



Universitat de Lleida

## Estudio del papel de ARID1A en el desarrollo, progresión y microambiente tumoral del càncer de endometrio

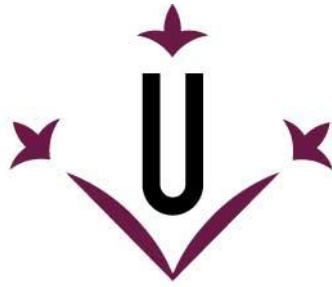
Cristina Megino Luque

<http://hdl.handle.net/10803/687529>

**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**

**Estudio del papel de ARID1A en el desarrollo,  
progresión y microambiente tumoral del  
cáncer de endometrio.**

Cristina Megino Luque

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

Programa de Doctorado en Salud

Director/a

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia

Dra. Núria Eritja Sánchez

Tutor/a

Dra. Núria Eritja Sánchez

2022



*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

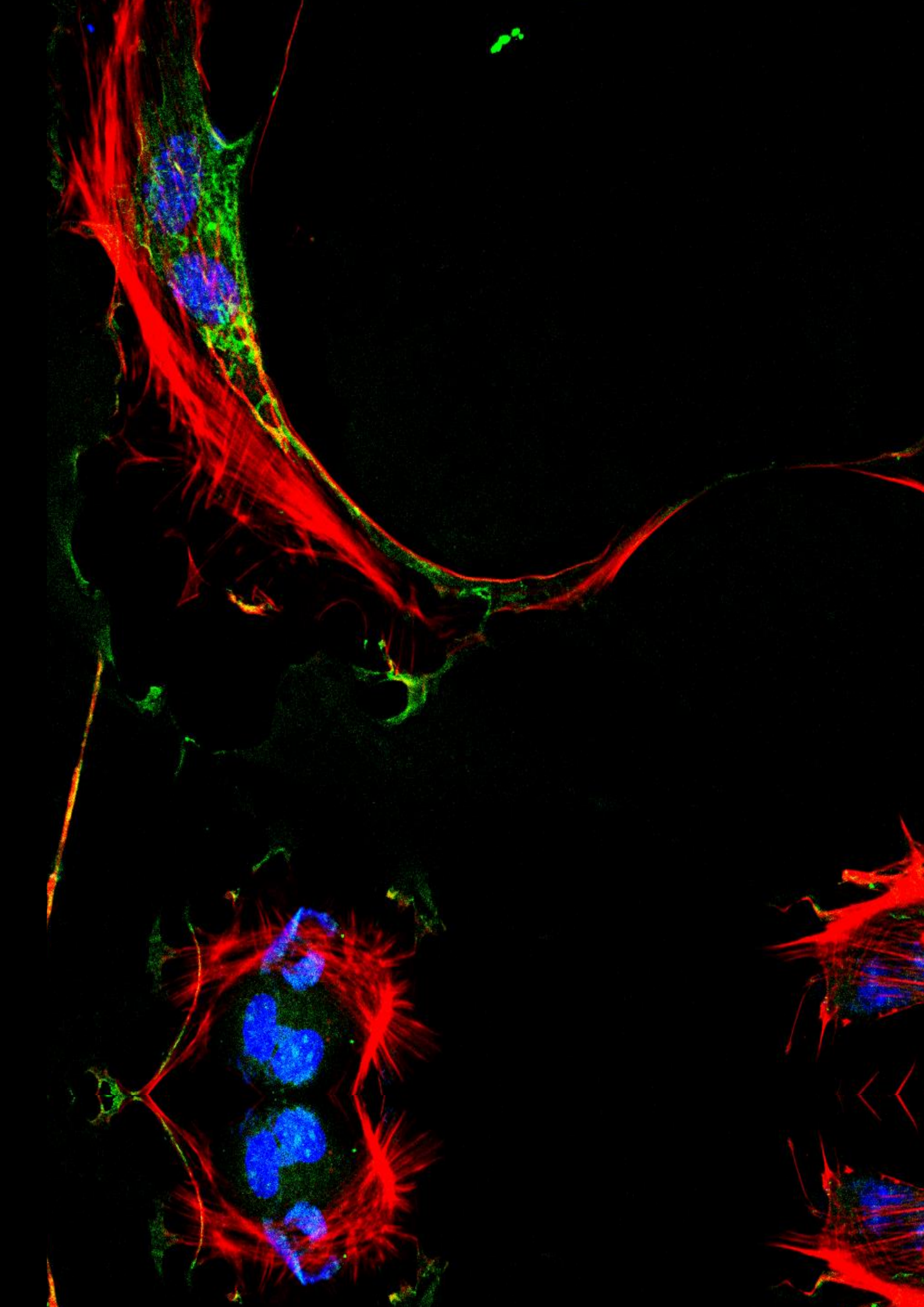
**Albert Einstein**

A mi familia

A mis amigos

Por siempre estar ahí





# AGRADECIMIENTOS

*“Tiene todos los síntomas de estar muerto  
menos el color, todavía hay esperanzas”*

**Núria Eritja**



Aun no me lo creo, pero por fin tras miles, miles y miles de western blots y horas en el estabulario, en cultivos y en el confocal...aquí esta, ya acabada 😊😊 . Aunque seguramente aun ande haciendo un western o una RT de última hora, ¡no nos vamos a engañar! Como siempre digo, cualquier hora es buena para hacer un buen western blot Jijijijiji. Me parece que fue el otro día cuando me decidí por venir a Lleida a hacer la tesis, tras hacerme la dura con la NES durante un tiempo jiji (pero eso sí, aunque tardé, no puedes tener queja alguna eh, he trabajado cual negro (sin querer ofender a ningún negro vaya)). Pues eso, que, aunque me parezca ayer, ¡ya hace como millones de años que acabé cayendo en PATONC! (Aida Bea tendría solo dos siglos y todo), y aun sigo dando gracias a dios por haber acabado en la segunda planta (sin duda la mejor), pero vamos sobre todo en PATONC, ¡que es donde se maneja el cotarro, no nos vamos a engañar! Así que bueno al lío que como llevo mil años ya, tengo a muchísimas personas que agradecer. Me daba mucho palo escribir todos los agradecimientos, sobre todo después del tocho de tesis que me he marcado (espero que por lo menos la que la tenéis os sirva bien de pisapapeles), pero como decía mi abuela es de bien nacido ser agradecido, así que allá vamos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universitat de Lleida, al IRB y a la AGAUR, por permitirme que pudiera realizar esta tesis y así darme cuenta de que me quiero seguir dedicando al mundo científico (¡aunque entonces no se si agradecer es la palabra adecuada jajaja, porque vaya lo que me espera!)

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a las dos personas que me dieron la oportunidad de hacer esta tesis en PATONC, a mis dos directores de tesis. El Dr. Xavier Matias-Guiu, por dejarme formar parte de este gran equipo. Pero también, porque a pesar de casi haber podido coincidir tanto, aun así siempre escuchar mis presentaciones interminables de resultados, darme buenas ideas, todos los diagnósticos, corregirme términos que empleaba mal (como que en el endometrio no son fibroblastos, ¡si no células estromales!) y sobre todo dejarnos probar con muestras humanas ¡¡ y hacer que el final de la tesis quede redondo!!

Y por supuesto a la Dra Nuria Eritja SÁNCHEZ, que fue la que me eligió directamente para que fuese su **primera** predoc, pese a que como he dicho al principio no estaba convencida y le tocó insistirme (bastante) ¡¡¡pero menos mal que me engatusaste, porque al final parece que la investigación en academia va a ser lo mío!!! Cuando llegué, al principio te pillé en una época dura y ocupada, cuando de repente te dieron miles y miles y miiiiiles de créditos de clases (no sabía que una carrera podía tener tantos créditos), ¡encima en Igualada, que está en Cuenca jijiji!, y no tenías tiempo ni para respirar. Pero aun así, entre crédito y crédito, siempre has estado ahí para ayudarme con cualquier duda que tuviese (el ya clásico niñaaa no puedo venir, pero estoy siempre pendiente del móvil ¡eh!). Pasado el primer año, tu agenda la verdad que no mejoró mucho, ¡más bien empeoró! Llego la pandemia, te dieron la coordinación y con ella miles y miles de problemas, por no hablar de los miles de alumnos pesados (**TIP** para cualquiera que lea esto, que no os engañen para coordinar nada ¡es un TIMO!). Pero, aun así, siempre estabas pegada al teléfono y al mail por si te necesitaba, de hecho, y aún no sé ni como, pero ese caótico año conseguimos hasta publicar la review y el artículo (que tanto me han ayudado). Y cuando parecía que ya controlabas la coordinación, los créditos y que todo tu estrés estaba bajo control... para acabar de poner la guinda al pastel de tu agenda, se sumó el BOMBO, también llamado Emma. Pero, aun así, y menos mal por los demás, hiciste una baja falsa de maternidad

y seguiste estando ahí cuando te necesitaba (¡no conozco a nadie que conteste más rápido al WhatsApp y al correo que tú!). Así que muchas gracias por todo, por tu apoyo, por tu comprensión, por preocuparte por mí, por tus consejos (científicos y personales), por todos los momentos puñales graciosos que nos regalas (porque sí, no soy yo la única villana), por contratar a NAT durante un maravilloso tiempo y por miles de cosas más, pero sobre todo (aviso se vine moñada) por confiar en mí y en todo lo que te proponía, por dejarme tanta libertad a la hora de pensar dejándome hacer toooooodos los experimentos que se me han ocurrido, confiando en mi criterio. Así que, de veras, gracias porque has ayudado a que haya desarrollado un poco de criterio y visión científica, y a que me guste tanto la ciencia, y probar y aprender cosas nuevas! Además de enseñarme que hay que confiar hasta el final, porque como un grandioso día dijiste (y que perdurará en la memoria de todo patonc): Este ratón tiene todos los síntomas de estar muerto, menos el color... ¡así que quedan esperanzas!, enseñándonos que no hay que rendirse aunque parezca que todo está perdido 😞. Bueno, y aun todo esto, lo que más voy a echar de menos de ti, sin duda es que eres y serás la única jefa el mundo que me **OBLIGA** a hacer vacaciones, ¡eso sí que no lo voy a volver a tener seguro! ¡**GRACIAS!** ... y bueno podría seguir un rato más, pero esta tesis ya tiene demasiadas paginas como para aumentarla x10 con los agradecimientos y ya te he hecho leer demasiadas páginas y varias veces con esta dichosa tesis, así que MIL GRACIAS POR TODO JEFA, siempre tuya, tu esclava, y recuérdalo siempre.... Corroboramos, ¡**ESPERO MUY IMPACIENTEMENTE TU RESPUESTA!**

Bueno, y pasado el momento agradecimientos serios y protocolarios viene lo bueno, me daba un poco de pereza, pero cuando me di cuenta que no tenía censuras y podía hacer las villanadas que quisiera, me vinieron unas ganas inmensas de escribirlos jijjjijijiji Porque si, con la escritura he tenido que disminuir el número de villanadas, pero lo siento, he acabado de escribir y he vuelto más fuerte que nunca y con ganas acumuladas. Así que lo siento por los que les toque aguantarlas estos meses que me quedan pululando por el IRB y pido perdón a todos los afectados que serán muchos, seguro (por ahora todo el grupo de calvos de patonc) jijijiji. Así que no esperéis moñadas ninguna eso ya os lo diré borracha en la celebración, mientras os ahorco abrazándoos (como bien sabéis que me gusta hacer), esto es para lo importante.....así que vamos al lio que tengo a mucha gente que repartir, quiero decir AGRADECER, AGRADECER.

