val la pena remarcar que la deleció exclusiva d'E2F-1 no és suficient per desencadenar el procés tumoral a còlon, almenys durant el període d'anàlisi d'aquest estudi, sinó que requereix de la presència d'un insult oncogènic addicional, com és la pèrdua de PTEN.

Pel que fa al càncer de pròstata, s'han realitzat diverses investigacions per tal de relacionar el factor de transcripció amb aquest tipus tumoral. S'ha demostrat, per exemple, que les regions tumorals de càncer pròstata perden l'expressió del factor de transcripció en comparació amb el teixit normal (Zacharatos et al., 2004). No obstant, i en sentit contrari, també s'ha descrit que la inhibició d'E2F-1 causa la regressió de *xenografts* establerts amb línies cel·lulars humanes de càncer de pròstata. Finalment, els nostres resultats mostren que l'absència d'E2F-1 no interfereix ni participa en el procés tumoral en una situació d'absència de PTEN. Per tant, novament queda palesa la importància del context cel·lular, que condiciona les funcions que executa E2F-1. Se suggereix així que davant la pèrdua de PTEN, la implicació d'E2F-1 en la carcinogènesi prostàtica és nul·la, mentre que pot esdevenir rellevant en el context d'altres alteracions moleculars. En quant a la carcinogènesi endometrial, la literatura científica no recull fins al moment cap treball que abordi el paper d'E2F-1

Discussió

en aquest tipus tumoral. Per tant, sorgeix la necessitat d'aprofundir més en tots aquests àmbits de la recerca, per tal de contrastar i validar la gran varietat i disparitat de resultats existents.

Pel que fa als tumors colorectals, la rellevància clínica i la implicació d'E2F-1 en aquest tipus tumoral és encara desconeguda i de nou, molt contradictòria, encara que existeix una certa tendència a considerar-lo com un putatiu gen supressor tumoral (Xanthoulis and Tiniakos, 2013; Yang et al., 2009). Els primers estudis que van avaluar l'expressió d'E2F-1 a través de l'anàlisi per immunohistoquímica de sèries de casos de càncer de còlon descriuen un increment de l'expressió del factor de transcripció, i en conseqüència, li atribueixen una funció oncogènica (Suzuki et al., 1999). No obstant, més endavant, alguns treballs han reportat una activitat antitumoral per a E2F-1. Així, s'ha descrit que la sobreexpressió d'E2F-1 amb adenovirus en línies cel·lulars de càncer de còlon induïx l'apoptosi en aquestes cèl·lules (Elliott et al., 2001; Elliott et al., 2002; Vorburger et al., 2003) i sensibilitza al tractament amb certs agents citotòxics (Dong et al., 2003; Lin et al., 2015). També, i més interessant, diversos autors han observat que l'expressió d'E2F-1 correlaciona de manera inversa amb el creixement tumoral. Concretament, han mostrat que la seva expressió es detecta majoritàriament en aquelles zones de les lesions que presenten un major índex apoptòtic i una menor proliferació (Bramis et al., 2004; Xanthoulis et al., 2014; Zacharatos et al., 2004). Aquesta observació correlaciona perfectament amb els nostres resultats, ja que l'absència d'E2F-1 causa una reducció de l'apoptosi en els tumors de còlon induïts per PTEN. Així, se suggereix que aquesta disminució en els nivells apoptòtics com a conseqüència de la pèrdua del factor de transcripció pot ésser responsable de l'increment en la tumorigènesi colorectal observada en els ratolins deficientes per PTEN i E2F-1, tal com succeeix en altres models (Fujiwara et al., 2011). En qualsevol cas, les diferències entre estudis poden ésser degudes a les limitacions de la pròpia tècnica, la immunohistoquímica, i de l'especificitat de l'anticòs emprat per a l'anàlisi. A més, l'avaluació de sèries que inclouen pocs casos pot també esbiaixar els resultats observats. Finalment, les característiques moleculars dels tumors poden també variar en funció de l'estadi, del tipus histològic i de les mutacions inductores, entre altres. En aquest sentit, els càncers colorectals de la via serrada presenten un comportament diferent, a nivell molecular, que els que s'originen per la via clàssica a partir de mutacions en APC. Aquestes perfil mutagènic diferencial pot també interferir en el comportament d'E2F-1. Cal realitzar un anàlisi més exhaustiu de grans sèries de casos que prengui en consideració tots aquests factors.

En qualsevol cas, els nostres resultats revelen que E2F-1 podria actuar com a fre de la tumorigènesi colònica induïda per la manca de PTEN, possiblement desencadenant l'apoptosi de les cèl·lules

tumorals. Aquest treball és el primer estudi que permet correlacionar E2F-1 amb una clara activitat supressora de tumors a còlon emprant un model animal genètic, i a més, s'associa una mutació en concret, la pèrdua de PTEN. Existeixen altres treballs que han estudiat també el paper d'E2F-1 en processos tumorals concrets induïts per mutacions específiques. Així, en un model de càncer de mama induït per MYC, la deficiència d'E2F-1 accelera el creixement tumoral i redueix el període de latència ja que també causa una disminució de l'apoptosi intratumoral(Fujiwara et al., 2011). No obstant, altres models han descrit el fenomen contrari. S'ha vist que la pèrdua d'E2F-1 redueix els tumors de tiroide i de pituïtària, i incrementa la supervivència dels animals $RB^{+/-}$ (Yamasaki et al., 1998). Finalment, també s'ha observat que la pèrdua d'E2F-1 endarrereix l'aparició i la capacitat metastàtica del tumors de mama induïts per HER2(Andrecheck, 2015).

Malgrat tot i aquests antecedents, és important destacar que el gen *E2F-1* presenta una baixa freqüència de mutacions en processos tumorals humans de diversos tipus. S'ha postulat que el gen podria ésser altament estable i conservatiu durant la tumorigènesi(Xiao et al., 2007) i que poden existir altres alteracions que en regulin l'activitat. Així, Yang i els seus col·laboradors van plantejar que en un context de tumorigènesi a còlon, l'activació d'E2F-1 podria trobar-se bloquejada com a conseqüència de l'amplificació gènica dels seus inhibidors, com RB(Yang et al., 2009). A més, s'ha demostrat també que modificacions en els nivells dels cofactors d'E2F-1 poden exercir una profunda influència en l'habilitat d'E2F-1 per potenciar o suprimir els processos tumorals(Engelmann and Pützer, 2012). Per exemple, s'ha descrit RIP140 (*receptor interacting protein of 140 kDa*) com un nou actor en la regulació de l'activitat transcripcional d'E2F-1, amb rellevància com a marcador pronòstic en càncers de mama humans(Docquier et al., 2010). Finalment, també s'ha reportat que la sobreexpressió del miRNA-205 en cèl·lules de melanoma redueix els nivells proteics d'E2F-1(Dar et al., 2011). Així doncs, queda palès que, durant la tumorigènesi, poden ocórrer tota una sèrie de mecanismes aberrants que poden interferir en l'activitat del factor de transcripció i poden desencadenar un fenotip similar al que s'esperaria tant per amplifícacions com delecions del gen *E2F-1*. El coneixement de la complexa xarxa de proteïnes que exerceixen d'alguna manera el seu control sobre E2F-1 és vital per a la comprensió del destí cel·lular. En el nostre model es mostra que la delecio d'E2F-1 desencadena un augment de la tumorigènesi colorectal induïda per pèrdua de PTEN. Donat que la delecio d'E2F-1 és poc freqüent en els tumors humans, es planteja la hipòtesi que poden existir altres alteracions que afectin a l'activitat d'E2F-1, i no tant a la seva expressió. Sorgeix així d'aquest treball la necessitat d'estudiar una possible correlació entre les alteracions genètiques que afecten a PTEN, el grau d'activitat d'E2F-1 i el grau de les lesions observades en casos de tumors humans

Discussió

colorectals. D'aquesta manera, seria possible validar la hipòtesi que el factor de transcripció pot esdevenir un actor principal a l'hora de controlar el progrés d'aquest tipus de lesions que presenten deficiència en PTEN.

En aquest sentit, molts treballs postulen la sobreexpressió d'E2F-1 com una possible estratègia terapèutica per al càncer de còlon avançat (Elliott et al., 2001; Elliott et al., 2002; Yang et al., 2009). No obstant, cal ser previnguts i tenir present la multiplicitat de funcions d'E2F-1 de manera específica de teixit. És difícil determinar quin efecte podria tenir en altres òrgans la sobreexpressió del factor de transcripció, i per tant, seria interessant poder establir estratègies selectives d'administració, per tal d'evitar el seu rol pro-tumoral en altres localitzacions. A més, l'expressió d'E2F-1 s'ha descrit com un factor important associat a la resistència al 5-FU i de fet, s'ha observat que una disminució en els nivells d'E2F-1 en cèl·lules resistents confereix de nou sensibilitat al 5-FU (Obama et al., 2002). No obstant, altres treballs no corroboren aquesta relació (Belvedere et al., 2004). Per tant, cal valorar totes aquestes limitacions abans d'emprendre aquest camí.

Finalment, en aquest treball hem intentat dilucidar les diferències moleculars existents entre els tumors originats per la pèrdua de PTEN que conserven l'expressió d'E2F-1 i aquells que presenten deleció monoal·lèlica o bial·lèlica del factor de transcripció.

Així, hem observat que la manca d'E2F-1 en els tumors deficients per PTEN condueix a increment de l'expressió de la forma fosforilada de p53 a la serina 15. Aquesta fosforilació té lloc com a conseqüència de la presència de dany al DNA i permet incrementar la vida mitjana de la proteïna (Lakin and Jackson, 1999), explicant així, l'augment observat en els nivells proteics de p53. A més, els mateixos tumors presenten també una major expressió de p-H2AX, que es produeix novament en resposta al dany al DNA i s'utilitza habitualment com a marcador d'aquest dany (Bonner et al., 2008). Aquestes observacions correlacionen perfectament amb la relació entre PTEN i E2F-1 amb el dany al DNA. Per una banda, s'ha descrit que PTEN nuclear executa múltiples funcions per al manteniment de la integritat dels cromosomes, de manera que mutacions en el gen supressor tumoral poden conduir a inestabilitat cromosòmica (Bassi et al., 2013; Shen et al., 2007; Sun et al., 2014). Per altra banda, E2F-1 és un element clau en la reparació del dany al DNA. Està demostrat que la seva pèrdua condueix a un increment i acumulació d'aquest dany (Castillo et al., 2015; Chen et al., 2011). De fet, l'animal doble *knock-out* d'E2F-1 i E2F-2 presenta acumulació de p53 i increment de p-H2AX, en comparació amb ratolins *wild-type* (Iglesias-Ara et al., 2015). Així doncs, tot plegat suggereix que la manca d'E2F-1 en els tumors deficients en PTEN resulta en un augment del dany al DNA, i en una possible acumulació

d'aquest com a conseqüència d'una reparació ineficient. D'aquesta manera, la doble pèrdua de PTEN i E2F-1 podria donar lloc a una major inestabilitat genòmica, que en última instància, podria explicar també l'increment observat en la incidència i progressió de les lesions colorectals en els ratolins Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/-} i Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{-/-} en comparació amb els animals Cre:ER^{T+/-}-PTEN^{f/f}E2F-1^{+/+}.

Finalment, els tumors doble deficients per PTEN i E2F-1 presenten una major expressió de B-RAF. S'ha reportat que l'activació de B-RAF és un factor rellevant en el desenvolupament dels tumors colorectals per la via serrada, tot i que s'ha associat tradicionalment amb mutacions en el gen (Kambara et al., 2004; Spring et al., 2006). Els nostres resultats suggereixen que l'augment de l'expressió de B-RAF podria ésser també un mecanisme d'activació de la proteïna en processos tumorals a còlon, tal com s'ha descrit per a altres tumors, com gliomes i tumors de tiroide (Ciampi et al., 2005; da Silva et al., 2015; Khan et al., 2014; Li et al., 2014). Per tant, pot resultar interessant avaluar aquesta hipòtesi en mostres humanes de tumors colorectals. En qualsevol cas, en línia amb els nostres resultats, s'ha descrit, en un model animal específic d'intestí, que la mutació Braf^{V600E} inicia la tumorigènesi colorectal per la via serrada i dona lloc a un increment de la fosforilació de ERK1/2, tal com succeeix en el nostre model (Rad et al., 2013). A més, en el nostre model, la manca d'E2F-1 condueix també a una potent activació de les altres dues MAPK, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) i p38, que es reflecteix en un augment de la fosforilació d'aquestes proteïnes, sense alterar-ne els nivells totals. En càncer colorectal, la fosforilació d'ERK1/2, JNK i p38 s'ha associat amb un fenotip més maligne (Lee et al., 2011) i l'expressió de p-p38 s'ha descrit com un biomarcador de pitjor pronòstic (Fan et al., 2014), però fins al moment, no s'ha estudiat en tumors colorectals de la via serrada. En qualsevol cas, en el nostre model, la pèrdua d'E2F-1 condueix a una potent activació de la senyalització per les MAPKs en els tumors deficients per PTEN.

En conclusió, aquest és, fins al moment, el primer estudi preclínic en què s'avalua l'efecte de la manca d'E2F-1 en tumors colorectals, endometrials i de pròstata causats per la deficiència de PTEN. En conjunt, els nostres resultats posen de relleu la influència del tipus i del context cel·lular en l'activitat d'E2F-1 i revelen que E2F-1 podria actuar com a fre de la tumorigènesi colònica induïda per la pèrdua de PTEN.