Primero de todo, voy a empezar por las viejas glorias de IRB por dos motivos: uno porque no se me olviden (porque hay algunos que llevan como siglos ya fuera del IRB, como mi amigo Dr Navaridas), y dos porque hay algunos que cualquier momento puede ser su último momento, así que cuanto antes lo lean mejor, por si no llegan al final (Si Gárgola A.Bea va por ti 😊).

Primero, quería agradecer, aunque ya ha pasado mucho tiempo, a MariAlba. Cuando llegué, aparte de acogerme genial, me dio en herencia antes de irse dos de las cosas más importantes en mi tesis: uno es el sitio del escritorio donde he pasado tanto tiempo de penas y alegrías durante la tesis, y dos, y millones de veces más importante, ¡¡las pinzas y tijeras de diseccionar!! GRACIAS porque me han salvado la vida y las he cuidado como a nadie (no me imagino sacando úteros y separando epiteliales y estromales con las pinzas del chino de NES). Así que Lolito, ahora que te daré yo a ti en herencia tanto ese sitio como las tijeras, ¡¡espero que las cuides y que te sirvan taaaanto como me han servido a mí!! Gracias también a Isidre, por todos los momentos que regalaba siendo el galán de la segunda, el truan del IRB, jajajaja. Ha sido un placer tenerte en el lab, has sido un blanco muy fácil de bromas ¡y que se lo pongan a una tan fácil da gusto la

verdad! Aunque sobre todo gracias por enseñarme al principio de llegar aquí a hacer la técnica que más he hecho durante la tesis, el WB (el que te tiene que odiar por enseñarme es mi amigo del chemidoc JTorres). Aun sigo y seguiré (en tu honor) haciéndolo como los zurdos. Gracias a Carlita, que fuiste como una hermana mayor cuando llegué, por todo lo que me enseñaste incluido a charrar mallorquin y gritar ¡mangarrufes! Por las frases célebres recordadas de vez en cuando a día de hoy como: Bastaaa Isidreeee o ¡has de revelaaaa! (póngase el tono mallorqui), pero sobre todo mil gracias por dar el paso revolucionario que nos ha facilitado la vida a todos: ¡atreverte a traer los anticuerpos secundarios al congelador de PATON! ¡Fue un pequeño paso para los predocs, pero un gran paso para la humanidad! Gracias a la Giset, también por todas las risas... aunque más que gracias, DE NADA por ser Raúl y yo tus psicólogos todas las tardes, aún sigue el altar anti gafismo que te montamos ¡por si lo necesitas algún día! Ah ah y gracias por el curso de pelota vaska ...fue lo más ¡GORA EUSKADI Giset! Gracias a mi legendaria gárgola dinoyaya y taxista favorita, la Sra Aida Bea (siempre con respeto hacia las personas de su edad), que, aunque al principio cuando yo era un bebe de tfg, ni me mirabas a la cara, al final acabaste siendo mi compañera infinita de cultivos, de gim y petro pump y mi taxista de confianza, así que gracias por todo, pero en especial ¡¡¡gracias por ser hija de tu padre y tener medio Alpicat y llevarnos a tantas bbq!!! (nos han salvado en la pandemia) Bueno y por las telenovelas turcas que tenías por vida y me retransmitías en directo, daban vidilla a la cuarentenaj! Eres tan grande como persona, como de vieja, ¡y eso es difícil! Y seguiría metiéndome contigo hasta que se me desgastasen los dedos, ya lo sabes bien, pero aún me queda mucha gente y me gusta más decirte estas cositas en persona, para que me contestes con el típico ¡que idiota! Así que como me sigues a EEUU, pero a la otra punta....siempre nos quedara Virginia del Sur como punto de encuentro 😊 ....como no, hablando de viejas glorias no me puedo quedar sin agradecer al gran Dr Canescencia, el grande de Charly! Y vamos no me puedo quedar sin agradecerle, porque estoy segura que me eliminaría de todos los lados y me bloquearía para siempre si no lo hago jajajaja. Así que como tú nos dijiste a Raúl y a mí en tus emotiviiiiiiiiiiiiisimos agradecimientos que nos tuvieron llorando una semana (nótese la ironía, porque eran emotivos para todo el mundo, menos para nosotros dos), gracias porque nunca hemos despreciado a nadie con tanto cariño como a ti. No, ahora en serio, gracias por las charlas de tardes infinitas y los consejos, por los millones de risas y fiestas infinitas (gracias por descubrirnos el camping Ezcaba y los tequifresis), por seguir dándome chapas y escuchando las mías (aunque sean ciberchapas) y gracias por animarme siempre a hacer el postdoc y seguir en la ciencia como tú. Has sido un gran apoyo en eso, y espero egoístamente que aun tardes un tiempo en irte de EEUU y podamos coincidir y seguir generando buenas anécdotas de contenido lamentable como siempre...porque, pese a ser un amigo pésimo, ¡te quiero hermano!

Gracias a todas las nuevas incorporaciones (bueno ya no tan nuevas) de la segunda, por animar todos los días la segunda y seguidme el cotarro. Gracias al nuevo Charly conocido como C.ANAL, el pitutoooooo por excelencia, siempre alegrando las mañanas con tus bromas y tus pezones, tu acento de panchito hace reír a cualquiera (ándale Carlos andaleeee). Además, tener siempre a un compatriota de Castilla (aunque en el fondo seas un panchi ilegal y de la Mancha), siempre me ayuda a sentirme más como en casa. Entre tú, la Isu y Celia Casas, es como estar en plena Castilla, un día tenemos que hacer quedada a hablar de cosas de castellanos. Solo pido que antes de irme de aquí acabes lactando y me grabes un audio en venezolano para el recuerdo. Te dejo en herencia, dar a Lolito todos los consejos que no me ha dado tiempo a darle, solo tú puedes

hacerlo. Gracias a la Gisel (la "jaisel"), salsita, G.Javier Vazquez, por todas las tardes de cafés con invitados especiales, por todos las noches que hemos pasado sin separarnos de la barra mano a mano mientras obligabas a los camareros a invitarnos a tequifresis, por todas las tardes que nos absorbes y secuestras en tu laboratorio de chachara. Desde que no estas, ya no tenemos tertulias de criticar a todo quisqui, y el salseo ha disminuido en picado. ¡Necesito que vuelvas para que me ayudes a inventar historias! Eso sí, no te voy a engañar, me ha venido genial que estas tardes que tengo que escribir a tope, Raúl y tu no estéis... porque sois unas marujas ¡y no me dejáis trabajar! Se que justo te has ido de estancia, para no ver mi tesis infinita y eterna (como Aida Bea), además de por lo del embarazo, para que no se te note (sí Mario, si estas leyendo esto, ya lo sabes, Gisela esta embarazada y se ha ido a dar a luz a EEUU), y te odio por ello, pero espero que volvamos a coincidir pronto porque ¡se te quiere! Gracias a la Olomi, que pese al poco tiempo que lleva aquí, es la única que ha conseguido que no la acaben llamando por el mote que le puse, porque fue empezar a llamarla la pelos de loca y se cortó radicalmente el pelo al día siguiente, ¡eso sí que es cortar por lo sano! Además, es la única que ha sobrevivido en tiempo, sin que Gisela la eche del lab, ¡eres una superviviente! Gracias por alegrarme las mañanas regalándome esos sustos cuando te saludo, ¡da gusto empezar así el día! Gracias a la loca del coño de Lia, por alegrarnos con sus historias de palomas, de monjas, de brujas ...de cualquier cosa, vamos que no me sorprende ya nada de ti. Lo mismo te llama vieja una mañana, que te vende unas bragas a la siguiente... ¡toda una caja de sorpresas esta paya! Estate atenta porque recibirás como te prometí correspondencia desde EEUU, y espero q me cures los empachos ¡y no volver a tomar manzanilla jamás! Gracias también a AnnAVISIA, que pese a gastarle la maldita broma día si día, también sigue sin haberme pegado. Gracias por las charlas de cultivos, los cotilleos y clases entre risas y chismorreos del EKKE, y por supuesto por la gran edición de videos que haces, ¡tienes futuro! Espero que superes algún día el duro golpe del informático, y el embarazo no deseado, ¡ANIMO! En general, GRACIAS A TODA LA SEGUNDA, por aguantar mis gritos y villanadas diarias sin haberme denunciado a recursos humanos, ¡Al menos que yo sepa!

Pero si agradezco a la segunda, por supuesto, y sin menospreciar a nadie, gracias al mejor lab del IRB sin lugar a dudas ¡**PATONC**! También conocido en ciertas épocas como putonc, y no daré explicaciones de porqué. Gracias a Marta Hereu, por todos los millones y millones de buffers, compras...vamos por hacer los millones de cosas que te apunto todos los días. Pero sobre todo por aguantar lo que aguantas en el lab, porque ojito la de guerra que te damos...aunque no engañas ya a nadie eh, te lo pasas bien, ¡en el fondo estas en tu salsa! Espero que jamás quites las tetas de tu mesa ¡en honor a mi memoria! Gracias además a todos los grandes técnicos que han pasado por patonc (y en especial a María la Rusa, con su alegría por las maxiguarris y su libretita de notas) que han ayudado tanto y dejado huella en patonc. Miles de gracias a la Macius, Anita dinamita, la melanoma madre, gracias por ser así de sincera y contar toda la verdad sobre el parto, gracias por seguir cayendo en la misma broma día sí, día también, eres muy agradecida para las bromas ¡y así da gusto! Gracias por ser una detallista y seguir siendo la única que viene toooooodos los días a decir adiós al lab y bueno gracias por todo, no me voy a explayar mucho más porque ya te lo dije todo en la tesis de Raúl, y los borrachos dicen la verdad y solamente la verdad (de las pocas verdades que te abre contado en este tiempo). Gracias a Inés, aparte de por tooooooodo lo de Granada (que, qué te voy a decir que no te haya dicho ya), por toooodas las mañanas hacerme de psicóloga cuando estamos a primera hora solas, por ser



una persona con la que se puede hablar (ya tú sabes), por enseñarme el grandioso Qupath y por reírte siempre con mis bromas hasta cuando te hablo del tejido conectivo, eres la primera persona que le hace tanta gracia un fibroblasto jajajaja aunque más que yo darte las gracias, me la deberías dar tu a mí que te saque del armario, te di una novia y un trabajo así que DE NADA Inés, ¡DE NADA! Jajaja ya me iras diciendo que atuendo me tengo que poner para ser la dama de honor de tu boda. Gracias al feto fetamen más asqueroso y encima putero que ha pisado el IRB, POLITO, POLLET, el rubio cenizo más falso del IRB, dice Carlos que le despreciaba a él... tenía que ver las bonitas palabras que nos dedicamos día a día (¡digamos que sabemos cómo mantener viva la llama de nuestra amistad!) incluso hemos llegado a las manos, aunque el día q saque la mano a pasear de verdad...vas a flipar asqueroso! Nunca había conocido a alguien que le sobran tantos cromosomas y le faltara tanto pelo. Aunque gracias, porque pese al asco que das, siempre serás como mi hermano pequeño del lab, al que me gusta maltratar y con el que me desahogo todas las tardes, compañero de villanadas haya donde los haya... aún nos queda hacer LA VILLANADA FINAL, así que solo dos cosas, a ver si aprendes a sacar un fibro de una maldita vez (pedazo de manos de árbol) y recuerda SIEMPRE y no lo olvides jamás, pese a que te creas que eres un machito de BLG, lo único que eres es UN FETO ASQUEROSO ¡TQM hermano! Tienes una amiga y casa en PDT y NY para toa la vida. Y como no, agradecer al otro machito de BLG, mi fiel pollito hermano pequeño y heredero de mis experimentos y colonias, el más body builder, LOLITO, Manuelito o Manuel (para cuando me la lía y me tengo que poner seria con él). Pese a que seas un bebe que no conoce ni a la grande de Chenoa, que eres un cagón (que nos arruinó la Boite el último cumpleaños de Raúl, jamás te lo perdonaremos), que me hiciste irme de las charangas en San Fermín para ir a dormir casi a las 12 de la noche, que tengas síndrome de déficit de atención y seas sordo... eres un GRANDE, que siempre está ahí para todo, para enseñarme videos mierda y música muy variada, para matar isofactamente cualquier vida que te mande y cazar los ratones que se me escapan, vamos que siempre estas para todo lo que te pida (menos para aguantar de fiesta más que yo)... porque sí, hemos pasado juntos poco tiempo, aunque poco pero loco así que se te quiere lolum (L), y viendo cómo te sale ya la Cre... no tengo pruebas, pero tampoco dudas, que dejo a mis ratoncitos y células en buenas manos! ¡Así que ya sabes en PDT tienes una amiga pa lo q quieras! Porque los dos sabemos que va a caer el típico: sí sí todo claro, pero Cris solo una cosita...que cada vez que escucho, me hace temblar jajajaja. ¡Espero que sepas emplear bien el poder de los WB que te he transferido y que no se te vuelva a olvidar lo que significa confluencia! A ver si en mi tesis te transfiero el poder de aguantar más que la cenicienta y no irte a dormir corriendo a las 00:00 😊 ¡A mazar esos bíceps, que algún día los podrás tener la mitad de fuertes que yo, sino pregúntale a tu prima! (PD: no hagas caso a nada de lo que te diga Carlos xfa, era mentira lo que le he escrito a él). Y gracias a la IZAS, porque ni GREBIC ni GREBOC ¡tú eres y serás PUTONC! Solamente un verdadero patonc como tú vendría todas las mañanas llueva o nieve a saludar y chismorrear un poco a primera hora, alegrándonos el día. La Pocahontas postdoc más villana del IRB, encima de las de verdad, ¡de las que no se le nota! Mi mayor ejemplo de madre a seguir, capaz de decirle a su hijo que se calle de una vez jajajaja ¡La única que diariamente es capaz de beber leche de coco y lo sobrelleva así de bien! solo hay una palabra para ti GRANDE! Siempre te recordaré por ser mi maestra de manejo animal (y la de la Piñol), la que me enseñó a sacar hasta la última gota de un ratón directamente desde el corazón, y por supuesto la que me enseñó el mejor insulto del mundo...esa chica es de mango bajito ¡la mejor VASCA VENEZOLANA del mundo!





aunque pequeña de tamaño, una grande como persona, con su cara de buena y su espíritu de satán. Gracias por siempre seguir mis mentiras, dándoles un poco de credibilidad, sin tu apoyo no saldrían adelante la mitad de las villanadas. Gracias por apuntarte a cualquier plan que se te ponga por delante, hasta a una buena rave de Alguaire, y por ser una borracha tan divertida. El pequeño gremlin del alcohol, que como una sirenita de H<sub>2</sub>O, en cuanto toca una gotita de EtOH ¡se transforma a la Mery ravera! No cambies, ¡porque eres una crack! TQ. Gracias a la Mery 2, también conocida por algunos como la PERRAMON. Un fichaje de los buenos, lo único malo que tienes es que has venido muy tarde, y aun así has dejado huella, una villana de puta madre como tú siempre viene bien, ¡que habría hecho sin ti en san Fermín! Me va a dar pena que no coincidamos al final en estos últimos meses, hubiésemos hecho grandes cosas teniéndonos enfrente. Cuidame mucho a la Mery 1, y que la Mery 1 te cuide mucho a ti, ¡sois lo más!

Aunque no de PCM pero si de ese lab, agradecer a Leila porque es una salá y además de siempre estar alegre siempre te saca unas risas y te alegra la mañana coincidir con ella, a Sara porque siempre que vamos dando el cante a PCM nos recibe como si fuésemos personas normales con una sonrisa, y fingiendo no tener miedo (Además de por ser la referente en formatos tesis, PD para futuros predocs si tenéis dudas sobre el formato tesis id a hablar con ella!) y a la Coralingea, una grande donde las haya pese a que siempre finja una excusa para no salir conmigo en bici (sé que no te atreves, no pasa nada) y se chive en el estabulario de todos mis robos (me lo confeso Iván), siempre te recibe con una sonrisa de oreja a oreja, se ríe de absolutamente cualquier broma que le gastes y te enseña tan contenta sus resultados que parecen estampados de carpetas! Además, pese a su sonrisa angelical es una ravera fan de Dj Pastis, ¡una caja infinita de sorpresas! Gracias también a Marta Corral, una de las Martis, por aguantarme siempre que paso por su despacho y te toco las narices (vamos siempre que paso por ese pasillo), y por todas las risas con chichi y sus clases, me encanta hacer clases contigo como si fuésemos señoras de 80, eres la compañera de gim que toda persona necesita ¡ahora necesito ya amigas de vuestra edad para hacer estas cosas!

Y continuando hacia arriba, como no gracias a las gentes de FPM/metabo. Gracias a la Meli, porque todo lo que tiene de microbio, lo tiene de maja, ¡cómo puede haber tanta majura en una cosita tan pequeña! ¡Fiel compañera de pegasos, ravera y conductora de confianza! (Después de Grecia, no tengo duda que eres la mejor conductora del mundo). Como bien dice Lara...¡VAMOOOS MELI! Porque eres una crack y el pub/garaje Meli, siempre será un pub de confianza que nos ha regalado momentazos que siempre recordaremos como la gran redada policial! Gracias a la roñosa de Anna F, por todas las risas cuando subo por la tercera a revelar y os encuentro pululando por ahí, por todos los paseos y fiestas de la Guingueta, por enseñarnos a esquiar y por hacer que el feto de Pol no se matara y desfigurara aún más la cara (¡a ver como aguantaba yo eso en el lab!), pero sobre todo gracias por andar a ritmo de persona normal en la montaña (pese a que casi nos costara el divorcio con el resto de amigas con minipatas). Siempre te recordare por tu pelo sucio y tu impresionante habilidad para no parar de beber vino blanco, pero sobretodo no para de comer y comer y recomer (la única persona que es capaz de comerse una vaca entera como aperitivo y preguntar que cuando llega el primero) ...si se acaba el chollo con estudiar lo del cáncer, me dedicaré a estudiar el agujero negro que tienes ahí dentro. Y como no, y aunque ya no es FPM, ahora es una prestigiosa profesora con contrato estable y horario definido, la DRA NOGUERA. La Larindonga, amante de los pockeballs (más que del telepi de los jueves), Dj de cultivos, fiel predicadora del mitiquísimo ¡¡PEEEERO

BUEEEEEEEEEENOOOOOOOOOO!! Y el usar de telescopio los rollos de papel. Nunca olvidare tus caídas por culpa de las calas, y como te escondías de hacer las flexiones detrás del step. La única persona que veo más en el gimnasio solo de paso para ducharse que en clase (porque veo más a tu doble que a ti). Siempre es y será un gustazo compartir borracheras contigo, charlar de política y darle caña los machistas de Pol y Raúl. ¡No cambies nunca y cuídame a Josep!. Y antes de acabar con FPM, no dejarme sin mencionar de FMP al Pascu, porque a pesar de que siempre me intente gafar los WB siempre me salen con Calidad Pascual, ¡suerte por Oxford!