2. Estudi de la implicació de l'axis Ciclina D-CDK4/6 en les neoplàsies induïdes per la pèrdua de PTEN

Les alteracions a l'eix Ciclina D-CDK4/6 són comuns en diversos tipus de càncers humans i contribueixen al fenotip tumoral (Malumbres and Barbacid, 2007, 2009). És habitual detectar amplifícacions i/o sobreexpressions de les Ciclines D i de les CDK4/6 en una gran varietat de tipus tumorals, fins i tot d'origen diferent. Per tant, sembla clar que aquests components del cicle cel·lular participen en els processos neoplàsics, tant en humans com en ratolins (Casimiro et al., 2014; Deshpande et al., 2005; Malumbres and Barbacid, 2009). No obstant, els mecanismes pels quals condueixen o participen en la tumorigènesi són en gran mesura encara desconeguts, i sovint, generen controvèrsia. En aquest sentit, es fa necessària més recerca que permeti determinar si la seva implicació en els processos tumorals es limita a les funcions en el cicle cel·lular, o bé s'estén a noves funcions no canòniques, recentment descrites, com per exemple la transcripció gènica, la reparació del dany al DNA, la mort cel·lular, la diferenciació cel·lular i el metabolisme (Hydbring et al., 2016). En aquest treball, hem demostrat la implicació de l'eix Ciclina D-CDK4/6 en la carcinogènesi endometrial induïda per la pèrdua de PTEN *in vivo*.

Diversos tipus de tumors sòlids, entre els quals s'hi troben els càncers ginecològics, mostren sobreexpressió de Ciclina D1 (Casimiro et al., 2014). Així, per exemple, alguns treballs previs descriuen un increment en l'expressió de Ciclina D1 tant en les hiperplàsies com en els carcinomes endometrials en comparació amb l'endometri normal no patològic. Aquest patró d'expressió alterat en les lesions premalignes i malignes suggereix un paper clau per a la Ciclina D1 en la tumorigènesi endometrial (Nikaido et al., 1996; Ozuysal et al., 2005; Ruhul Quddus et al., 2002). En línia amb aquests resultats, les neoplàsies endometrials induïdes per la pèrdua de PTEN en el nostre model animal Cre:ER^TPTEN^{f/f} també presenten una major expressió de Ciclina D1 en comparació amb el teixit normal. A més, la sobreexpressió de la Ciclina D1 normalment correlaciona amb un increment de la immunodetecció de Ki-67, tal com també succeeix, de nou, en el nostre model *in vivo*.

No obstant això, l'efecte directe de PTEN en l'expressió de la Ciclina D1 és encara controvertit, i pot ésser diferent en funció del teixit i fins i tot, del tipus d'alteració de PTEN, com ara si es tracta d'una deleció o una mutació. S'ha descrit, per exemple, que la pèrdua de PTEN condueix a un increment dels nivells de Ciclina D1 en un model de malaltia hematopoètica limfoide (Mirantes et al., 2016), tal com succeeix en el nostre estudi, mentre que la forma mutant PTEN-G129E els disminueix en un

Discussió

model de càncer de mama (Weng et al., 2001). Alguns carcinomes endometrials presenten mutacions en el domini fosfatasa lipídica de PTEN (G129D/E/R/V), i per tant, pot resultar interessant determinar l'efecte d'aquestes formes mutants en els nivells de Ciclina D1. En qualsevol cas, els nostres resultats no són comparables amb aquesta darrera situació, ja que el model Cre:ER^TPTEN^{f/f} es basa en la deleció de PTEN i no en la seva mutació, i permet així, modelitzar els tumors endometrials deficientes per al gen supressor tumoral, que representen una fracció important del total dels casos. Tanmateix, sembla clar que la Ciclina D1 participa d'alguna manera en la tumorigènesi endometrial induïda per pèrdua de PTEN, encara que el mecanisme responsable no és del tot conegut.

En els darrers anys, s'han dut a terme molts treballs amb models de ratolí per tal d'elucidar el paper o la implicació de l'eix Ciclina D1-CDK4/6 en la tumorigènesi, i de nou, els resultats són força contradictoris. Per una banda, alguns treballs descriuen que l'ablació d'un o més dels components de l'eix Ciclina D1-CDK4/6 resulta en la protecció o resistència a determinats tipus de tumors. Per exemple, la deleció de Ciclina D1 redueix la formació dels tumors de pell induïts per RAS (Robles et al., 1998) i la carcinogènesi mamària induïda també per aquest oncogen. A més, la pèrdua de CDK4 o de Ciclina D1 confereix resistència al desenvolupament d'adenocarcinomes de mama causats per HER2 (Bowe et al., 2002; Choi et al., 2012; Landis et al., 2006; Reddy et al., 2005; Yu et al., 2001). Pel contrari, en altres estudis s'ha observat que l'absència de Ciclina D1 és dispensable durant el procés tumoral. Així, la deficiència d'aquesta ciclina no altera l'aparició ni el desenvolupament dels tumors de mama induïts per c-MYC o WNT (Rowlands et al., 2003; Yu et al., 2001). Curiosament, en el nostre cas, en un context d'absència de Ciclina D1 s'observa una lleugera reducció de les lesions endometrials induïdes per pèrdua de PTEN, però no es detecta afectació del procés tumoral ni a pròstata ni tiroide. Tanmateix, tots aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió de la Ciclina D1 està implicada en la transformació cel·lular i en la formació de tumors, però ha de cooperar necessàriament amb altres insults oncogènics per promoure la tumorigènesi. Les diferències entre tots aquests models poden explicar-se arran d'una sensibilitat a la sobreexpressió de la Ciclina D1 específica de teixit i per l'existència de diferents mutacions inductores, que es tradueix en una diferent especificitat als estímuls oncogènics. És important remarcar que en aquest treball es descriuen els efectes de la deficiència de Ciclina D1 en l'escenari de tres tipus tumorals diferents, d'origen diferent, que comparteixen el mateix insult oncogènic però que donen lloc a resultats confrontats. Atès que l'absència de Ciclina D1 no afecta la proliferació cel·lular en cap dels teixits analitzats, però si causa la reducció de les neoplàsies endometrials, se suggereix la hipòtesi que la Ciclina D1 pot controlar altres processos biològics a l'endometri, diferents de la seva funció canònica en la proliferació.

Desafortunadament, el fenotip dels ratolins $Cre:ER^{T+/-}PTEN^{f/f}CycD1^{-/-}$ ha limitat el nombre d'animals utilitzats en aquesta part de l'estudi. Tanmateix, és important tenir en compte que els efectes de la deficiència de Ciclina D1 en el nostre model de ratolí *knock-out* induït per Tamoxifè poden trobar-se també emmascarats per l'acció contínua dels altres ciclines D, ja que l'ablació de PTEN en cultius 3D de cèl·lules epitelials d'endometri murí indueix l'augment de l'expressió no només de la Ciclina D1, sinó també, de les Ciclines D2 i D3. En línia amb les nostres observacions, altres estudis demostren que totes tres Ciclines D s'expressen de forma solapada i que almenys una dels tres és suficient per conduir el desenvolupament normal (Kozar et al., 2004; Sicinski et al., 1996). De fet, la proliferació cel·lular pot ocórrer fins i tot, en absència de totes tres Ciclines D, suggerint un mecanisme independent d'aquestes ciclines (Kozar et al., 2004).

Atès que les aberracions en el cicle cel·lular juguen un paper fonamental en el fenotip tumoral, la intervenció terapèutica dirigida a proteïnes de la maquinària del cicle s'ha proposat com una possible teràpia antitumoral (Asghar et al., 2015; Sherr et al., 2016). En aquest sentit, durant les dues darreres dècades, s'han invertit grans esforços per tal de desenvolupar inhibidors selectius de CDK4/6. En l'actualitat, s'estan realitzant diversos assaigs clínics per examinar l'eficàcia de tres agents existents, el Palbociclib, el Ribociclib i l'Abemaciclib. D'entre tots tres, el Palbociclib va ser el primer en rebre l'aprovació de la *US Food and Drug Administration*, al febrer de 2015, per al tractament del càncer de mama avançat i metastàtic, en combinació amb letrozol (Clark et al., 2016; Finn et al., 2016; Gohil, 2015).

En aquest estudi, hem avaluat el potencial terapèutic del Palbociclib en neoplàsies d'endometri i de pròstata, i en hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN *in vivo*. Sorprenentment, el Palbociclib redueix la proliferació cel·lular en tots tres teixits però causa únicament la disrupció del procés tumoral a l'endometri. Curiosament, aquests resultats concorden amb el fet que la deficiència de Ciclina D1 per si sola només disminueix l'extensió de lesions endometrials.

No obstant això, els nostres resultats deixen entreveure que el manteniment dels tumors de pròstata i tiroide deficients en PTEN pot ser també dependent en certa mesura de l'eix Ciclina D-CDK4/6, ja que el tractament amb Palbociclib disminueix la proliferació cel·lular en ambdós teixits. En concordança amb aquestes observacions, Comstock i els seus col·laboradors reporten en un treball previ, un efecte antiproliferatiu del Palbociclib en teixit tumoral de pròstata humana *ex vivo* (Comstock et al., 2013). A més, s'ha descrit una col·laboració funcional entre p18 i PTEN en la supressió de tumors, també per al càncer de pròstata, entre altres (Bai et al., 2006), remarcant la implicació de l'eix

Discussió

Ciclina D-CDK4/6 en els processos tumorals. No obstant, el tractament amb Palbociclib no afecta l'extensió de les lesions de pròstata i tiroide dels animals Cre:ER^{T+}/PTEN^{f/f}. Existeixen certes variacions entre ambdós models que poden explicar les diferències en els resultats. Per una banda, la pèrdua de PTEN i p18 dóna lloc a la hiperactivació de l'eix Ciclina D-CDK4/6 mentre que el tractament amb Palbociclib en causa la inhibició. A més, per altra banda, en el primer model, s'intervé en el cicle cel·lular abans i durant el desenvolupament tumoral, mentre que en el nostre model, el tractament amb l'inhibidor s'inicia després de l'aparició dels tumors. Així, tant el plantejament de la intervenció com el moment en què aquesta té lloc poden generar diferències en el patró de resposta.

En l'actualitat, s'estan realitzant nombrosos assaigs clínics per donar a conèixer el benefici terapèutic del Palbociclib sol o en combinació amb altres fàrmacs (Asghar et al., 2015; Clark et al., 2016; Sherr et al., 2016). A nivell preclínic, els PDXs representen un model més avançat per a l'estudi de fàrmacs (Hidalgo et al., 2014; Malaney et al., 2014). En aquest treball, s'evidencia que el Palbociclib presenta potencial terapèutic en un model PDX primari de carcinoma endometrial deficient per PTEN. Tanmateix, el fàrmac no induïx la regressió tumoral ni causa mort cel·lular. En aquest sentit, es fa imprescindible desenvolupar teràpies combinatòries de Palbociclib amb agents citotòxics. Aquests estudis requereixen un disseny acurat, ja que alguns treballs *in vitro* realitzats amb línies cel·lulars de càncer de mama reporten activitat antagònica entre el Palbociclib i certs agents quimioterapèutics (McClendon et al., 2012; Roberts et al., 2012). No obstant, amb una correcta sincronització del cicle cel·lular, s'aconsegueix un efecte citotòxic sinèrgic en múltiples models (Baughn et al., 2006; Dean et al., 2012; Menu et al., 2008). El Palbociclib és el primer inhibidor de cicle cel·lular que ha demostrat eficàcia en el tractament d'una àmplia varietat de tumors. Per tant, sembla raonable considerar les teràpies combinatòries d'aquest inhibidor amb altres fàrmacs com una promesa terapèutica valuosa (Clark et al., 2016).

A nivell molecular, diversos grups han afirmat que l'estat de la proteïna pRB és fonamental per a l'activitat del Palbociclib (Asghar et al., 2015; Clark et al., 2016; Comstock et al., 2013; Fry et al., 2004; Sherr et al., 2016) i que la pèrdua de RB condueix a la resistència a l'inhibidor (Asghar et al., 2015). En el present estudi, el tractament amb l'inhibidor només redueix l'expressió de pRB a l'endometri *in vivo* després d'un tractament agut, però no en altres teixits ni en tractaments més llargs. La restauració dels nivells de pRB pot explicar per què el Palbociclib no causa la regressió de la malaltia després del tractament a llarg termini a l'endometri. No obstant, el paper de RB com factor pronòstic del tractament amb Palbociclib encara no és del tot clar. Els nostres resultats concorden amb aquesta

premissa, ja que les mostres de PDXs analitzades, que presenten una disminució de la proliferació i del creixement tumoral després del tractament amb Palbociclib, no mostren en cap cas, reducció dels nivells proteics de pRB. A més, s'ha observat que alguns pacients que no experimenten cap benefici terapèutic després de l'administració de Palbociclib sí que mostren igualment disminució de pRB (Asgar et al., 2015; Leonard et al., 2012; Roberts et al., 2012). En aquests casos clínics, la fosforilació de RB no prediu la dependència a les CDK4/6. És fa imprescindible doncs, identificar nous biomarcadors més precisos que permetin evitar l'adquisició de resistències.