Y ya que estamos por la tercera y hablando de WB, agradecer a todos mis amigos de ciclo con los que mantengo un amor/odio por los horarios de Chemidoc, sobretodo con Jorge. Gracias a Neus y a Marta por todos los ratitos (a Neus no tanto que tenía la mano muy larga cuando estuvo en patonc y nos robó muchas cosas), pero sobre todo ¡Gracias a Rogelito! Que día a día siempre me deja una notita en el Chemidoc y viene a verme mientras revelo para contarnos en esa pequeña salita nuestros grandes fracasos, ¡te echare de menos!

De la tercera, aunque del otro bando, también agradecer a MeryCrown y a Marta por, además de ser tan majas, borrachas y buenas muchachas, y echarnos unas buenas risas siempre que coincidimos, ¡cuidarme a la Pitbull todos los días! Con lo que trabajo no tengo tiempo de pasearla.

Gracias a la Madre de Zapa por la pensión mensual, de ya 10 años, por aguantar a Andrea. Porque si ZUPI ZAP, Andrea ZAPATOS, mi fiel pitbull, ahora te toca a ti. Son ya 10 años de convivencia mano a mano, pasando por habitaciones individuales durmiendo en sofás, conviviendo con biotecs, médicos, veterinarios, en Granada, en Lleida, ¡vamos que me has seguido hasta a mear! Pero jamás te confesaré a donde me voy a hacer el postdoc, ¡Ya está bien! No es por ti es por mi...sí, se que no se hace, pero te estoy dejando por escrito en los agradecimientos de una tesis, pero es que ¡ya no sé cómo hacerlo! ¡Y esto es insostenible! Sabes que en el fondo, te voy a echar de menos, el roce hace el cariño que le vamos a hacer ¡ 😊 Ah si por supuesto, gracias a Jon por hacer que esta separación sea posible, sin él no hubiese sucedido nunca!

Y pasamos a la cuarta, donde quiero agradecer desde a grande grandísimas crackisimas como Elena Briti, pese a que ya no esté, con su risa de delfín a todas horas y su horrible castellano C1, siempre te sacaba unas risas, ¡no te olvidaremos! Hasta nuevas buenas incorporaciones como las Marías, que, aunque más tímidas siempre muy majas ellas. Gracias a Arabela, por aguantarme desde la carrera con una sonrisa siempre. Gracias también a Alba Sansa, por aguantarme siempre que subo a gritar a tu lab con una sonrisa. Pero si alguien tengo que darle las gracias de ese lab, es la la Martuki, la Medins, la chica más sonriente de IRB, la más mejor compañera de gim, la que me enganchó al chichi skill (sí, gracias también a Richi por todas las risas que nos ha patrocinado tras duros días de explotación y desgracias en el lab), la persona de la cuarta que más me gusta picar y vacilar (y viceversa, no vayas de buena 😊), porque da gusto subir a hacer descansitos a ver qué haces por allí arriba (de todo menos trabajar ya lo sabemos Pol y yo), mientras nos echamos unas risas. Te voy a echar muchísimo de menos porque eres una GRANDE (más grande que el caparazón de chichi) ¡¡¡TQ!!!

Y si agradecemos a gente del IRB, obviamente no se me puede olvidar mencionar agradecer a Fernando y Fernanda (también conocida como la Georgi), porque además de abrirnos todos los

días con una sonrisa de par en par (que a esas horas tiene mucho mérito), ¡siempre los pobres les toca subirme paquetes de Decathlon! Y por supuesto al dúo dinámico de Loli y Anni (Hola wpitass q tal el veranito?¿) que les gusta más hablar que a Anna Macia (aunque parezca imposible), pero siempre te alegran la tarde. Especialmente la Loli, que aunque se nos haya tenido que marchar esta última temporada, siempre la recordaremos por todas las risas que nos daba la gitana, desde cuando miraba los Friadys de Marta mientras hacía las sangres, hasta cuando ayudaba a propagar que Aida estaba embarazada o cuando llamaba fea a Natalia a la cara (pa lo que tiene en la cara no es tan fea la muchacha)... una grande haya donde las haya! ¡Y por supuesto también agradecer a Elena Moscatel, porque además de facilitar todos los papeleos...nunca está de más agradecerse cosas a una misma! Siempre tendré la esperanza de que algún día tal y como yo hice, se dé cuenta de que somos gemelas de ojos.

También me gustaría agradecer a la otra parte de patonc, ¡a los de anatomía! A todos por toda la faena que nos hacen, pero en especial a Carrelé y Santacana (por toooodas las inmunos y cortes) y a Andrea. La bendita de Andrea, que me tuviste que aguantar sola, justo cuando más cortes e inmunos he necesitado en la tesis (creedme que no son pocos), y aun así siempre siempre siempre lo tenía casi antes de que me diera tiempo a volver al IRB, no sé cómo coño lo haces pero eres un máquina, no he visto cosa más eficiente, me atrevo a decir que eres de las pocas personas que conozco que trabajan más que yo, así que de veras mil gracias, porque me has salvado miles y miles de veces, y encima siempre sonriendo ¡No va a haber otra igual! (¡Y por no mencionar la cantidad de maravillosos stickers que me has proporcionado!). También me gustaría agradecer en especial a la Dra Sonia Gatius, porque pese a casi crear un apartado nuevo solo para ella de DESAGRADECIMIENTOS, tras una laaaaaaaaaaaaaaarga época de escuchar lo siento, pero no hay ninguna diferencia, un buen día entro en razón y empezó a ver diferencias entre mis ratones y metástasis en sus pulmones, ganándose un sitio (y muy bien merecido) en agradecimientos, así que pese a todo GRACIAS Sonia jajajajaj. Así como también a Moni, a Marta Vaquero y a Bea por siempre ayudar con todo!

¡Gracias a todos los del estabulario por cuidar de los miles y miles de ratones¡, y en especial a Jessi y ahora a Leti, porque solo ellas saben la locura que puede llegar a ser C5 entre los ratones de Raúl, los de Gisela y los míos, así que ¡gracias por no volveros locas y la paciencia! Gracias a Albert por los plugs y a Marc por todas las veces que me ha salvado por la tarde cuando solo estaba él.

Y tras miles de páginas acabo ya con la gente del IRB a la que agradecer, de las cuales seguro me he dejado a mucha gente, pido perdón de antemano, pero tras tantos días hablando de CMV/CM-/CM-CAFF/CM-CAF+/P+/CMP+.....y su puta madre ya tengo el cerebro como una ameba! No me lo tengáis en cuenta.

Me gustaría agradecer, aunque ya ha pasado sus añitos a todos los biotecs, por los 4 años tan espectaculares de carrera, porque al ser tan poquito éramos como una familia y fue espectacular, obviamente sin vosotros no hubiese sido igual. Especialmente gracias a la pequeña familia de núcleo duro de biotecs: Chatis, Piuks, Oskicar, Sareta, Laura, Laure, Nil, Didi, Ali, Zapa, Ori, Ru, Anna, porque espero que siempre sigamos como hasta ahora reencontrándonos, aunque sea muy de vez en cuando como si fuese ayer y no hubiese pasado el tiempo. En especial, gracias a los que también han estado muy muy presentes durante esta etapa de la tesis como Ali (que siempre me pregunta, aunque a la pobre le tarde en contestar años, y siempre que

puede baja a vernos) o Anna (que no hay nada que más le guste que unirse siempre a cualquier celebración que le proponga y me lleva a todos los conciertos de Zoo, ¡siempre alegrándome con su alegría innata! 😊) muchas gracias por todo OQM! Y por supuesto y con mención especial, porque siempre siempre siempre está ahí, y hasta para mi madre es una hija más (de hecho eres la debilidad de mi madre, su ojito derecho) la Didi, Lady Di, Didi deditos, la morci, porque lo que tú me aguantas no lo aguanta nadie (creo que tienes síndrome de Estocolmo, ya te lo digo) apoyándome y aconsejándome desde la carrera de hasta el fin del doctorado, porque nada más que decir que hasta me vas a acompañar literalmente al postdoc a dejarme a EEUU, te quiero en mi equipo para siempre. Y gracias también al resto de la gran gente de ETSEA sobretodo a los responsables de la promo por todos los momentos tan intensos jajaja. Pero en especial a la Clau, mi vet cuida vacas favorita que se atrevió a vivir con Zap y conmigo durante la tesis, me ayudó a aguantar a Zapa y me ha aguantado en momentos de locura postlab (y durante la curentena) tq. A Juan, porque, aunque postpademia andábamos más liados con la tesis y ya no tanto, desde el principio hizo que la vuelta a Lleida fuera más amena haciéndonos siempre planes, acogiéndonos con sus amigos y si dándonos piscina a 80°C, tu si que vales Pemins. Y a Javi, por sacarme de Lleida muchísimos findes, enseñarme a escalar y llevarme a miles de picos y sitios chulos, y vaya gracias por todo, gracias a ti la tesis se ha hecho mucho más amena, gracias 😊.

También agradecer a las TRNASMED, Sara, Clara y Ara, porque durante esta época de tesis siempre han estado ahí y no tengo duda de que seguirán estando ahí. ¡Gracias por todo! ¡Y por el primer bodorrio que hemos vivido! ¡Espero que NO sea el primero de muchos!

Gracias a todos mis amigos de Cuenca, las GRECAS, Carol, Luz Elena, Muelas, Bea, Arturo y Maria, que, aunque me odien por no ir, ¡cada vez que voy es como si aun tuviésemos 17 años y fuésemos al Alfonso!

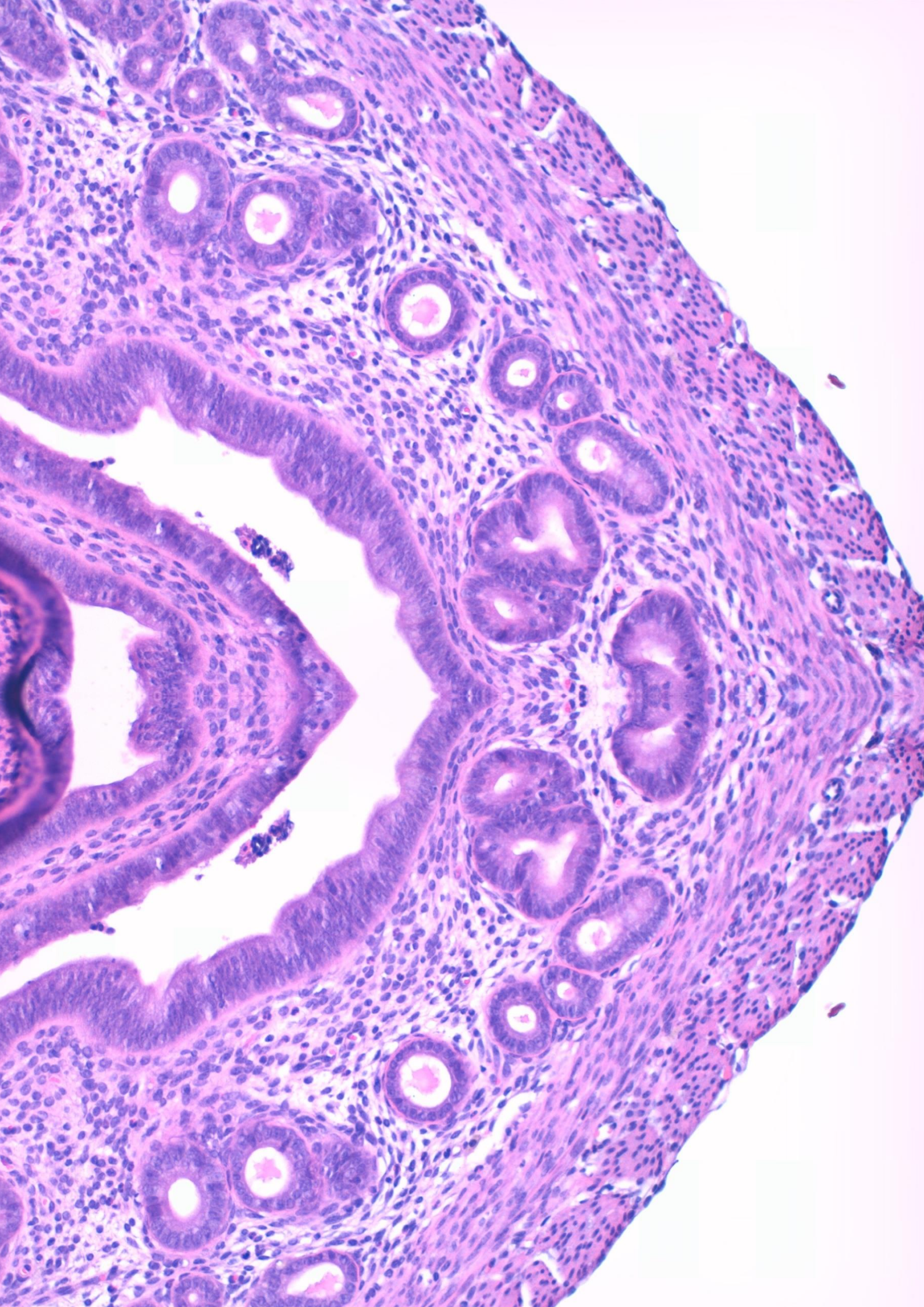
Gracias a toda la buena e inmejorable gente de PDT, con los que si empiezo no acabo, remarcando personajes como los Tatis, el Xinin, Alex HERNIANDEZ, Aua, Claudia, Mario, Santi, Fer, Gonchito, Jordi, Vane, Alberts, Dani, Edu, Nachii, ¡porque hacéis que cada vez que voy a PDT desconecte y poder volver nueva al lab! Creedme sin vosotros no hubiese acabado, a lo mejor sí, pero aún peor, así que en general ¡gracias a todos los colococoneros! Pero en especial por supuesto a mis niñas, la becerra, la Putri y la Perra sois lo más grande de lo más grande que pueda haber, ¡gracias de vosotras! Por todo el ánimo, las risas y el apoyo y cariño máximo e incondicional. No hay mejores amigas que vosotras en la tierra, avalado por científicos que no las hay 😊. En especial a mi Paulit que siempre siempre está, y ha estado ahí preocupándose porque no estallase con el doctorado ayudándome en cualquier momento que la necesitase TQ hermana.

Y por supuesto, gracias infinitas a mi familia. A mis abuelos, tíos, primos, a todos. Pero en especial a mi tía Pili por siempre estar ahí. Y obviamente a mis padres, porque que sí mamá, estudié biotec por ti (que todo el mundo lo sepa ¡porque si no lo leéis ya se va a encargar de contarla ella!). Por todo el apoyo que siempre me han dado y dan en todo momento tanto durante la carrera como durante el doctorado y apoyándome en seguir investigando con el postdoc ¡sin dudar! Siempre pilares fundamentales de mis decisiones ¡Muchas gracias por todo! Ahora que yo también tengo este hijo, os entiendo mejor.

Finalmente agradecer por su puesto a toooodos los ratones que han tenido que pasar por mis manos para que esta tesis salga adelante (tanto los que forman parte de ella, como los que no han tenido ese honor), desde marroncitos bonitos, hasta los calvos escrotales ¡GRACIAS! Perdonarme por lo vulgar pero literalmente, ¡Ole vuestro coño! Y por supuesto gracias a todas esas señoras, que, aunque no lo sepan, por suerte para la tesis y desgracia para ellas, han participado en esta tesis cediéndome un pedacito de ellas (literalmente hablando).

Y hasta aquí por fin, los agradecimientos, siento mucho cualquier persona que me haya olvidado, después de toda la tesis, es que ja lo mejor os he puesto hasta en la discusión! Así que, en resumen, GRACIAS A TODOS POR TODO, y espero que os pueda seguir agradeciendo porque sigáis haciendo cosas por mí. Y como antes he dicho, pido perdón a todos lo que me habéis tenido que aguantar ya todos los que les va a tocar hacerlo. Un placer coincidir en esta etapa y esta tesis ¡va por vosotros! ¡Salud y viva SAN MATEO siempre!







**ABSTRACT·**

**RESUM·**

**RESUMEN**

*“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar”*

**Hipatia**





# ABSTRACT

Endometrial carcinoma (EC) is the most common gynecological cancer, and represents the sixth most common type of cancer in women in developed countries. Moreover, its incidence is increasing every year worldwide. Although early detection of EC generally has a good prognosis, approximately 20% of cases are detected in advanced high-grade stages, which are usually already invasive and/or metastatic, presenting a poor prognosis. This, together with the lack of effective treatments, are the main reasons for death in patients with SC. Therefore, nowadays, the development of new therapeutic strategies against this type of tumors continues to be a challenge. It is now known that tumors are not only composed of tumor cells, but also of a complex tumor microenvironment (TME) made up of a heterogeneous cell population, soluble factors and components of the extracellular matrix (ECM), which has obvious influences on aggressive tumor behavior. Specifically, cancer associated fibroblasts (CAFs) are one of the major components of this TME, performing a variety of pro-tumorigenic functions widely implicated in tumor development and progression. Loss-of-function mutations of ARID1A (AT-rich interaction domain of A1 protein) accompanied by a loss of protein expression are frequently observed in ECs. However, the molecular mechanisms linked to this genetic change and involved in the initiation, maintenance and/or progression of EC have remained poorly studied and understood.

In this context, this thesis aims to analyze and understand the function of the loss of ARID1A expression throughout the process of endometrial tumorigenesis and its implication in the activation of TME.

In this study, using a wide variety of in vitro and in vivo models, such as: cell lines, 3D primary cultures and xenograft or transgenic murine models, it is demonstrated that loss of ARID1A is not sufficient per se to lead the initiation of endometrial tumorigenesis. However, loss of ARID1A in a previously established EC context promotes the acceleration of tumor progression and the development of metastases through overexpression and activation of histone deacetylase 6 (HDAC6). These increased levels of HDAC6 promote tumor proliferation and apoptotic escape through evasion of the G2/M cell cycle checkpoint and the ATM/ATR DNA damage signaling pathway. In addition, it also induces the promotion of epithelial mesenchymal transition (EMT) programs through hyperactivation of the MAPK pathway. Consistent with these results, HDAC6 inhibition can restore apoptotic vulnerability and reverse the migratory and invasive phenotypes of EC cells with ARID1A alterations. These results indicate that inhibition of HDAC6 activity is a potential therapeutic strategy for patients suffering from EC with ARID1A mutations diagnosed at advanced stages.

Furthermore, this thesis also describes that EC cells with loss of ARID1A, through secretion of CXCL16 and consequent activation of the CXCR6/CXCL16 axis, possess the ability to promote the activation of TME. Affecting both the aggressiveness of neighboring tumor cells with wild-type ARID1A expression and the recruitment and activation of stromal cells. These results are corroborated by the fact that both CXCL16 inhibition and CXCR6 inhibition can reverse the effects observed in tumor and stromal cells. These observations position the CXCR6/CXCL16 axis as a novel therapeutic avenue against pro-tumorigenic EMT in EC tumor patients with ARID1A alterations.