Durant la divisió cel·lular, el complex Ciclina D-CDK4/6 segresta inhibidors de CDKs com p27, permetent així, l'alliberament de l'activitat Ciclina E-CDK2, que al seu torn, fosforila RB. La presència de pRB durant l'administració de Palbociclib es podria explicar emprant un raonament similar. No obstant això, en aquest treball, es detecten dos possibles escenaris després d'un tractament llarg amb l'inhibidor. D'una banda, s'observen baixos nivells de Ciclina D1, p27 i Ciclina E. De l'altra, després de l'activació d'ERK, es detecta un increment de les proteïnes anteriorment esmentades, que correlaciona amb un augment d'expressió de la proteïna p-RB. La nostra hipòtesi és que encara que el Palbociclib inhibeix l'activitat quinasa del complex Ciclina D-CDK4/6, la Ciclina D1 encara conserva la seva capacitat per segrestar p27 i alliberar la Ciclina E. D'aquesta manera, l'expressió de Ciclina E pot ésser suficient per fosforilar RB, quan s'associa amb CDK2 (Barrière et al., 2007; Geng et al., 2001; Kozar et al., 2004). A més, s'ha documentat que l'activació de la via ERK és necessària i suficient per induir l'expressió de Ciclina D1 (Meloche and Pouyssegur, 2007). Per tant, en el segon context, és possible postular també que la gran quantitat present de Ciclina D1 pot sobrepassar la inhibició pel Palbociclib i fosforilar també, a RB. A més, pot resultar interessant determinar el mecanisme pel qual l'expressió de Ciclina E es troba tan incrementada. En global, aquestes observacions ens plantegen que la Ciclina E pot ésser responsable de la fosforilació de RB durant la inhibició de l'eix Ciclina D-CDK4/6 per mitjà del Palbociclib, tal com s'ha descrit anteriorment en altres models (Barrière et al., 2007). A més, i en concordança amb aquesta hipòtesi, en aquest treball demostrem que l'expressió de p-RB s'incrementa en aquells ratolins que expressen més Ciclina E.

En conjunt, els nostres resultats proporcionen noves evidències que indiquen que l'activitat antitumoral de l'eix Ciclina D-CDK4/6 a l'endometri pot dependre de la regulació de funcions importants per a processos cel·lulars implicats en la progressió tumoral. No obstant això, és necessari aprofundir en la recerca en aquest àmbit per tal de dilucidar les funcions independents al cicle cel·lular que contribueixen realment en la tumorigènesi.

Discussió

Fins al moment, aquest el primer estudi preclínic en què s'avalua el potencial terapèutic del Palbociclib en tumors endometrials, de tiroides i pròstata causats per la deficiència de PTEN. Els nostres resultats posen de manifest el potencial clínic del Palbociclib com a fàrmac anticancerigen a l'endometri.

3. Avaluació de l'efecte de l'inhibidor multiquinasa Regorafenib en el tractament de tumors sòlids deficients per PTEN

La via PI3K/AKT es troba activa de manera inadequada en diversos tipus de càncers. Aquesta hiperactivació pot donar-se a través de dos mecanismes fonamentals que inclouen per una banda, les mutacions somàtiques dels diversos membres específics de la via, i per l'altra, l'activació exacerbada dels RTKs (Bauer et al., 2015; Khan et al., 2013). Els RTKs regulen diverses funcions en les cèl·lules normals, però durant els darrers anys, se'ls ha atribuït també un paper crucial com a oncoproteïnes. L'activació anormal dels RTKs és un dels components essencials del desenvolupament i la progressió de múltiples càncers humans i permet el manteniment de la proliferació i la supervivència de les cèl·lules tumorals (Gschwind et al., 2004). Per exemple, l'activació de la via PI3K es dona habitualment en càncers de pulmó i de mama que presenten mutacions en EGFR i HER2, respectivament, que són rellevants a l'hora d'establir l'estratègia terapèutica (Mayekar and Bivona, 2017; Yan et al., 2014). També s'ha documentat l'existència freqüent d'alteracions en RTKs, com el FGFR2, PDGFR, EGFR i VEGFR, entre altres, en càncer d'endometri, pròstata i tiroide (Chen et al., 2006; Eritja et al., 2014; Gatus et al., 2011; George, 2002; Rajabi and Hedayati, 2017). A més, la sobreexpressió dels lligands d'aquests receptors també contribueix a l'activació continuada dels RTKs. Així, el factor proangiogènic VEGF (*vascular endothelial growth factor*) és troba incrementat en casos de càncer d'endometri, de pròstata i de tiroide, i s'ha associat amb la progressió metastàtica i la supervivència (de Araujo-Filho et al., 2009; Kamat et al., 2007; Roberts et al., 2013; Soh et al., 1997).

En conseqüència, els RTKs i els seus lligands s'han convertit en importants dianes per a la intervenció terapèutica en càncer. No obstant, és freqüent que diversos RTKs es trobin alterats simultàniament, de manera que els tumors esdevenen resistents al tractament en monoteràpia (Engelman et al., 2007). D'aquesta manera, sorgeix la necessitat d'inhibir més d'una quinasa a la vegada, i és en aquest context on els inhibidors multiquinasa, com el Regorafenib, ofereixen una alternativa terapèutica per superar la resistència a la monoteràpia, ja que permeten inhibir més d'una diana amb un únic fàrmac. A més, en general, els inhibidors de RTKs normalment causen un efecte supressor sobre la via PI3K/AKT (Engelman, 2009; Khan et al., 2013). Seguint totes aquestes premisses, en aquest treball s'ha avaluat l'eficàcia del Regorafenib en el tractament de tumors sòlids induïts per la pèrdua de PTEN, que per tant, presenten hiperactivació de la via PI3K/AKT.

Discussió

S'ha descrit que el Regorafenib redueix la viabilitat cel·lular *in vitro* de diverses línies cel·lulars de diferent origen, com ara cèl·lules de carcinoma hepàtic (Carr et al., 2013) i de bufeta (Hsu et al., 2017), i de meningioma (Tuchen et al., 2017), entre altres (Wilhelm et al., 2011). A més, el fàrmac també inhibeix el creixement de tumors establerts amb línies cel·lulars trasplantades a ratolins (Abou-Elkacem et al., 2013; Wilhelm et al., 2011). En línia amb aquestes observacions, en aquest treball s'ha observat que el tractament amb Regorafenib disminueix també la viabilitat cel·lular *in vitro* de dues línies tumorals d'endometri, una de pròstata i dues més de tiroide.

A nivell molecular, el mecanisme pel qual el Regorafenib exerceix la seva activitat terapèutica és encara desconegut, i a més, suscita discrepàncies entre diversos treballs. En el nostre estudi, el tractament amb el fàrmac *in vitro* condueix a una disminució de l'expressió de la forma fosforilada d'ERK, suggerint així, un possible mecanisme d'acció. Diversos estudis corroboren aquesta observació tant *in vitro* com *in vivo*. Així, per exemple, en un model *xenograft* establert amb les cèl·lules de càncer de mama MDA-MB-231, l'administració de Regorafenib també causa una davallada en els nivells de p-ERK (Wilhelm et al., 2011). Novament, aquesta disminució pot apreciar-se igualment després del tractament amb el fàrmac de cèl·lules de meningioma, quan creixen tant adherides a la placa com ortotòpicament en ratolí (Tuchen et al., 2017). Així doncs, totes aquestes observacions suggereixen que el Regorafenib inhibeix efectivament la via de senyalització MAPK/ERK. D'altra banda, l'efecte directe de l'inhibidor sobre els nivells de p-AKT és motiu de controvèrsia, i sovint els resultats observats poden interpretar-se equívocament. Així, mentre que en el nostre treball no es detecten canvis en l'expressió de la forma fosforilada d'AKT, altres treballs han reportat tant increments com reduccions de p-AKT després del tractament amb Regorafenib (Li et al., 2017; Tuchen et al., 2017). Per acabar, en el nostre estudi, l'administració de l'inhibidor *in vitro* condueix també a una disminució de l'expressió de p-eIF4E que fins al moment, no s'havia descrit amb anterioritat.

No obstant això, malauradament tots aquests resultats obtinguts en la part de l'estudi *in vitro* no es reproduïen en els experiments *in vivo*, ni en el fenotip dels ratolins ni a nivell molecular. Per una banda, el Regorafenib únicament ha demostrat eficàcia en reduir les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN en els ratolins Cre:ER^{T+}/PTEN^{ff} i pel contrari, el fàrmac no presenta potencial terapèutic ni en les neoplàsies endometrials ni prostàtiques desenvolupades en el mateix model. Per l'altra, encara que el tractament provoca la inhibició de les vies de senyalització MAPK/ERK i PI3K/AKT en totes les línies cel·lulars provades *in vitro*, la resposta *in vivo* difereix completament d'aquests resultats. En primer lloc, no s'observa l'efecte inhibitori exercit pel Regorafenib sobre l'activació

d'ambdues vies de senyalització. En segon lloc, no es detecten diferències a nivell molecular entre les hiperplàsies de tiroide que responen favorablement al tractament, i les neoplàsies d'endometri i pròstata, resistents a l'administració de Regorafenib. Estudis previs han demostrat que la inhibició de PI3K col·labora amb el Regorafenib per induir la mort cel·lular en cultius cel·lulars de mama, pulmó, colorectal, ronyó i càncer de cervell(Sajithlal et al., 2013). No obstant això, la majoria d'aquestes evidències no s'han validat *in vivo*. Una possible explicació per aquestes discrepàncies observades pot donar-se pel fet que en condicions *in vitro*, els fàrmacs actuen directament sobre les cèl·lules tumorals, de manera que l'accés a les seves dianes moleculars, i el consegüent bloqueig, es dona més fàcilment. Pel contrari, quan el tractament té lloc *in vivo*, el fàrmac es distribueix per l'organisme, de manera que la seva biodisponibilitat, i consegüentment, el seu efecte terapèutic, poden veure's compromesos en determinats teixits. A més, l'estroma pot modificar el microambient tumoral mitjançant la producció de citocines i d'altres factors que poden regular el procés tumoral, promovent la supervivència i la remodelació del nínxol(Pietras and Ostman, 2010). Així doncs, i malgrat que les lesions avaluades en aquest estudi tenen totes la seva causa en la pèrdua de PTEN, cal considerar que els factors extrínsecs del nínxol tumoral poden modular l'efecte terapèutic del fàrmac i oferir en aquest context, una explicació als diferents resultats observats per als tres tipus tumorals. A més, i per una qüestió purament tècnica, que afecta tant al processament de les mostres com al moment en què aquestes s'obtenen després de la darrera administració del Regorafenib, el patró d'expressió de certes proteïnes pot veure's modificat, emmascarant així l'efecte real de l'inhibidor a nivell molecular. En qualsevol cas, els nostres resultats suggereixen que altres vies, apart de les vies MAPK/ERK i PI3K/AKT, poden veure's modificades com a conseqüència del tractament amb Regorafenib. El coneixement i la descripció d'aquestes possibles vies alternatives requereix més investigació.

En humans, la hiperactivació de la via PI3K/AKT s'associa amb la resistència al tractament amb inhibidors de RTKs, i és la responsable del 20% de les fallides terapèutiques(Cassinelli et al., 2013). Per exemple, la pèrdua de PTEN en càncer de pulmó condueix a una hiperactivació de la via que redueix la resposta a l'inhibidor d'EGFR, Gefitinib(Sos et al., 2009). Molt recentment, s'ha descrit que l'activació de l'eix AKT/FOXM1/STMN1 confereix resistència al tractament amb Regorafenib en càncer de pulmó(Li et al., 2017). No obstant, el paper dels elements d'aquestes vies com a possibles biomarcadors per avaluar la resposta al tractament encara no es comprèn completament. La identificació de biomarcadors que permetin predir la sensibilitat o resistència a les teràpies implica la primera línia de recerca en aquest àmbit. Aquests tipus d'estudis permeten dirigir els pacients als tractaments més convenients, de manera que representa un impacte important tant per aspectes

Discussió

mèdics com econòmics. En aquest treball, s'avalua l'efecte del Regorafenib en neoplàsies induïdes per una única mutació, de manera que permet relacionar el seu potencial terapèutic amb una alteració molecular concreta, la pèrdua de PTEN.

A nivell clínic, el Regorafenib està aprovat per al tractament de càncer colorectal metastàtic refractari a totes les teràpies estàndard aprovades, de tumors estromals gastrointestinals avançats i de carcinomes hepatocel·lulars, prèviament tractats amb Sorafenib (Bruix et al., 2017; Demetri et al., 2013; Grothey et al., 2013). Segons els nostres resultats, el Regorafenib és un fàrmac prometedor per al tractament de les hiperplàsies de tiroide induïdes per pèrdua de PTEN, mentre que no presenta cap benefici terapèutic en neoplàsies endometrials o prostàtiques. En l'actualitat, s'està desenvolupant ja un assaig clínic fase II amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia clínic del Regorafenib com a segona o tercera línia terapèutica en el tractament de càncer de tiroide medul·lar (NCT02657551). En qualsevol cas, val la pena recordar que el Regorafenib alenteix el progrés de la malaltia, però no l'elimina completament en el nostre model, fenomen que també s'observa en pacients.

Finalment, i per acabar, cal remarcar que tots els resultats obtinguts en aquest treball fan referència al tractament amb Regorafenib en règim de monoteràpia, de manera que no es pot descartar la possibilitat que la combinació de Regorafenib amb altres fàrmacs sigui més eficaç per als processos tumorals induïts per PTEN. De fet, diversos estudis han reportat sinèrgies de l'inhibidor amb altres fàrmacs, com el lapatinib per al càncer colorectal (Zhang et al., 2017b).

En conclusió, els inhibidors multiquinasa són fàrmacs prometedors per al tractament de diversos tipus de càncers. En aquest treball, es reporta el primer estudi preclínic en què s'avalua el potencial terapèutic del Regorafenib en hiperplàsies de tiroide i neoplàsies d'endometri i pròstata i es caracteritza el seu impacte en les vies de senyalització MAPK/ERK i PI3K/AKT tant *in vitro* com *in vivo*. A més, fins al moment, es tracta també del primer estudi en què l'eficàcia de l'inhibidor s'avalua en lesions tumorals induïdes per la pèrdua de PTEN. Els resultats postulen el Regorafenib com un possible candidat per al tractament de les hiperplàsies de tiroide deficientes en PTEN.

CONCLUSIONS

- **Primera**

La manca monoal·lèlica i bial·lèlica d'E2F-1 potencia la carcinogènesi de còlon per la via serrada induïda per la pèrdua PTEN, però no redueix les neoplàsies d'endometri i pròstata, ni les hiperplàsies de tiroide induïdes per la pèrdua de PTEN.

- **Segona**

L'absència d'E2F-1 redueix l'apoptosi de les lesions de còlon desenvolupades per la pèrdua de PTEN.

- **Tercera**

La manca d'E2F-1 condueix a una activació exacerbada de les MAPKs i a un increment de marcadors del dany al DNA a les lesions de còlon induïdes per la pèrdua de PTEN.

- **Quarta**

La pèrdua de PTEN dóna lloc a un increment de l'expressió de Ciclina D1 i Ki-67 a endometri, tiroide i pròstata.

- **Cinquena**

La manca de Ciclina D1 condueix a una lleugera disminució de la incidència i la progressió de les lesions endometrials induïdes per la pèrdua de PTEN, però no redueix les neoplàsies de pròstata ni les hiperplàsies de tiroide també induïdes per la pèrdua de PTEN.

- **Sisena**

La pèrdua de Ciclina D1 no redueix la proliferació ni bloqueja l'activitat de l'eix Ciclina D-CDK4/6 en els tumors sòlids induïts per la pèrdua de PTEN.

- **Setena**

La inhibició específica de CDK4/6 pel Palbociclib exerceix un efecte antiproliferatiu *in vitro* en cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí que creixen en tres dimensions.

- **Vuitena**

El tractament amb Palbociclib redueix, però no elimina, els carcinomes endometrials deficients per PTEN *in vivo*, però no les neoplàsies de pròstata ni les hiperplàsies de tiroide.

Conclusions

- **Novena**

El tractament amb Palbociclib redueix la proliferació de les línies cel·lulars humanes de carcinoma endometrial *in vitro*, i de xenotransplants de línies cel·lulars i de PDX *in vivo*.

- **Desena**

El tractament amb Regorafenib redueix la viabilitat *in vitro* en línies cel·lulars de càncer d'endometri, pròstata i tiroide i disrupciona la senyalització de la via PI3K/AKT en les mateixes.

- **Onzena**

El tractament amb Regorafenib *in vivo* redueix, però no elimina, les hiperplàsia de tiroide causades per la deficiència en PTEN, però no té cap efecte terapèutic en les neoplàsies de pròstata i endometri induïdes també per la pèrdua de PTEN.

- **Dotzena**

El tractament amb Regorafenib *in vivo* no dóna lloc a la disrupció de la via de senyalització PI3K/AKT però sí disminueix l'expressió de la Ciclina D1 a la tiroide.

BIBLIOGRAFIA

- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* *14*, 2410-2434.
- Abou-Elkacem, L., Arns, S., Brix, G., Gremse, F., Zopf, D., Kiessling, F., and Lederle, W. (2013). Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Mol Cancer Ther* *12*, 1322-1331.
- Agrawal, S., and Eng, C. (2006). Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet* *15*, 777-787.
- Aklilu, M., Kindler, H.L., Donehower, R.C., Mani, S., and Vokes, E.E. (2003). Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* *14*, 1270-1273.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph α . *Curr Biol* *7*, 261-269.
- Alimonti, A., Carracedo, A., Clohessy, J.G., Trotman, L.C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W.J., Brogi, E., *et al.* (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* *42*, 454-458.
- Alvarez-Nuñez, F., Bussaglia, E., Mauricio, D., Ybarra, J., Vilar, M., Lerma, E., de Leiva, A., Matias-Guiu, X., and Group, T.N.S. (2006). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* *16*, 17-23.
- Amodio, N., Scrima, M., Palaia, L., Salman, A.N., Quintiero, A., Franco, R., Botti, G., Pirozzi, P., Rocco, G., De Rosa, N., *et al.* (2010). Oncogenic role of the E3 ubiquitin ligase NEDD4-1, a PTEN negative regulator, in non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol* *177*, 2622-2634.
- Andjelković, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W., and 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.
- Andrechek, E.R. (2015). HER2/Neu tumorigenesis and metastasis is regulated by E2F activator transcription factors. *Oncogene* *34*, 217-225.
- Antico-Arciuch, V.G., Dima, M., Liao, X.H., Refetoff, S., and Di Cristofano, A. (2010). Cross-talk between PI3K and estrogen in the mouse thyroid predisposes to the development of follicular carcinomas with a higher incidence in females. *Oncogene* *29*, 5678-5686.
- Asghar, U., Witkiewicz, A.K., Turner, N.C., and Knudsen, E.S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* *14*, 130-146.
- Ashton, K.A., Proietto, A., Otton, G., Symonds, I., McEvoy, M., Attia, J., Gilbert, M., Hamann, U., and Scott, R.J. (2008). The influence of the Cyclin D1 870 G>A polymorphism as an endometrial cancer risk factor. *BMC Cancer* *8*, 272.
- Atreya, C.E., Sangale, Z., Xu, N., Matli, M.R., Tikishvili, E., Welbourn, W., Stone, S., Shokat, K.M., and Warren, R.S. (2013). PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Med* *2*, 496-506.
- Backman, S.A., Ghazarian, D., So, K., Sanchez, O., Wagner, K.U., Hennighausen, L., Suzuki, A., Tsao, M.S., Chapman, W.B., Stambolic, V., *et al.* (2004). Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1725-1730.
- Bai, F., Pei, X.H., Pandolfi, P.P., and Xiong, Y. (2006). p18 Ink4c and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol* *26*, 4564-4576.

Bibliografia

- Bandi, N., Zbinden, S., Gugger, M., Arnold, M., Kocher, V., Hasan, L., Kappeler, A., Brunner, T., and Vassella, E. (2009). miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69, 5553-5559.
- Barrière, C., Santamaría, D., Cerqueira, A., Galán, J., Martín, A., Ortega, S., Malumbres, M., Dubus, P., and Barbacid, M. (2007). Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol Oncol* 1, 72-83.
- Bartkova, J., Lukas, J., Müller, H., Lützhøft, D., Strauss, M., and Bartek, J. (1994). Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 57, 353-361.
- Bartkova, J., Lukas, J., Strauss, M., and Bartek, J. (1995). Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. *Oncogene* 10, 775-778.
- Bassi, C., Ho, J., Srikumar, T., Dowling, R.J., Gorrini, C., Miller, S.J., Mak, T.W., Neel, B.G., Raught, B., and Stambolic, V. (2013). Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* 341, 395-399.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Bauer, T.M., Patel, M.R., and Infante, J.R. (2015). Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther* 146, 53-60.
- Baughn, L.B., Di Liberto, M., Wu, K., Toogood, P.L., Louie, T., Gottschalk, R., Niesvizky, R., Cho, H., Ely, S., Moore, M.A., *et al.* (2006). A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res* 66, 7661-7667.
- Becker, C., Fantini, M.C., and Neurath, M.F. (2006). High resolution colonoscopy in live mice. *Nat Protoc* 1, 2900-2904.
- Bell, K.J., Del Mar, C., Wright, G., Dickinson, J., and Glasziou, P. (2015). Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer* 137, 1749-1757.
- Belvedere, O., Puglisi, F., Di Loreto, C., Cataldi, P., Guglielmi, A., Aschele, C., and Sobrero, A. (2004). Lack of correlation between immunohistochemical expression of E2F-1, thymidylate synthase expression and clinical response to 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 15, 55-58.
- Bendris, N., Lemmers, B., and Blanchard, J.M. (2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle* 14, 1786-1798.
- Benzeno, S., Lu, F., Guo, M., Barbash, O., Zhang, F., Herman, J.G., Klein, P.S., Rustgi, A., and Diehl, J.A. (2006). Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene* 25, 6291-6303.
- Berger, A.H., Knudson, A.G., and Pandolfi, P.P. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476, 163-169.
- Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2001). Ras induces elevation of E2F-1 mRNA levels. *J Biol Chem* 276, 42851-42856.
- Bertin-Ciftci, J., Barré, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P., and Braun, F. (2013). pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ* 20, 755-764.
- Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., and Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 62, 367-386.
- Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Res* 72, 13-17.

- Bièche, I., Olivi, M., Noguès, C., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2002). Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays. *Br J Cancer* *86*, 580-586.
- Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* *19*, 3704-3713.
- Bogaert, J., and Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* *27*, 9-14.
- Bokhman, J.V. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* *15*, 10-17.
- Bollard, J., Miguela, V., Ruiz de Galarreta, M., Venkatesh, A., Bian, C.B., Roberto, M.P., Tovar, V., Sia, D., Molina-Sánchez, P., Nguyen, C.B., *et al.* (2017). Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Gut* *66*, 1286-1296.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* *8*, 957-967.
- Bowe, D.B., Kenney, N.J., Adereth, Y., and Maroulakou, I.G. (2002). Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E. *Oncogene* *21*, 291-298.
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* *30*, 203-213.
- Bramis, J., Zacharatos, P., Papaconstantinou, I., Kotsinas, A., Sigala, F., Korkolis, D.P., Nikiteas, N., Pazaiti, A., Kittas, C., Bastounis, E., *et al.* (2004). E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. *Anticancer Res* *24*, 3041-3047.
- Brandmaier, A., Hou, S.Q., and Shen, W.H. (2017). Cell Cycle Control by PTEN. *J Mol Biol* *429*, 2265-2277.
- Brognaard, J., Sierrecki, E., Gao, T., and 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.
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., *et al.* (2017). Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *389*, 56-66.
- Byun, D.S., Ahmed, N., Nasser, S., Shin, J., Al-Obaidi, S., Goel, S., Corner, G.A., Wilson, A.J., Flanagan, D.J., Williams, D.S., *et al.* (2011). Intestinal epithelial-specific PTEN inactivation results in tumor formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *301*, G856-864.
- Cai, J., Fang, L., Huang, Y., Li, R., Yuan, J., Yang, Y., Zhu, X., Chen, B., Wu, J., and Li, M. (2013). miR-205 targets PTEN and PHLPP2 to augment AKT signaling and drive malignant phenotypes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* *73*, 5402-5415.
- Campanero, M.R., and Flemington, E.K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 2221-2226.
- Campbell, S.J., Carlotti, F., Hall, P.A., Clark, A.J., and Wolf, C.R. (1996). Regulation of the CYP1A1 promoter in transgenic mice: an exquisitely sensitive on-off system for cell specific gene regulation. *J Cell Sci* *109* (Pt 11), 2619-2625.
- Carcagno, A.L., Ogara, M.F., Sonzogni, S.V., Marazita, M.C., Sirkin, P.F., Ceruti, J.M., and Cánepa, E.T. (2009). E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB Life* *61*, 537-543.

Bibliografia

- Carnevale, J., Palander, O., Seifried, L.A., and Dick, F.A. (2012). DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 32, 900-912.
- Carr, B.I., Cavallini, A., Lippolis, C., D'Alessandro, R., Messa, C., Refolo, M.G., and Tafaro, A. (2013). Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence, and recovery. *J Cell Physiol* 228, 292-297.
- Carr, S.M., Poppy Roworth, A., Chan, C., and La Thangue, N.B. (2015). Post-translational control of transcription factors: methylation ranks highly. *FEBS J* 282, 4450-4465.
- Carver, B.S., and Pandolfi, P.P. (2006). Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* 12, 5305-5311.
- Casimiro, M.C., Velasco-Velázquez, M., Aguirre-Alvarado, C., and Pestell, R.G. (2014). Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin Investig Drugs* 23, 295-304.
- Cassinelli, G., Zuco, V., Gatti, L., Lanzi, C., Zaffaroni, N., Colombo, D., and Perego, P. (2013). Targeting the Akt kinase to modulate survival, invasiveness and drug resistance of cancer cells. *Curr Med Chem* 20, 1923-1945.
- Castillo, D.S., Campalans, A., Belluscio, L.M., Carcagno, A.L., Radicella, J.P., Cánepa, E.T., and Pregi, N. (2015). E2F1 and E2F2 induction in response to DNA damage preserves genomic stability in neuronal cells. *Cell Cycle* 14, 1300-1314.
- Chan, S.L., and Ma, B.B. (2014). An update on the safety and efficacy of regorafenib in the treatment of solid cancers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10, 1607-1614.
- Charles, R.P. (2015). Overview of Genetically Engineered Mouse Models of Papillary and Anaplastic Thyroid Cancers: Enabling Translational Biology for Patient Care Improvement. *Curr Protoc Pharmacol* 69, 14.33.11-14.
- Chen, H.Z., Tsai, S.Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9, 785-797.
- Chen, J., Zhu, F., Weaks, R.L., Biswas, A.K., Guo, R., Li, Y., and Johnson, D.G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 10, 1287-1294.
- Chen, K.T., Lin, J.D., Liou, M.J., Weng, H.F., Chang, C.A., and Chan, E.C. (2006). An aberrant autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor in follicular and papillary thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 231, 192-205.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.
- Cheney, I.W., Neuteboom, S.T., Vaillancourt, M.T., Ramachandra, M., and Bookstein, R. (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res* 59, 2318-2323.
- Cheung, T.H., Yu, M.M., Lo, K.W., Yim, S.F., Chung, T.K., and Wong, Y.F. (2001). Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. *Cancer Lett* 166, 199-206.
- Choi, Y.J., Li, X., Hydring, P., Sanda, T., Stefano, J., Christie, A.L., Signoretti, S., Look, A.T., Kung, A.L., von Boehmer, H., *et al.* (2012). The requirement for cyclin D function in tumor maintenance. *Cancer Cell* 22, 438-451.
- Chung, J.H., and Eng, C. (2005). Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* 65, 8096-8100.
- Ciampi, R., Zhu, Z., and Nikiforov, Y.E. (2005). BRAF copy number gains in thyroid tumors