# RESUM

El càncer d'endometri (*Endometrial carcinoma*, CE) és el càncer ginecològic més freqüent i representa el sisè tipus de càncer més comú en les dones de països industrialitzats. A més a més, la seva incidència a nivell mundial està incrementant cada any. Tot i que la detecció primerenca del CE, generalment, té bon pronòstic, aproximadament un 20% dels casos són detectats en estadis avançats d'alt grau, els quals normalment, ja són invasius i/o metastàtics i presenten un mal pronòstic. Aquest motiu juntament amb l'escassetat de tractaments efectius són els principals motius de mort de les pacients amb CE. Per això, avui dia, continua sent un repte el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques contra aquest tipus de tumors. Actualment se sap que els tumors no només estan compostos per cèl·lules tumorals, sinó que es tracta d'un complex microambient tumoral (*tumor microenvironment*, TME) conformat per una població cel·lular heterogènia, factors solubles i components de la matriu extracel·lular (Extracellular matrix, ECM), que posseeix evidents influències en comportaments agressius del tumor. Concretament, els fibroblasts associats al càncer (*cancer associated fibroblasts*, CAFs) són un dels components més importants d'aquest TME, realitzant una gran varietat de funcions pro-tumorigèniques, àmpliament implicades en el desenvolupament i la progressió tumoral. Les mutacions de pèrdua de funció d'ARID1A (domini d'interacció ric en AT de la proteïna A1) acompanyades d'una pèrdua d'expressió de la proteïna són sovint observades als CE. Tanmateix, els mecanismes moleculars lligats a aquest canvi genètic i involucrats en la iniciació, el manteniment i/o la progressió del CE, han estat escassament estudiats i compresos.

En aquest context, aquesta tesi pretén analitzar i entendre la funció de la pèrdua d'expressió d'ARID1A al llarg del procés de la tumorigènesi endometrial i la seva implicació en l'activació del TME.

En aquest estudi mitjançant l'ús d'una àmplia varietat de models *in vitro* i *in vivo*, com ara: línies cel·lulars, cultius primaris 3D i models murins xenògrafs o transgènics es demostra que la pèrdua d'ARID1A no és suficient per liderar la iniciació de la tumorigènesi endometrial. Tanmateix, la pèrdua d'ARID1A, en un context de CE prèviament establert, promou l'acceleració de la progressió tumoral i el desenvolupament de les metàstasis a través de la sobreexpressió i activació de la histona deacetilasa 6 (HDAC6). Aquests nivells incrementats de HDAC6 promouen la proliferació tumoral i la fugida apoptòtica, mitjançant l'evasió del punt de control del cicle cel·lular G2/M i de la via de senyalització del dany al DNA ATM/ATR. A més, també indueix la promoció de programes de la transició epiteli mesènquima (*epithelial mesenchymal transition*, EMT) mitjançant la hiperactivació de la via de les MAPK. En concordança amb aquests resultats, la inhibició d'HDAC6 pot restablir la vulnerabilitat apoptòtica i revertir els fenotips migratoris i invasius de les cèl·lules de CE amb alteracions d'ARID1A. Aquests resultats indiquen que la inhibició de l'activitat de l'HDAC6 és una potencial estratègia terapèutica per a les pacients que pateixen CE amb mutacions en ARID1A i diagnosticades en estadis avançats.

A més, en aquesta tesi també es descriu que les cèl·lules de CE amb pèrdua d'ARID1A, a través de la secreció de CXCL16 i la conseqüent activació de l'eix CXCR6/CXCL16, tenen la capacitat de promoure l'activació del TME. Aquests canvis afecten tant a l'agressivitat de les cèl·lules tumorals veïnes amb expressió salvatge d'ARID1A, com en el reclutament i l'activació de les cèl·lules de l'estroma. Aquests resultats queden corroborats amb el fet que tant la inhibició de CXCL16, com la inhibició de CXCR6, poden revertir els efectes observats en les cèl·lules tumorals i estromals. Aquestes observacions situen a l'eix CXCR6/CXCL16 com una possible nova via terapèutica contra el TME pro-tumorigènica de les pacients amb tumors de CE con alteracions d'ARID1A.



# RESUMEN

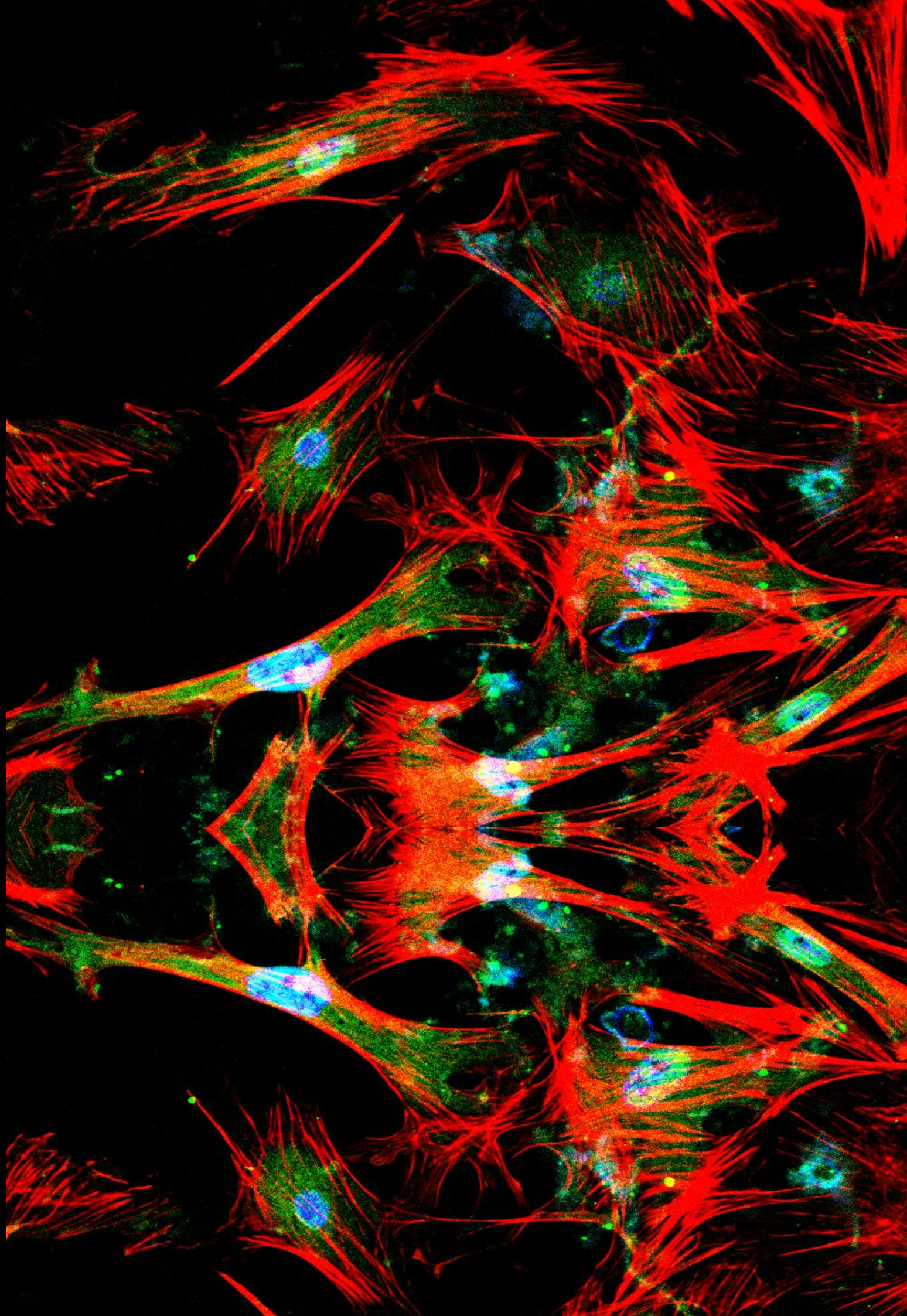
El cáncer de endometrio (*Endometrial carcinoma*, CE) es el cáncer ginecológico más frecuente, y representa el sexto tipo de cáncer más común de las mujeres en los países desarrollados. Además, su incidencia se está viendo incrementada cada año a nivel mundial. Pese a que la detección temprana del CE, generalmente, posee un buen pronóstico, aproximadamente un 20% de los casos son detectados en estados avanzados de alto grado, los cuales normalmente ya son invasivos y/o metastásicos, presentando un mal pronóstico. Este motivo, junto con la falta de tratamientos efectivos son los principales motivos de muerte en las pacientes con CE. Por lo que, hoy en día, sigue siendo un reto el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra este tipo de tumores. En la actualidad se sabe que los tumores no están compuestos solamente de las células tumorales, sino que se trata de un complejo microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME) conformado por una población celular heterogénea, factores solubles y componentes de la matriz extracelular (*Extracellular matrix*, ECM), que posee evidentes influencias en comportamientos agresivos del tumor. Concretamente, los fibroblastos asociados al cáncer (*cancer associated fibroblasts*, CAFs) son uno de los mayores componentes de éste TME, realizando una gran variedad de funciones pro-tumorogénicas ampliamente implicadas en el desarrollo y progresión tumoral. Las mutaciones de pérdida de función de ARID1A (*dominio de interacción rico en AT de la proteína A1*) acompañadas de una pérdida de expresión de proteína, son frecuentemente observadas en los CE. Sin embargo, los mecanismos moleculares ligados a este cambio genético e involucrados en la iniciación, mantenimiento y/o progresión del CE, han permanecido escasamente estudiados y comprendidos.

En este contexto, esta tesis pretende analizar y entender la función de la pérdida de expresión de ARID1A a lo largo del proceso de la tumorogénesis endometrial y su implicación en la activación del TME.

En este estudio, mediante el empleo de una amplia variedad de modelos *in vitro* e *in vivo*, tales como: líneas celulares, cultivos primarios 3D y modelos murinos xenógrafos o transgénicos, se demuestra que la pérdida de ARID1A no es suficiente *per se* para liderar la iniciación de la tumorogénesis endometrial. Sin embargo, la pérdida de ARID1A en un contexto de CE previamente establecido, promueve la aceleración de la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis a través de la sobreexpresión y activación de la histona deacetilasa 6 (HDAC6). Estos niveles incrementados de HDAC6 promueven la proliferación tumoral y la fuga apoptótica, mediante la evasión del punto de control del ciclo celular G2/M y de la vía de señalización del daño al DNA ATM/ATR. Además, también induce la promoción de programas de transición epitelio mesénquima (*epithelial mesenchymal transition*, EMT), mediante la hiperactivación de la vía de las MAPK. En concordancia con estos resultados, la inhibición de HDAC6, puede reestablecer la vulnerabilidad apoptótica y revertir los fenotipos migratorios e invasivos de las células de CE con alteraciones de ARID1A. Estos resultados indican que la inhibición de la actividad de HDAC6 es una potencial estrategia terapéutica para las pacientes que sufren CE con mutaciones en ARID1A diagnosticadas en estadios avanzados.

Además, en esta tesis también se describe que las células de CE con pérdida de ARID1A, por medio de la secreción de CXCL16 y la consecuente activación del eje CXCR6/CXCL16, poseen la capacidad de promover la activación del TME. Afectando tanto a la agresividad de las células tumorales vecinas con expresión salvaje de ARID1A, como al reclutamiento y activación de las células estromales. Estos resultados quedan corroborados con el hecho de que tanto la inhibición de CXCL16, como la inhibición de CXCR6, puede revertir los efectos observados en las células tumorales y estromales. Estas observaciones sitúan al eje CXCR6/CXCL16 como una novedosa vía terapéutica contra el TME pro-tumorogénico de las pacientes con tumores de CE con alteraciones de ARID1A.







# TABLA DE CONTENIDOS

*“En algún lugar, algo increíble está esperando ser descubierto”*

**Carl Sagan**



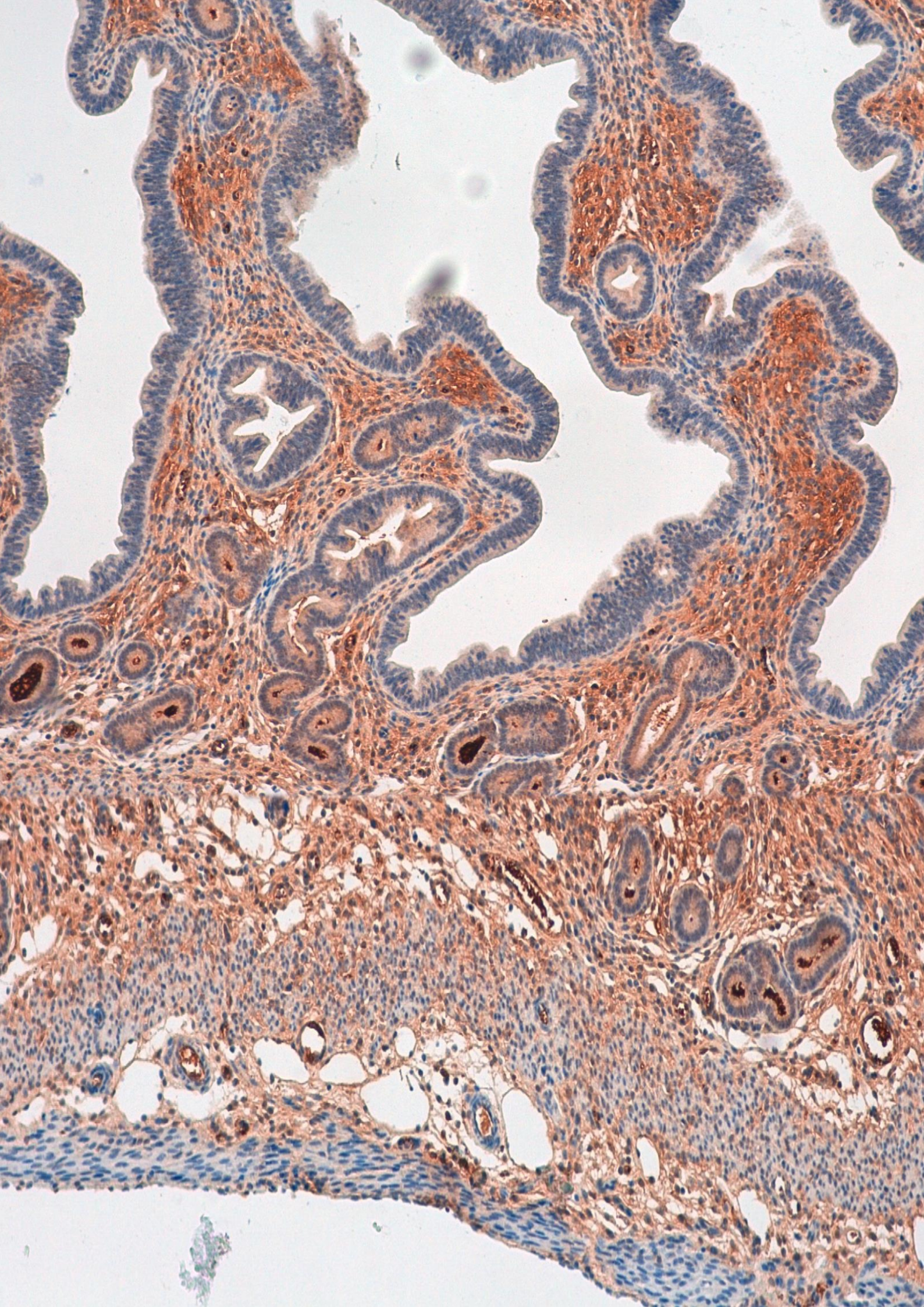


1.	Introducción .....	37
1.1.	El cáncer de endometrio .....	2
1.1.1.	Introducción general: Fisiología del útero y del endometrio en condiciones fisiológicas .....	2
1.1.2.	Epidemiología, diagnóstico y clasificación .....	4
1.1.3.	Cáncer de endometrio en modelos murinos .....	10
1.2.	El ciclo celular, los puntos de control del ciclo celular y daño al dna .....	12
1.2.1.	El ciclo celular .....	12
1.2.2.	Puntos de control del ciclo celular y las células cancerosas .....	14
1.2.3.	Reparación del daño a dna y las células cancerosas.....	16
1.2.4.	Reparación del daño a dna y el cáncer de endometrio .....	18
1.3.	Transición epitelio mesénquima y cáncer.....	19
1.3.1.	Transición epitelio mesénquima.....	19
1.3.2.	EMT y carcinoma endometrial.....	22
1.3.3.	Cascada metastática, metástasis y carcinoma endometrial.....	22
1.4.	Microambiente tumoral.....	25
1.4.1.	Estroma endometrial y función dual del estroma .....	25
1.4.2.	Microambiente tumoral: generalidades y componentes. ....	26
1.5.	Fibroblastos asociados al cáncer (CAF) .....	28
1.5.1.	Introducción general y activación de los CAFs.....	28
1.5.2.	Funciones, subtipos y estrategias terapéuticas .....	30
1.5.3.	CAFs y cáncer de endometrio .....	32
1.6.	ARID1A .....	34
1.6.1.	Introducción general.....	34
1.6.2.	ARID1A en cáncer .....	35
1.6.3.	Modelos murinos para el estudio de ARID1A en cáncer .....	37
1.6.4.	ARID1A en el carcinoma endometrial.....	38
1.7.	Histona deacetilasa 6 .....	39
1.7.1.	Introducción general.....	39
1.7.2.	HDAC6 y cáncer.....	39
1.8.	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C 16 (CXCL16) .....	41
1.8.1.	Introducción general.....	41
1.8.2.	CXCL16 y cáncer .....	43
2.	Hipótesis y objetivos.....	47

2.1.	Hipótesis.....	49
2.2.	Objetivos .....	49
3.	Materiales y métodos.....	51
3.1.	Cultivos celulares .....	53
3.1.1.	Cultivos de líneas celulares humanas .....	53
3.1.2.	Contaje celular .....	54
3.1.3.	Criopreservación y descongelación celular.....	54
3.1.4.	Aislamiento de células epiteliales y estromales de endometrio de ratón y cultivo en 2 dimensiones.....	55
3.1.5.	Obtención de medios condicionados (CM) de células en cultivo .....	56
3.1.6.	Generación de monocultivos tridimensionales (3D) con líneas celulares humanas de CE	56
3.1.7.	Generación de monocultivos tridimensionales (3D) con cultivos primarios de células epiteliales de endometrios murinos.....	57
3.1.8.	Generación de co-cultivos tridimensionales (3D) con diferentes líneas celulares de ce	57
3.1.9.	Generación de co-cultivos tridimensionales (3D) con líneas celulares de ce y células estromales endometriales (ESC).....	58
3.1.10.	Generación de cultivos organotípicos de células de CE y células estromales endometriales (ESC) .....	59
3.1.11.	Transfección, producción viral e infección in vitro .....	60
3.1.12.	Tratamientos farmacológicos <i>in vitro</i> .....	61
3.2.	Modelos de experimentación animal .....	63
3.2.1.	Ética y mantenimiento de ratones.....	63
3.2.2.	Ratones <i>CAG-Cre:ER<sup>T</sup></i> .....	63
3.2.3.	Ratones ARID1A floxeado ( <i>ARID1A<sup>ff</sup></i> ).....	64
3.2.4.	Ratones PTEN floxeado ( <i>PTEN<sup>ff</sup></i> ) .....	64
3.2.5.	Ratones <i>CAG-Cre:ER<sup>T</sup> ARID1A<sup>ff</sup> (Cre:ER<sup>T</sup> ARID1A<sup>ff</sup>)</i> .....	65
3.2.6.	Ratones <i>CAG-Cre:ER<sup>T</sup> PTEN<sup>ff</sup> ARID1A<sup>ff</sup> (Cre:ER<sup>T</sup> PTEN<sup>ff</sup> ARID1A<sup>ff</sup>)</i> .....	65
3.2.7.	Sexado y genotipado.....	65
3.2.8.	Tratamientos farmacológicos <i>in vivo</i> .....	66
3.2.9.	Recolección de plasmas sanguíneos .....	67
3.2.10.	Ratones inmunocomprometidos SCID .....	67
3.2.11.	Establecimiento de tumores subcutaneos en ratones inmunocomprometidos SCID	67
3.2.12.	Generación de modelos de metástasis en ratones inmunocomprometidos SCID. ...	68