- detected by fluorescence in situ hybridization. *Endocr Pathol* 16, 99-105.
- Ciccarese, C., Massari, F., Iacovelli, R., Fiorentino, M., Montironi, R., Di Nunno, V., Giunchi, F., Brunelli, M., and Tortora, G. (2017). Prostate cancer heterogeneity: Discovering novel molecular targets for therapy. *Cancer Treat Rev* 54, 68-73.
- Clark, A.S., Karasic, T.B., DeMichele, A., Vaughn, D.J., O'Hara, M., Perini, R., Zhang, P., Lal, P., Feldman, M., Gallagher, M., *et al.* (2016). Palbociclib (PD0332991)-a Selective and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor: A Review of Pharmacodynamics and Clinical Development. *JAMA Oncol* 2, 253-260.
- Colicchia, M., Morlacco, A., Cheville, J.C., and Karnes, R.J. (2017). Genomic tests to guide prostate cancer management following diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 17, 367-377.
- Comstock, C.E., Augello, M.A., Goodwin, J.F., de Leeuw, R., Schiewer, M.J., Ostrander, W.F., Burkhart, R.A., McClendon, A.K., McCue, P.A., Trabulsi, E.J., *et al.* (2013). Targeting cell cycle and hormone receptor pathways in cancer. *Oncogene* 32, 5481-5491.
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B., and Engelman, J.A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 28, 1075-1083.
- Cristofanilli, M., Turner, N.C., Bondarenko, I., Ro, J., Im, S.A., Masuda, N., Colleoni, M., DeMichele, A., Loi, S., Verma, S., *et al.* (2016). Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 17, 425-439.
- Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., and Adamson, S.L. (2014). *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*.
- da Silva, R.C., de Paula, H.S., Leal, C.B., Cunha, B.C., de Paula, E.C., Alencar, R.C., Meneghini, A.J., Silva, A.M., Gontijo, A.P., Wastowski, I.J., *et al.* (2015). BRAF overexpression is associated with BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas. *Genet Mol Res* 14, 5065-5075.
- Daikoku, T., Hirota, Y., Tranguch, S., Joshi, A.R., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Ellenson, L.H., and Dey, S.K. (2008). Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res* 68, 5619-5627.
- Dar, A.A., Majid, S., de Semir, D., Nosrati, M., Bezrookove, V., and Kashani-Sabet, M. (2011). miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein. *J Biol Chem* 286, 16606-16614.
- Darling, S., Fielding, A.B., Sabat-Pośpiech, D., Prior, I.A., and Coulson, J.M. (2017). Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. *Biochem Soc Trans*.
- Das, V., Kalita, J., and Pal, M. (2017). Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother* 87, 8-19.
- de Araujo-Filho, V.J., Alves, V.A., de Castro, I.V., Lourenço, S.V., Cernea, C.R., Brandão, L.G., and Ferraz, A.R. (2009). Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 19, 1233-1237.
- De Meyer, T., Bijsmans, I.T., Van de Vijver, K.K., Bekaert, S., Oosting, J., Van Criekinge, W., van Engeland, M., and Sieben, N.L. (2009). E2Fs mediate a fundamental cell-cycle deregulation in high-grade serous ovarian carcinomas. *J Pathol* 217, 14-20.
- De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., and Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12, 594-603.

Bibliografia

- Dean, J.L., McClendon, A.K., and Knudsen, E.S. (2012). Modification of the DNA damage response by therapeutic CDK4/6 inhibition. *J Biol Chem* *287*, 29075-29087.
- Demetri, G.D., Reichardt, P., Kang, Y.K., Blay, J.Y., Rutkowski, P., Gelderblom, H., Hohenberger, P., Leahy, M., von Mehren, M., Joensuu, H., *et al.* (2013). Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *381*, 295-302.
- Denechaud, P.D., Lopez-Mejia, I.C., Giral, A., Lai, Q., Blanchet, E., Delacuisine, B., Nicolay, B.N., Dyson, N.J., Bonner, C., Pattou, F., *et al.* (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J Clin Invest* *126*, 137-150.
- Deshpande, A., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* *24*, 2909-2915.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* *19*, 348-355.
- Dick, F.A., and Rubin, S.M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 297-306.
- Dickson, C., Fantl, V., Gillett, C., Brookes, S., Bartek, J., Smith, R., Fisher, C., Barnes, D., and Peters, G. (1995). Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett* *90*, 43-50.
- Dickson, M.A. (2014). Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* *20*, 3379-3383.
- Dickson, M.A., Tap, W.D., Keohan, M.L., D'Angelo, S.P., Gounder, M.M., Antonescu, C.R., Landa, J., Qin, L.X., Rathbone, D.D., Condy, M.M., *et al.* (2013). Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *J Clin Oncol* *31*, 2024-2028.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* *12*, 3499-3511.
- Diehl, J.A., Zindy, F., and Sherr, C.J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* *11*, 957-972.
- Dimova, D.K., and Dyson, N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* *24*, 2810-2826.
- Docquier, A., Harmand, P.O., Fritsch, S., Chanrion, M., Darbon, J.M., and Cavailles, V. (2010). The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* *16*, 2959-2970.
- Dong, Y.B., Yang, H.L., and McMasters, K.M. (2003). E2F-1 overexpression sensitizes colorectal cancer cells to camptothecin. *Cancer Gene Ther* *10*, 168-178.
- Dosil, M.A., Mirantes, C., Eritja, N., Felip, I., Navaridas, R., Gatus, S., Santacana, M., Colàs, E., Moiola, C., Schoenenberger, J.A., *et al.* (2017). Palbociclib has antitumour effects on Pten-deficient endometrial neoplasias. *J Pathol* *242*, 152-164.
- Dynlacht, B.D., Moberg, K., Lees, J.A., Harlow, E., and Zhu, L. (1997). Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* *17*, 3867-3875.
- Eisen, T., Joensuu, H., Nathan, P.D., Harper, P.G., Wojtukiewicz, M.Z., Nicholson, S., Bahl, A., Tomczak, P., Pyrhonen, S., Fife, K., *et al.* (2012). Regorafenib for patients with previously untreated metastatic or unresectable renal-cell carcinoma: a single-group phase 2 trial. *Lancet Oncol* *13*, 1055-1062.

- el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39, 186-193.
- Elliott, M.J., Dong, Y.B., Yang, H., and McMasters, K.M. (2001). E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 7, 3590-3597.
- Elliott, M.J., Stilwell, A., Dong, Y.B., Yang, H.L., Wong, S.L., Wrightson, W.R., Martin, R.C., and McMasters, K.M. (2002). C-terminal deletion mutant p21(WAF1/CIP1) enhances E2F-1-mediated apoptosis in colon adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 9, 453-463.
- Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9, 550-562.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.
- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res* 72, 571-575.
- Eritja, N., Domingo, M., Dosil, M.A., Mirantes, C., Santacana, M., Valls, J., Llombart-Cussac, A., Matias-Guiu, X., and Dolcet, X. (2014). Combinatorial therapy using dovitinib and ICI182.780 (fulvestrant) blocks tumoral activity of endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther* 13, 776-787.
- Eritja, N., Santacana, M., Maiques, O., Gonzalez-Tallada, X., Dolcet, X., and 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.
- Escrivà, M., Peiró, S., Herranz, N., Villagrasa, P., Dave, N., Montserrat-Sentís, B., Murray, S.A., Francí, C., Gridley, T., Virtanen, I., *et al.* (2008). Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 28, 1528-1540.
- Fagan, R., Flint, K.J., and Jones, N. (1994). Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* 78, 799-811.
- Fajas, L., Annicotte, J.S., Miard, S., Sarruf, D., Watanabe, M., and Auwerx, J. (2004). Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice. *J Clin Invest* 113, 1288-1295.
- Fan, X.J., Wan, X.B., Fu, X.H., Wu, P.H., Chen, D.K., Wang, P.N., Jiang, L., Wang, D.H., Chen, Z.T., Huang, Y., *et al.* (2014). Phosphorylated p38, a negative prognostic biomarker, complements TNM staging prognostication in colorectal cancer. *Tumour Biol* 35, 10487-10495.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9, 2364-2372.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549-561.
- Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L., and Conti, C.J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633.
- Finn, R.S., Crown, J.P., Lang, I., Boer, K., Bondarenko, I.M., Kulyk, S.O., Ettl, J., Patel, R., Pinter, T., Schmidt, M., *et al.* (2015). The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in

Bibliografia

- combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 16, 25-35.
- Finn, R.S., Martin, M., Rugo, H.S., Jones, S., Im, S.A., Gelmon, K., Harbeck, N., Lipatov, O.N., Walshe, J.M., Moulder, S., *et al.* (2016). Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 375, 1925-1936.
- Fraser, M.M., Zhu, X., Kwon, C.H., Uhlmann, E.J., Gutmann, D.H., and Baker, S.J. (2004). Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res* 64, 7773-7779.
- Freeman, D., Lesche, R., Kertesz, N., Wang, S., Li, G., Gao, J., Groszer, M., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Thomas, G., *et al.* (2006). Genetic background controls tumor development in PTEN-deficient mice. *Cancer Res* 66, 6492-6496.
- 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., *et al.* (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 3, 117-130.
- Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., *et al.* (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3, 1427-1438.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Yung, W.K., Liu, T.J., Alemany, R., McDonnell, T.J., Shi, X., Rao, J.S., Levin, V.A., and Kyritsis, A.P. (1998). Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth in vitro and in vivo. *Nat Med* 4, 685-690.
- Fujiwara, K., Yuwanita, I., Hollern, D.P., and Andrechek, E.R. (2011). Prediction and genetic demonstration of a role for activator E2Fs in Myc-induced tumors. *Cancer Res* 71, 1924-1932.
- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4, 930-939.
- Gao, D., Zhan, Y., Di, W., Moore, A.R., Sher, J.J., Guan, Y., Wang, S., Zhang, Z., Murphy, D.A., Sawyers, C.L., *et al.* (2016). A Tmprss2-CreERT2 Knock-In Mouse Model for Cancer Genetic Studies on Prostate and Colon. *PLoS One* 11, e0161084.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18, 13-24.
- Gatius, S., Velasco, A., Azueta, A., Santacana, M., Pallares, J., Valls, J., Dolcet, X., Prat, J., and Matias-Guiu, X. (2011). FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 24, 1500-1510.
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Bronson, R.T., and Sicinski, P. (2001). Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 194-199.
- George, D.J. (2002). Receptor tyrosine kinases as rational targets for prostate cancer treatment: platelet-derived growth factor receptor and imatinib mesylate. *Urology* 60, 115-121; discussion 122.
- Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Akagi, T., Shishido, T., and Hanafusa, H. (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10182-10187.
- Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Kaloudis, P., Yang, H., Pavletich, N.P., and Hanafusa, H. (2000). Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 60, 7033-7038.

- Ginn-Pease, M.E., and Eng, C. (2003). Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res* *63*, 282-286.
- Gohil, K. (2015). Pharmaceutical approval update. *P T* *40*, 251-287.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletsas, D., Asimacopoulos, P.J., Agnantis, N., Kittas, C., and Papavassiliou, A.G. (2002). Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* *198*, 142-156.
- Gottschalk, A.R., Basila, D., Wong, M., Dean, N.M., Brandts, C.H., Stokoe, D., and Haas-Kogan, D.A. (2001). p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest. *Cancer Res* *61*, 2105-2111.
- Groothuis, P.G., Dassen, H.H., Romano, A., and Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* *13*, 405-417.
- Grothey, A., Van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., *et al.* (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *381*, 303-312.
- Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *4*, 361-370.
- Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A.J., Okkenhaug, K., and 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.
- Guo, R., Chen, J., Zhu, F., Biswas, A.K., Berton, T.R., Mitchell, D.L., and Johnson, D.G. (2010). E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem* *285*, 19308-19315.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* *19*, 5785-5799.
- Han, S., Park, K., Bae, B.N., Kim, K.H., Kim, H.J., Kim, Y.D., and Kim, H.Y. (2003). E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* *82*, 11-16.
- Hayashi, S., and 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.
- He, J., Kang, X., Yin, Y., Chao, K.S., and Shen, W.H. (2015). PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery. *Nat Commun* *6*, 7620.
- He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., *et al.* (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* *39*, 189-198.
- Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* *23*, 1515-1527.
- Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M.K., Lee, M.K., de Belle, I., Zhang, J.T., Reddy, S.A., and Sabapathy, K. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ* *14*, 218-229.
- 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., *et al.* (2014).

Bibliografia

- Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 4, 998-1013.
- Hofmeister, C.C., Poi, M., Bowers, M.A., Zhao, W., Phelps, M.A., Benson, D.M., Kraut, E.H., Farag, S., Efebera, Y.A., Sexton, J., *et al.* (2014). A phase I trial of flavopiridol in relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 73, 249-257.
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., and Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 11, 289-301.
- Hopkins, B.D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Rapp, Z., Shaw, J., Pappas, K., Yu, J.S., Hodakoski, C., Mense, S., *et al.* (2013). A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* 341, 399-402.
- Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., *et al.* (2004). Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 113, 1774-1783.
- Hou, S.Q., Ouyang, M., Brandmaier, A., Hao, H., and Shen, W.H. (2017). PTEN in the maintenance of genome integrity: From DNA replication to chromosome segregation. *Bioessays* 39.
- Hsu, F.T., Sun, C.C., Wu, C.H., Lee, Y.J., Chiang, C.H., and Wang, W.S. (2017). Regorafenib Induces Apoptosis and Inhibits Metastatic Potential of Human Bladder Carcinoma Cells. *Anticancer Res* 37, 4919-4926.
- Huang, E.H., Carter, J.J., Whelan, R.L., Liu, Y.H., Rosenberg, J.O., Rotterdam, H., Schmidt, A.M., Stern, D.M., and Forde, K.A. (2002). Colonoscopy in mice. *Surg Endosc* 16, 22-24.
- Hydbring, P., Malumbres, M., and Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 280-292.
- Hühns, M., Salem, T., Schneider, B., Krohn, M., Linnebacher, M., and Prall, F. (2014). PTEN mutation, loss of heterozygosity, promoter methylation and expression in colorectal carcinoma: two hits on the gene? *Oncol Rep* 31, 2236-2244.
- Iacobucci, I., Ferrari, A., Lonetti, A., Papayannidis, C., Paoloni, F., Trino, S., Storlazzi, C.T., Ottaviani, E., Cattina, F., Impera, L., *et al.* (2011). CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res* 17, 7413-7423.
- Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279, 30830-30835.
- Iglesias-Ara, A., Zenarruzabeitia, O., Buelta, L., Merino, J., and Zubiaga, A.M. (2015). E2F1 and E2F2 prevent replicative stress and subsequent p53-dependent organ involution. *Cell Death Differ* 22, 1577-1589.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Winton, D.J. (2004). Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* 126, 1236-1246.
- Ivanova, I.A., Nakrieko, K.A., and Dagnino, L. (2009). Phosphorylation by p38 MAP kinase is required for E2F1 degradation and keratinocyte differentiation. *Oncogene* 28, 52-62.
- Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113-130.
- Jia, Z., Wang, K., Zhang, A., Wang, G., Kang, C., Han, L., and Pu, P. (2013). miR-19a and miR-19b overexpression in gliomas. *Pathol Oncol Res* 19, 847-853.
- Jiang, W., Kahn, S.M., Tomita, N., Zhang, Y.J., Lu, S.H., and Weinstein, I.B. (1992).

- Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 52, 2980-2983.
- Johnson, D.G., Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1994). Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev* 8, 1514-1525.
- Kamat, A.A., Merritt, W.M., Coffey, D., Lin, Y.G., Patel, P.R., Broaddus, R., Nugent, E., Han, L.Y., Landen, C.N., Spannuth, W.A., *et al.* (2007). Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 13, 7487-7495.
- Kambara, T., Simms, L.A., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Wynter, C.V., Walsh, M.D., Barker, M.A., Arnold, S., McGivern, A., Matsubara, N., *et al.* (2004). BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53, 1137-1144.
- Kandel, E.S., Skeen, J., Majewski, N., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Feliciano, C.S., Gartel, A., and Hay, N. (2002). Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 7831-7841.
- Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C.C., *et al.* (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67-73.
- Kang, X., Song, C., Du, X., Zhang, C., Liu, Y., Liang, L., He, J., Lamb, K., Shen, W.H., and Yin, Y. (2015). PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation. *Sci Rep* 5, 17873.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7, 331-342.
- Kato, S., Schwaederle, M., Daniels, G.A., Piccioni, D., Kesari, S., Bazhenova, L., Shimabukuro, K., Parker, B.A., Fanta, P., and Kurzrock, R. (2015). Cyclin-dependent kinase pathway aberrations in diverse malignancies: clinical and molecular characteristics. *Cell Cycle* 14, 1252-1259.
- Kaur, M., and 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.
- Khan, K.H., Yap, T.A., Yan, L., and Cunningham, D. (2013). Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin J Cancer* 32, 253-265.
- Khan, M.S., Pandith, A.A., Azad, N., Hussain, M.U., Masoodi, S.R., Wani, K.A., Andrabi, K.I., and Mudassar, S. (2014). Impact of molecular alterations of BRAF in the pathogenesis of thyroid cancer. *Mutagenesis* 29, 131-137.
- Khan, S., Kumagai, T., Vora, J., Bose, N., Sehgal, I., Koeffler, P.H., and Bose, S. (2004). PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 112, 407-410.
- Khatib, Z.A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D.N., Sherr, C.J., and Look, A.T. (1993). Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* 53, 5535-5541.
- Kim, S.J., Lee, H.W., Baek, J.H., Cho, Y.H., Kang, H.G., Jeong, J.S., Song, J., Park, H.S., and Chun, K.H. (2016). Activation of nuclear PTEN by inhibition of Notch signaling induces G2/M cell cycle arrest in gastric cancer. *Oncogene* 35, 251-260.
- Kirschner, L.S., Qamri, Z., Kari, S., and Ashtekar, A. (2016). Mouse models of thyroid cancer: A 2015 update. *Mol Cell Endocrinol* 421, 18-27.
- Knobbe, C.B., Lapin, V., Suzuki, A., and Mak, T.W. (2008). The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene* 27, 5398-5415.

Bibliografia

- Knostman, K.A., Jhiang, S.M., and Capen, C.C. (2007). Genetic alterations in thyroid cancer: the role of mouse models. *Vet Pathol* 44, 1-14.
- Knudsen, K.E., Diehl, J.A., Haiman, C.A., and Knudsen, E.S. (2006). Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 25, 1620-1628.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kontaki, H., and Talianidis, I. (2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell* 39, 152-160.
- Korpershoek, E., Loonen, A.J., Corvers, S., van Nederveen, F.H., Jonkers, J., Ma, X., Ziel-van der Made, A., Korsten, H., Trapman, J., Dinjens, W.N., *et al.* (2009). Conditional Pten knock-out mice: a model for metastatic pheochromocytoma. *J Pathol* 217, 597-604.
- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., *et al.* (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Lakin, N.D., and Jackson, S.P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644-7655.
- Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 9, 13-22.
- Langlois, M.J., Roy, S.A., Auclair, B.A., Jones, C., Boudreau, F., Carrier, J.C., Rivard, N., and Perreault, N. (2009). Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *FASEB J* 23, 1835-1844.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-20616.
- Law, M.E., Corsino, P.E., Narayan, S., and Law, B.K. (2015). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol Pharmacol* 88, 846-852.
- Lee, J., Park, C.K., Park, J.O., Lim, T., Park, Y.S., Lim, H.Y., Lee, I., Sohn, T.S., Noh, J.H., Heo, J.S., *et al.* (2008). Impact of E2F-1 expression on clinical outcome of gastric adenocarcinoma patients with adjuvant chemoradiation therapy. *Clin Cancer Res* 14, 82-88.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323-334.
- Lee, J.Y., Kang, M.B., Jang, S.H., Qian, T., Kim, H.J., Kim, C.H., Kim, Y., and Kong, G. (2009). Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene* 28, 824-831.
- Lee, S., Song, Y.A., Park, Y.L., Cho, S.B., Lee, W.S., Lee, J.H., Chung, I.J., Kim, K.K., Rew, J.S., and Joo, Y.E. (2011). Expression of KITENIN in human colorectal cancer and its relation to tumor behavior and progression. *Pathol Int* 61, 210-220.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 277, 20336-20342.
- Leonard, J.P., LaCasce, A.S., Smith, M.R., Noy, A., Chirieac, L.R., Rodig, S.J., Yu, J.Q., Vallabhajosula, S., Schoder, H., English, P., *et al.* (2012). Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 119, 4597-4607.

- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X., and Wu, H. (2002). Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* 32, 148-149.
- Leslie, N.R., Kriplani, N., Hermida, M.A., Alvarez-Garcia, V., and Wise, H.M. (2016). The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation. *Biochem Soc Trans* 44, 273-278.
- Leystra, A.A., Deming, D.A., Zahm, C.D., Farhoud, M., Olson, T.J., Hadac, J.N., Nettekoven, L.A., Albrecht, D.M., Clipson, L., Sullivan, R., *et al.* (2012). Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer. *Cancer Res* 72, 2931-2936.
- Li, A.G., Piluso, L.G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W.R., and Liu, X. (2006). Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell* 23, 575-587.
- Li, D.M., and Sun, H. (1997). TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 57, 2124-2129.
- Li, D.M., and Sun, H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15406-15411.
- Li, G., Robinson, G.W., Lesche, R., Martinez-Diaz, H., Jiang, Z., Rozengurt, N., Wagner, K.U., Wu, D.C., Lane, T.F., Liu, X., *et al.* (2002). Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development* 129, 4159-4170.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., *et al.* (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, M., Wei, M., Jiang, Z., Wei, H., Lu, W., Dou, W., and Lu, S. (2014). BRAF overexpression induces rampant glioma proliferation independent of phospho-EGFR expression. *Adv Clin Exp Med* 23, 893-899.
- Li, M., Yang, J., Zhou, W., Ren, Y., Wang, X., Chen, H., Zhang, J., Chen, J., Sun, Y., Cui, L., *et al.* (2017). Activation of an AKT/FOXM1/STMN1 pathway drives resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Br J Cancer* 117, 974-983.
- Li, Y., Guessous, F., DiPierro, C., Zhang, Y., Mudrick, T., Fuller, L., Johnson, E., Marcinkiewicz, L., Engelhardt, M., Kefas, B., *et al.* (2009). Interactions between PTEN and the c-Met pathway in glioblastoma and implications for therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 376-385.
- Li, Y., Sun, J., Cai, Y., Jiang, Y., Wang, X., Huang, X., Yin, Y., and Li, H. (2016). MiR-200a acts as an oncogene in colorectal carcinoma by targeting PTEN. *Exp Mol Pathol*.
- Lian, Z., and Di Cristofano, A. (2005). Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene* 24, 7394-7400.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Lin, Z., Ren, N., Jiang, Y., Xu, W., Shi, Y., and Liu, G. (2015). Adenovirus-Mediated E2F-1 Gene Transfer Augments Gemcitabine-Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Clin Lab* 61, 1435-1444.
- Liu, G.L., Yang, H.J., Liu, B., and Liu, T. (2017). Effects of MicroRNA-19b on the Proliferation, Apoptosis, and Migration of Wilms' Tumor Cells Via the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *J Cell Biochem* 118, 3424-3434.

Bibliografia

- Liu, J.J., Chao, J.R., Jiang, M.C., Ng, S.Y., Yen, J.J., and Yang-Yen, H.F. (1995). Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 15, 3654-3663.
- Liu, J.L., Mao, Z., LaFortune, T.A., Alonso, M.M., Gallick, G.E., Fueyo, J., and Yung, W.K. (2007). Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. *Cancer Res* 67, 11054-11063.
- Liu, K., Lin, F.T., Ruppert, J.M., and Lin, W.C. (2003). Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 23, 3287-3304.
- Liu, K., Paik, J.C., Wang, B., Lin, F.T., and Lin, W.C. (2006). Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *EMBO J* 25, 4795-4807.
- Llobet, D., Eritja, N., Yeramian, A., Pallares, J., Sorolla, A., Domingo, M., Santacana, M., Gonzalez-Tallada, F.J., Matias-Guiu, X., and 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.
- Loupakis, F., Pollina, L., Stasi, I., Ruzzo, A., Scartozzi, M., Santini, D., Masi, G., Graziano, F., Cremolini, C., Rulli, E., *et al.* (2009). PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 2622-2629.
- Lu, T.L., Chang, J.L., Liang, C.C., You, L.R., and Chen, C.M. (2007). Tumor spectrum, tumor latency and tumor incidence of the Pten-deficient mice. *PLoS One* 2, e1237.
- Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., van der Korput, H.A., Vermeij, M., van Duijn, P., Cleutjens, K.B., de Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., *et al.* (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res* 65, 5730-5739.
- Macleod, K. (1999). pRb and E2f-1 in mouse development and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 31-39.
- Maddika, S., Kavela, S., Rani, N., Palicharla, V.R., Pokorny, J.L., Sarkaria, J.N., and Chen, J. (2011). WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol* 13, 728-733.
- Maehama, T., and 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.
- Majithia, N., and Grothey, A. (2016). Regorafenib in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 17, 137-145.
- Malaney, P., Nicosia, S.V., and Davé, V. (2014). One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett* 344, 1-12.
- Malaney, P., Uversky, V.N., and Davé, V. (2017). PTEN proteoforms in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* 74, 2783-2794.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 15, 122.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17, 60-65.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Marsh, D.J., Coulon, V., Lunetta, K.L., Rocca-Serra, P., Dahia, P.L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboué, B., Lin, A.Y., *et al.* (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with

- germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 7, 507-515.
- Marsh Durban, V., Jansen, M., Davies, E.J., Morsink, F.H., Offerhaus, G.J., and Clarke, A.R. (2014). Epithelial-specific loss of PTEN results in colorectal juvenile polyp formation and invasive cancer. *Am J Pathol* 184, 86-91.
- Marsh, V., Winton, D.J., Williams, G.T., Dubois, N., Trumpp, A., Sansom, O.J., and Clarke, A.R. (2008). Epithelial Pten is dispensable for intestinal homeostasis but suppresses adenoma development and progression after Apc mutation. *Nat Genet* 40, 1436-1444.
- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D.P., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, R.A., Livingston, D.M., and Grossman, S.R. (2001). p19ARF targets certain E2F species for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4455-4460.
- Martínez-Balbás, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19, 662-671.
- Matsushime, H., Rousset, M.F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65, 701-713.
- Mayekar, M.K., and Bivona, T.G. (2017). Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer. *Clin Pharmacol Ther* 102, 757-764.
- McClendon, A.K., Dean, J.L., Rivadeneira, D.B., Yu, J.E., Reed, C.A., Gao, E., Farber, J.L., Force, T., Koch, W.J., and Knudsen, E.S. (2012). CDK4/6 inhibition antagonizes the cytotoxic response to anthracycline therapy. *Cell Cycle* 11, 2747-2755.
- McLellan, M.A., Rosenthal, N.A., and Pinto, A.R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* 7, 1-12.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647-658.
- Menu, E., Garcia, J., Huang, X., Di Liberto, M., Toogood, P.L., Chen, I., Vanderkerken, K., and Chen-Kiang, S. (2008). A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model. *Cancer Res* 68, 5519-5523.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and 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.
- Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., Nuzzo, C.M., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., *et al.* (2015). PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol* 5, 24.
- Mirantes, C., Dosil, M.A., Hills, D., Yang, J., Eritja, N., Santacana, M., Gatus, S., Vilardell, F., Medvinsky, A., Matias-Guiu, X., *et al.* (2016). Deletion of Pten in CD45-expressing cells leads to development of T-cell lymphoblastic lymphoma but not myeloid malignancies. *Blood* 127, 1907-1911.
- Mirantes, C., Eritja, N., Dosil, M.A., Santacana, M., Pallares, J., Gatus, S., Bergadà, L., Maiques, O., Matias-Guiu, X., and Dolcet, X. (2013). An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Dis Model Mech* 6, 710-720.
- Molinari, F., and Frattini, M. (2013). Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 3, 326.
- Morales, L.D., Casillas Pavón, E.A., Shin, J.W., Garcia, A., Capetillo, M., Kim, D.J., and Lieman, J.H. (2014). Protein tyrosine phosphatases

Bibliografía

- PTP-1B, SHP-2, and PTEN facilitate Rb/E2F-associated apoptotic signaling. *PLoS One* *9*, e97104.
- Moreno-Bueno, G., Rodríguez-Perales, S., Sánchez-Estévez, C., Hardisson, D., Sarrió, D., Prat, J., Cigudosa, J.C., Matias-Guiu, X., and Palacios, J. (2003). Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene* *22*, 6115-6118.
- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H.G., Jüppner, H., Ruderman, J.V., Kronenberg, H.M., and Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* *350*, 512-515.
- Munro, S., Carr, S.M., and La Thangue, N.B. (2012). Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene* *31*, 4343-4352.
- Murali, R., Soslow, R.A., and Weigelt, B. (2014). Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol* *15*, e268-278.
- Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* *11*, 558-572.
- Myers, M.P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.I., Wigler, M.H., Parsons, R., and Tonks, N.K. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9052-9057.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., and Rodríguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* *18*.
- Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* *15*, 267-285.
- Nagy, Z., and Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* *26*, 5341-5357.
- Naidu, R., Wahab, N.A., Yadav, M.M., and Kutty, M.K. (2002). Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinicopathological parameters. *Oncol Rep* *9*, 409-416.
- Nelson, M.A., Reynolds, S.H., Rao, U.N., Goulet, A.C., Feng, Y., Beas, A., Honchak, B., Averill, J., Lowry, D.T., Senft, J.R., *et al.* (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther* *5*, 407-412.
- Network, C.G.A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* *487*, 330-337.
- Nikaido, T., Li, S.F., Shiozawa, T., and Fujii, S. (1996). Coabnormal expression of cyclin D1 and p53 protein in human uterine endometrial carcinomas. *Cancer* *78*, 1248-1253.
- Obama, K., Kanai, M., Kawai, Y., Fukushima, M., and Takabayashi, A. (2002). Role of retinoblastoma protein and E2F-1 transcription factor in the acquisition of 5-fluorouracil resistance by colon cancer cells. *Int J Oncol* *21*, 309-314.
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* *281*, 26562-26568.
- Ozuysal, S., Oztürk, H., Bilgin, T., and Filiz, G. (2005). Expression of cyclin D1 in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium and its correlation with Ki-67 and clinicopathological variables. *Arch Gynecol Obstet* *271*, 123-126.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., and Williams, R.L. (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector

- phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 103, 931-943.
- Papa, A., Wan, L., Bonora, M., Salmena, L., Song, M.S., Hobbs, R.M., Lunardi, A., Webster, K., Ng, C., Newton, R.H., *et al.* (2014). Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell* 157, 595-610.
- Paramio, J.M., Navarro, M., Segrelles, C., Gómez-Casero, E., and Jorcano, J.L. (1999). PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene* 18, 7462-7468.
- Park, S., Lee, J., Do, I.G., Jang, J., Rho, K., Ahn, S., Maruja, L., Kim, S.J., Kim, K.M., Mao, M., *et al.* (2014). Aberrant CDK4 amplification in refractory rhabdomyosarcoma as identified by genomic profiling. *Sci Rep* 4, 3623.
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C.P., Smith, S.A., and Macphee, C.H. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol* 11, 764-768.
- Patel, R., Gao, M., Ahmad, I., Fleming, J., Singh, L.B., Rai, T.S., McKie, A.B., Seywright, M., Barnetson, R.J., Edwards, J., *et al.* (2013). Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression. *J Clin Invest* 123, 1157-1175.
- Pestell, R.G. (2013). New roles of cyclin D1. *Am J Pathol* 183, 3-9.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., and Vousden, K.H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* 4, 771-781.
- Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I.B., Russell, J.L., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (1999). E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol* 19, 6408-6414.
- Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316, 1324-1331.
- Piulats, J.M., Guerra, E., Gil-Martín, M., Roman-Canal, B., Gatiús, S., Sanz-Pamplona, R., Velasco, A., Vidal, A., and Matias-Guiu, X. (2017). Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 145, 200-207.
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and 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.
- Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M.S., Hobbs, R.M., Sportoletti, P., Varmeh, S., Egia, A., Fedele, G., *et al.* (2010a). Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* 3, ra29.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010b). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033-1038.
- Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol Cell Oncol* 2, e970480.
- Porth, C.M., and Grossman, S. (2014). *Fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos*, 9ª edn.
- Prat, J., Gallardo, A., Cuatrecasas, M., and Catasús, L. (2007). Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology* 39, 72-87.
- Puc, J., Keniry, M., Li, H.S., Pandita, T.K., Choudhury, A.D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V.V., Gaciong, Z., Meek, S.E., *et al.* (2005). Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 7, 193-204.
- Pulido, R. (2015). PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods* 77-78, 3-10.

Bibliografía

- Puxeddu, E., Zhao, G., Stringer, J.R., Medvedovic, M., Moretti, S., and Fagin, J.A. (2005). Characterization of novel non-clonal intrachromosomal rearrangements between the H4 and PTEN genes (H4/PTEN) in human thyroid cell lines and papillary thyroid cancer specimens. *Mutat Res* 570, 17-32.
- Qie, S., and Diehl, J.A. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)* 94, 1313-1326.
- Rabbani, F., Richon, V.M., Orlow, I., Lu, M.L., Drobnjak, M., Dudas, M., Charytonowicz, E., Dalbagni, G., and Cordon-Cardo, C. (1999). Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. *J Natl Cancer Inst* 91, 874-881.
- Rad, R., Cadiñanos, J., Rad, L., Varela, I., Strong, A., Kriegel, L., Constantino-Casas, F., Eser, S., Hieber, M., Seidler, B., *et al.* (2013). A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell* 24, 15-29.
- Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H., and Georgescu, M.M. (2003). PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 23, 6139-6149.
- Rajabi, S., and Hedayati, M. (2017). Medullary Thyroid Cancer: Clinical Characteristics and New Insights into Therapeutic Strategies Targeting Tyrosine Kinases. *Mol Diagn Ther.*
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M., and Sellers, W.R. (1999). Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2110-2115.
- Ramos-García, P., Gil-Montoya, J.A., Scully, C., Ayén, A., González-Ruiz, L., Navarro-Triviño, F.J., and González-Moles, M.A. (2017). An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis* 23, 897-912.
- Ratnacaram, C.K., Teletin, M., Jiang, M., Meng, X., Chambon, P., and Metzger, D. (2008). Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2521-2526.
- Reddy, H.K., Mettus, R.V., Rane, S.G., Graña, X., Litvin, J., and Reddy, E.P. (2005). Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* 65, 10174-10178.
- Rennie, P.S., and Nelson, C.C. (1998). Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 17, 401-409.
- Roberts, E., Cossigny, D.A., and Quan, G.M. (2013). The role of vascular endothelial growth factor in metastatic prostate cancer to the skeleton. *Prostate Cancer* 2013, 418340.
- Roberts, P.J., Bisi, J.E., Strum, J.C., Combest, A.J., Darr, D.B., Usary, J.E., Zamboni, W.C., Wong, K.K., Perou, C.M., and Sharpless, N.E. (2012). Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 104, 476-487.
- Robles, A.I., Rodriguez-Puebla, M.L., Glick, A.B., Trempus, C., Hansen, L., Sicinski, P., Tennant, R.W., Weinberg, R.A., Yuspa, S.H., and Conti, C.J. (1998). Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes Dev* 12, 2469-2474.
- Rose, P.G. (1996). Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 335, 640-649.
- Ross, M.H., and Pawlina, W. (2015). *Histología. Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular*, 7ª edn.
- Rowlands, T.M., Pechenkina, I.V., Hatsell, S.J., Pestell, R.G., and Cowin, P. (2003). Dissecting the roles of beta-catenin and cyclin D1 during mammary development and neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11400-11405.
- Ruhul Quddus, M., Latkovich, P., Castellani, W.J., James Sung, C., Steinhoff, M.M., Briggs,

- R.C., and Miranda, R.N. (2002). Expression of cyclin D1 in normal, metaplastic, hyperplastic endometrium and endometrioid carcinoma suggests a role in endometrial carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 126, 459-463.
- Saiz, A.D., Olvera, M., Rezk, S., Florentine, B.A., McCourty, A., and Brynes, R.K. (2002). Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 198, 157-162.
- Sajithlal, G.B., Hamed, H.A., Cruickshanks, N., Booth, L., Tavallai, S., Syed, J., Grant, S., Poklepovic, A., and Dent, P. (2013). Sorafenib/regorafenib and phosphatidylinositol 3 kinase/thymoma viral proto-oncogene inhibition interact to kill tumor cells. *Mol Pharmacol* 84, 562-571.
- Salvesen, H.B., MacDonald, N., Ryan, A., Jacobs, I.J., Lynch, E.D., Akslén, L.A., and Das, S. (2001). PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 91, 22-26.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T., and Ohta, Y. (1997). Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec* 248, 76-83.
- Sawai, C.M., Freund, J., Oh, P., Ndiaye-Lobry, D., Bretz, J.C., Strikoudis, A., Genesca, L., Trimarchi, T., Kelliher, M.A., Clark, M., *et al.* (2012). Therapeutic targeting of the cyclin D3:CDK4/6 complex in T cell leukemia. *Cancer Cell* 22, 452-465.
- Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J., Lam, E.W., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22, 7842-7852.
- Schmieder, R., Hoffmann, J., Becker, M., Bhargava, A., Müller, T., Kahmann, N., Ellinghaus, P., Adams, R., Rosenthal, A., Thierauch, K.H., *et al.* (2014). Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer. *Int J Cancer* 135, 1487-1496.
- Schneider, A., Zhang, Y., Guan, Y., Davis, L.S., and Breyer, M.D. (2003). Differential, inducible gene targeting in renal epithelia, vascular endothelium, and viscera of Mx1Cre mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F411-417.
- Shappell, S.B., Thomas, G.V., Roberts, R.L., Herbert, R., Ittmann, M.M., Rubin, M.A., Humphrey, P.A., Sundberg, J.P., Rozengurt, N., Barrios, R., *et al.* (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64, 2270-2305.
- Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24, 1967-2000.
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157-170.
- Sheppard, K.E., and McArthur, G.A. (2013). The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res* 19, 5320-5328.
- Sherr, C.J., Beach, D., and Shapiro, G.I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov* 6, 353-367.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A.A., Levin, S.D., Geng, Y., von Boehmer, H., *et al.* (2003).

Bibliografia

- Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4, 451-461.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., *et al.* (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384, 470-474.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Parker, S.B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S.Z., Bronson, R.T., Elledge, S.J., and Weinberg, R.A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-630.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67, 7-30.
- Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging* 11, 967-976.
- Slansky, J.E., Li, Y., Kaelin, W.G., and Farnham, P.J. (1993). A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 13, 1610-1618.
- Soh, E.Y., Duh, Q.Y., Sobhi, S.A., Young, D.M., Epstein, H.D., Wong, M.G., Garcia, Y.K., Min, Y.D., Grossman, R.F., Siperstein, A.E., *et al.* (1997). Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3741-3747.
- Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 283-296.
- Soria, J.C., Lee, H.Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L., and Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 8, 1178-1184.
- Sos, M.L., Koker, M., Weir, B.A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J.M., Weiss, J., Fischer, F., Frommolt, P., *et al.* (2009). PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 69, 3256-3261.
- Spring, K.J., Zhao, Z.Z., Karamatic, R., Walsh, M.D., Whitehall, V.L., Pike, T., Simms, L.A., Young, J., James, M., Montgomery, G.W., *et al.* (2006). High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology* 131, 1400-1407.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8, 317-325.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
- Stambolic, V., Tsao, M.S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W.B., and Mak, T.W. (2000). High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice. *Cancer Res* 60, 3605-3611.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., and Pützer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res* 30, 1859-1867.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., *et al.* (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.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3, 1071-1079.

- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 5, 401-409.
- Strumberg, D., and Schultheis, B. (2012). Regorafenib for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 21, 879-889.
- Sun, W., Lee, D.K., Lee, C.C., and Kim, K. (1996). Differential expression of D-type G1 cyclins during mouse development and liver regeneration in vivo. *Mol Reprod Dev* 43, 414-420.
- Sun, Z., Huang, C., He, J., Lamb, K.L., Kang, X., Gu, T., Shen, W.H., and Yin, Y. (2014). PTEN C-terminal deletion causes genomic instability and tumor development. *Cell Rep* 6, 844-854.
- Surucu, B., Bozagic, L., Hynx, D., Parcellier, A., and 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.
- 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., *et al.* (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8, 1169-1178.
- Suzuki, A., Nakano, T., Mak, T.W., and Sasaki, T. (2008). Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci* 99, 209-213.
- Suzuki, T., Yasui, W., Yokozaki, H., Naka, K., Ishikawa, T., and Tahara, E. (1999). Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* 81, 535-538.
- Tabernero, J., Lenz, H.J., Siena, S., Sobrero, A., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., *et al.* (2015). Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol* 16, 937-948.
- Tamguney, T., and Stokoe, D. (2007). New insights into PTEN. *J Cell Sci* 120, 4071-4079.
- Tan, Y.F., Li, F.X., Piao, Y.S., Sun, X.Y., and Wang, Y.L. (2003). Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrous cycle. *Reproduction* 126, 171-182.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* 24, 4546-4556.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., *et al.* (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15, 7-24.
- Tibarewal, P., Zilidis, G., Spinelli, L., Schurch, N., Maccario, H., Gray, A., Perera, N.M., Davidson, L., Barton, G.J., and Leslie, N.R. (2012). PTEN protein phosphatase activity correlates with control of gene expression and invasion, a tumor-suppressing phenotype, but not with AKT activity. *Sci Signal* 5, ra18.
- Tiozzo, C., Danopoulos, S., Lavarreda-Pearce, M., Baptista, S., Varimezova, R., Al Alam, D., Warburton, D., Virender, R., De Langhe, S., Di Cristofano, A., *et al.* (2012). Embryonic epithelial Pten deletion through Nkx2.1-cre leads to thyroid tumorigenesis in a strain-dependent manner. *Endocr Relat Cancer* 19, 111-122.
- Torres, J., and Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-

Bibliografia

- mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 993-998.
- Treuting, P.M., Dintzis, S.M., and Montine, K.S. (2017). *Comparative Anatomy and Histology. A mouse, rat and human atlas.*, 2^a edn.
- Trotman, L.C., Niki, M., Dotan, Z.A., Koutcher, J.A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A.S., Roy-Burman, P., Greenberg, N.M., Van Dyke, T., *et al.* (2003). Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* 1, E59.
- Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141-156.
- Tsai, J.J., Pan, P.J., and Hsu, F.T. (2017). Regorafenib induces extrinsic and intrinsic apoptosis through inhibition of ERK/NF- κ B activation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 37, 1036-1044.
- Tuchen, M., Wilisch-Neumann, A., Daniel, E.A., Baldauf, L., Pachow, D., Scholz, J., Angenstein, F., Stork, O., Kirches, E., and Mawrin, C. (2017). Receptor tyrosine kinase inhibition by regorafenib/sorafenib inhibits growth and invasion of meningioma cells. *Eur J Cancer* 73, 9-21.
- Tzani, I., Ivanov, I.P., Andreev, D.E., Dmitriev, R.I., Dean, K.A., Baranov, P.V., Atkins, J.F., and Loughran, G. (2016). Systematic analysis of the PTEN 5' leader identifies a major AUU initiated proteoform. *Open Biol* 6.
- Valkenburg, K.C., and Williams, B.O. (2011). Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer* 2011, 895238.
- Vasudevan, K.M., Gurumurthy, S., and Rangnekar, V.M. (2004). Suppression of PTEN expression by NF- κ B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 24, 1007-1021.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N., and Sellers, W.R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 276, 48627-48630.
- Venkatachalam, S., Shi, Y.P., Jones, S.N., Vogel, H., Bradley, A., Pinkel, D., and Donehower, L.A. (1998). Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J* 17, 4657-4667.
- Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., and de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 3, 1124-1128.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vorburger, S.A., Pataer, A., Yoshida, K., Liu, Y., Lu, X., Swisher, S.G., and Hunt, K.K. (2003). The mitochondrial apoptosis-inducing factor plays a role in E2F-1-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Ann Surg Oncol* 10, 314-322.
- Vélez-Cruz, R., and Johnson, D.G. (2017). The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. *Int J Mol Sci* 18.
- Wang, H., Douglas, W., Lia, M., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Podsypanina, K., Parsons, R., and Ellenson, L.H. (2002). DNA mismatch repair deficiency accelerates endometrial tumorigenesis in Pten heterozygous mice. *Am J Pathol* 160, 1481-1486.
- Wang, H., Karikomi, M., Naidu, S., Rajmohan, R., Caserta, E., Chen, H.Z., Rawahneh, M., Moffitt, J., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., *et al.* (2010). Allele-specific tumor spectrum in pten knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5142-5147.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., *et al.* (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209-221.

- Wang, X.T., Xie, Y.B., and Xiao, Q. (2011). Lentivirus-mediated RNA interference targeting E2F-1 inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth in vivo. *Exp Mol Med* 43, 638-645.
- Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J., and Baldassare, J.J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1), 61-68.
- Weng, L.P., Brown, J.L., and Eng, C. (2001). PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 10, 599-604.
- Whelan, J.T., Forbes, S.L., and Bertrand, F.E. (2007). CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* 6, 80-84.
- Whelan, J.T., Kellogg, A., Shewchuk, B.M., Hewan-Lowe, K., and Bertrand, F.E. (2009). Notch-1 signaling is lost in prostate adenocarcinoma and promotes PTEN gene expression. *J Cell Biochem* 107, 992-1001.
- Wiland, H.O., Shadrach, B., Allende, D., Carver, P., Goldblum, J.R., Liu, X., Patil, D.T., Rybicki, L.A., and Pai, R.K. (2014). Morphologic and molecular characterization of traditional serrated adenomas of the distal colon and rectum. *Am J Surg Pathol* 38, 1290-1297.
- Wilhelm, S.M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C.A., Schütz, G., Thierauch, K.H., and Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 129, 245-255.
- Wise, H.M., Hermida, M.A., and Leslie, N.R. (2017). Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin Sci (Lond)* 131, 197-210.
- Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2014). PTEN. *Annu Rev Biochem* 83, 641-669.
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E., and 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.
- Xanthoulis, A., Kotsinas, A., Tiniakos, D., Fiska, A., Tentes, A.A., Kyroudi, A., Kittas, C., and Gorgoulis, V. (2014). The relationship between E2F family members and tumor growth in colorectal adenocarcinomas: A comparative immunohistochemical study of 100 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22, 471-477.
- Xanthoulis, A., and Tiniakos, D.G. (2013). E2F transcription factors and digestive system malignancies: how much do we know? *World J Gastroenterol* 19, 3189-3198.
- Xia, D., Srinivas, H., Ahn, Y.H., Sethi, G., Sheng, X., Yung, W.K., Xia, Q., Chiao, P.J., Kim, H., Brown, P.H., *et al.* (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J Biol Chem* 282, 3507-3519.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9, 405-414.
- Xiao, Q., Li, L., Xie, Y., Tan, N., Wang, C., Xu, J., Xia, K., Gardner, K., and Li, Q.Q. (2007). Transcription factor E2F-1 is upregulated in human gastric cancer tissues and its overexpression suppresses gastric tumor cell proliferation. *Cell Oncol* 29, 335-349.
- Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G., and Wu, M. (2006). Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res* 34, 2046-2055.
- Xing, X., Cai, W., Shi, H., Wang, Y., Li, M., Jiao, J., and Chen, M. (2013). The prognostic value

Bibliografia

- of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* *108*, 2542-2548.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* *14*, 8420-8431.
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B.O., Dyson, N.J., Harlow, E., and Jacks, T. (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet* *18*, 360-364.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* *85*, 537-548.
- Yan, M., Parker, B.A., Schwab, R., and Kurzrock, R. (2014). HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat Rev* *40*, 770-780.
- Yang, G., Haiyan, F., Xiaozhao, L., Jin, L., Zhang, J., Yao, L., and Lu, Z. (2009). E2F1: A colon cancer specific putative tumor suppressor and a valuable therapeutic target (Bioscience Hypotheses), pp. 2 (5), 313-315.
- Yazdani, Y., Farazmandfar, T., Azadeh, H., and 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*, 9.
- Yeager, N., Klein-Szanto, A., Kimura, S., and Di Cristofano, A. (2007). Pten loss in the mouse thyroid causes goiter and follicular adenomas: insights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis. *Cancer Res* *67*, 959-966.
- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* *441*, 475-482.
- Yu, Q., Geng, Y., and Sicinski, P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* *411*, 1017-1021.
- Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G., *et al.* (2004). Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* *203*, 744-753.
- Zhang, F., Zhang, Y., Zhao, W., Deng, K., Wang, Z., Yang, C., Ma, L., Openkova, M.S., Hou, Y., and Li, K. (2017a). Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. *Oncotarget*.
- 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., *et al.* (2011). Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* *17*, 461-469.
- Zhang, W.J., Li, Y., Wei, M.N., Chen, Y., Qiu, J.G., Jiang, Q.W., Yang, Y., Zheng, D.W., Qin, W.M., Huang, J.R., *et al.* (2017b). Synergistic antitumor activity of regorafenib and lapatinib in preclinical models of human colorectal cancer. *Cancer Lett* *386*, 100-109.
- Zhang, X.C., Piccini, A., Myers, M.P., Van Aelst, L., and Tonks, N.K. (2012). Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN. *Biochem J* *444*, 457-464.
- Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* *24*, 7238-7247.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* *3*, 245-252.

Zhou, X.P., Loukola, A., Salovaara, R., Nystrom-Lahti, M., Peltomäki, P., de la Chapelle, A., Aaltonen, L.A., and Eng, C. (2002). PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* *161*, 439-447.

Zhu, X., Kwon, C.H., Schlosshauer, P.W., Ellenson, L.H., and Baker, S.J. (2001). PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* *61*, 4569-4575.

ANNEX

Publicacions

- ***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.

- ***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.

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

Mirantes C*, **Dosil MA***, Eritja N, Felip I, Gatus S, Santacana M, Matias-Guiu X, Dolcet X. Eur J Cancer. 2016 Aug;63:74-87. doi: 10.1016/j.ejca.2016.04.019. Epub 2016 Jun 9. *Aquests autors han contribuït per igual al treball.

- ***Biological Effects of Temozolimumus on the mTOR Pathway in Endometrial Carcinoma: A Pharmacodynamic Phase II Study.***

Santacana M, Coronado P, Matias-Guiu X, Romero I, Casado A, Gil-Moreno A, **Dosil MA**, Mota A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Llombart-Cussac A, Poveda A. Int J Gynecol Cancer. 2016 Jun 2. [Epub ahead of print]

- ***Deletion of Pten in CD45-expressing cells leads to development of T-cell lymphoblastic lymphoma but not myeloid malignancies.***

Mirantes C, **Dosil MA**, Hills D, Yang J, Eritja N, Santacana M, Gatus S, Vilardell F, Medvinsky A, Matias-Guiu X, Dolcet X. Blood. 2016 Apr 14;127(15):1907-11. doi: 10.1182/blood-2015-09-669036. Epub 2016 Jan 14.

Annex

- ***Combinatorial therapy using dovitinib and ICI182.780 (fulvestrant) blocks tumoral activity of endometrial cancer cells.***

Eritja N, Domingo M, **Dosil MA**, Mirantes C, Santacana M, Valls J, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Dolcet X. Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):776-87. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0794. Epub 2014 Jan 21.

- ***Long-term estradiol exposure is a direct mitogen for insulin/EGF-primed endometrial cells and drives PTEN loss-induced hyperplastic growth.***

Eritja N, Mirantes C, Llobet D, Yeramian A, Bergadà L, **Dosil MA**, Domingo M, Matias-Guiu X, Dolcet X. Am J Pathol. 2013 Jul;183(1):277-87. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.03.008. Epub 2013 May 10.

- ***An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias.***

Mirantes C, Eritja N, **Dosil MA**, Santacana M, Pallares J, Gatius S, Bergadà L, Maiques O, Matias-Guiu X, Dolcet X. Dis Model Mech. 2013 May;6(3):710-20. doi: 10.1242/dmm.011445. Epub 2013 Feb 8.