3.2.13.	Generación de los dobles modelos murinos con tumores subcutáneos y posterior metástasis en ratones inmunocomprometidos SCID .....	69
3.2.14.	Generación de los modelos murinos xenógrafos ortotópicos endometriales en ratones inmunocomprometidos SCID .....	70
3.3.	Histología e inmunohistoquímica (IHC).....	72
3.3.1.	Procesamiento de biopsias e histología básica.....	72
3.3.2.	Inmunohistoquímica (IHC) .....	72
3.3.3.	Análisis de proliferación celular de tejidos mediante ki-67 .....	73
3.3.4.	Inmunohistofluorescencia (IHF).....	74
3.4.	Análisis molecular .....	76
3.4.1.	Análisis del RNA .....	76
3.4.2.	Análisis de proteínas.....	78
3.5.	Ensayos basados en células.....	88
3.5.1.	Análisis del perímetro glandular .....	88
3.5.2.	Análisis del índice de invasión de los cultivos 3D .....	88
3.5.3.	Ensayos de incorporación de Bromodeoxyuridina (Bdru) .....	88
3.5.4.	Análisis del perfil del ciclo celular .....	89
3.5.5.	Ensayo de duplicación de población acumulada .....	89
3.5.6.	Ensayo de migración de wound healing .....	89
3.5.7.	Ensayo de invasión de transwell.....	90
3.5.8.	Análisis de conjuntos de datos de expresión génica de carcinoma endometrial .....	91
3.5.9.	Ensayos de contractibilidad .....	92
3.6.	Análisis <i>in silico</i> expresión mRNA TCGA .....	92
3.7.	Análisis estadísticos.....	93
4.	Resultados .....	95
5.	Discusión.....	219
5.1.	Estudio de la implicación de ARID1A en el inicio y la progresión tumoral del carcinoma de endometrio.....	221
5.2.	Estudio de la implicación de ARID1A en el microambiente tumoral del carcinoma de endometrio.....	229
6.	Conclusiones.....	239
7.	Referencias .....	249
8.	Anexo.....	266
8.1.	Publicaciones.....	268







# LISTA DE FIGURAS

*“La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores”*

**Ruy Pérez Tamayo**



<b>Figura 1.</b> Anatomía e histología del útero humano. ....	3
<b>Figura 2.</b> Tasa estimada de incidencia global del CE. ....	4
<b>Figura 3.</b> Carcinoma endometrial. ....	6
<b>Figura 4.</b> Diagnóstico para la clasificación molecular del CE. ....	8
<b>Figura 5.</b> Anatomía e histología del útero murino. ....	10
<b>Figura 6.</b> Regulación del ciclo celular. ....	13
<b>Figura 7.</b> Vías moleculares de activación de los puntos de control del ciclo celular G1/S y G2/M.....	15
<b>Figura 8.</b> Vías moleculares de vías de reparación de daño DSB del DNA. ....	17
<b>Figura 9.</b> Proceso de EMT. ....	20
<b>Figura 10.</b> Cascada metastática. ....	23
<b>Figura 11.</b> Proceso de activación estromal. ....	26
<b>Figura 12.</b> Componentes del microambiente tumoral. ....	27
<b>Figura 13.</b> Mecanismos de activación y origen de los CAFs. ....	29
<b>Figura 14.</b> Mecanismos de funcionamiento de los CAFs. ....	31
<b>Figura 15.</b> Estructura de la proteína ARID1A.....	33
<b>Figura 16.</b> Actividades complejo SWI/SNF. ....	35
<b>Figura 17.</b> Estructura de la proteína HDAC6. ....	39
<b>Figura 18.</b> Eje CXCR6/CXCL16/ADAM10. ....	42
<b>Figura 19.</b> Eje CXCR6/CXCL16/ADAM10 y activación de la vía paxilina/FAK/Src.....	43
<b>Figura 20:</b> Esquema de los cuadrantes de la cámara de Nuebauer.....	54
<b>Figura 21:</b> Esquema del procedimiento de aislación de células epiteliales o estromales a partir de úteros murinos.....	56
<b>Figura 22:</b> Imagen representativa de los co-cultivos 3D de células epiteliales endometriales.....	58
<b>Figura 23:</b> Imagen representativa de los co-cultivos 3D de células epiteliales endometriales. ....	58
<b>Figura 24:</b> Imagen representativa de los cultivos organotípicos endometriales.....	60
<b>Figura 25:</b> Esquema representativo de la generación de los modelos murinos de tumores subcutáneos xenógrafos. ....	68
<b>Figura 26:</b> Esquema representativo de la generación de los modelos murinos xenógrafos metastáticos de pulmón. ....	69
<b>Figura 27:</b> Esquema representativo de la generación de los doble modelos murinos xenógrafos con tumores subcutáneos y metastáticos de pulmón. ....	70



<b>Figura 28:</b> Esquema representativo de la generación de los modelos murinos ortotópicos xenógrafos de endometrio con generación de focos metastáticos. ....	71
<b>Figura 29:</b> Esquema representativo del flujo de trabajo del array. ....	86
<b>Figura 30:</b> Esquema representativo del flujo de trabajo del elisa. ....	87
<b>Figura 31:</b> Imagen representativa del experimento de migración de wound healing.....	90
<b>Figura 32:</b> Imagen representativa del experimento de invasión de transwell clásico.....	90
<b>Figura 33:</b> Imagen representativa del experimento de invasión de transwell usando células de interés como quimioatrayente. ....	91
<b>Figura 34:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón no afecta a las ratios de proliferación. ....	97
<b>Figura 35:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón no afecta a los niveles de expresión claves para la progresión del ciclo celular. ....	98
<b>Figura 36:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio de ratón no afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular. ....	99
<b>Figura 37:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio humanas (HES) no afecta a las ratios de proliferación. ....	99
<b>Figura 38:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos de células epiteliales de endometrio de humano (HES) no afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la progresión del ciclo celular. ....	100
<b>Figura 39:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup></i> o <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> no afecta a las ratios de proliferación.....	101
<b>Figura 40:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup></i> o <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> no afecta a los niveles de expresión claves para la progresión del ciclo celular. ....	101
<b>Figura 41:</b> La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio de ratones <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup></i> o <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> no afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular. ....	102
<b>Figura 42:</b> Pérdida <i>in vivo</i> de la expresión de ARID1A en ratones <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> . ....	103
<b>Figura 43:</b> La pérdida de ARID1A <i>in vivo</i> no induce cambios histológicos en los endometrios de los ratones de la colonia <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> .....	104
<b>Figura 44:</b> La pérdida de ARID1A <i>in vivo</i> no induce cambios en las ratios de proliferación en los endometrios de los ratones de la colonia <i>Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup></i> . ....	104
<b>Figura 45:</b> Análisis de los niveles endógenos de expresión de proteína de diferentes líneas celulares humanas de CEE. ....	105
<b>Figura 46:</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE incrementa las ratios de proliferación. ....	106

<b>Figura 47.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la progresión del ciclo celular. ....	107
<b>Figura 48.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE induce un descenso de los niveles de expresión de la ciclina B y un incremento de la forma activa de la CDK1. ....	108
<b>Figura 49.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular. ....	108
<b>Figura 50.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la progresión de la fase mitótica del ciclo celular. ....	109
<b>Figura 51.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la activación del punto de control del ciclo celular G2/M...110	
<b>Figura 52.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta al crecimiento tumoral <i>in vivo</i> . ....	111
<b>Figura 53.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a las ratios de proliferación de los tumores <i>in vivo</i> . ....	111
<b>Figura 54.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a la morfología celular. ....	112
<b>Figura 55.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la migración e invasión celular. ....	113
<b>Figura 56.</b> La expresión de ARID1A se encuentra directamente relacionada con firmas asociadas a la adhesión celular e inversamente relacionada con firmas asociadas a EMT.....	114
<b>Figura 57.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce alteraciones en el fenotipo de EMT. ....	115
<b>Figura 58.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT. ....	116
<b>Figura 59.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce la activación de la vía de las MAPK/ERK. ....	117
<b>Figura 60.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la diseminación y colonización metastásica en pulmón <i>in vivo</i> . ....	118
<b>Figura 61.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión del punto de control G2/M del ciclo celular inducida por el tratamiento con Etopósido. ....	119
<b>Figura 62.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión al daño al DNA generado por el etopósido. ....	120
<b>Figura 63.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión a la respuesta apoptótica generada por el tratamiento con etopósido. ....	121
<b>Figura 64.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión de la expresión de los desencadenantes de la cascada apoptótica expresados tras el tratamiento con etopósido. ....	122

<b>Figura 65.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE evade la activación de la vía ATM/ATR de respuesta a daño por DSB tras el tratamiento con etopósido. ....	123
<b>Figura 66.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la sobreexpresión de HDAC6. ....	124
<b>Figura 67.</b> La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve un incremento de los niveles de HDAC6 nuclear. ....	125
<b>Figura 68.</b> La inhibición farmacológica con ACY1215 restaura los niveles de Ac-p53 (Lys 373-382) en líneas celulares humanas de CEE con niveles alterados de ARID1A. ....	126
<b>Figura 69.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.....	127
<b>Figura 70.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la alteración en la expresión de marcadores EMT inducida tras la pérdida de expresión de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE. ....	128
<b>Figura 71.</b> La infección de las células MFE-296 con el shRNA contra HDAC6 disminuye los niveles de expresión de HDAC6. ....	129
<b>Figura 72.</b> La disminución de los niveles de expresión de HDAC6 revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.....	129
<b>Figura 73.</b> La disminución de los niveles de expresión de HDAC6 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastática adquirida en las líneas celulares humanas de CEE tras la pérdida de ARID1A <i>in vivo</i> . ....	130
<b>Figura 74.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión al daño al DNA por el etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.....	132
<b>Figura 75.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión a la respuesta apoptótica generada por el tratamiento con etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE. ....	133
<b>Figura 76.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión de la expresión de los desencadenantes de la cascada apoptótica expresados tras el tratamiento con etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE. ....	134
<b>Figura 77.</b> La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 altera el equilibrio en el balance de las vías de reparación del daño DSB de DNA HR/NHEJ. ....	135
<b>Figura 78.</b> La disminución de los niveles de expresión de HDAC6 revierte la resistencia al tratamiento con etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE <i>in vivo</i> .....	137
<b>Figura 79.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	139
<b>Figura 80.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la invasión de las glándulas 3D formadas por células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	140

<b>Figura 81.</b> Los CM recolectados de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.....	141
<b>Figura 82.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la expresión de vimentina en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	142
<b>Figura 83.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A, de manera sostenida. ....	143
<b>Figura 84.</b> Análisis de la supervivencia e histología endometrial en el modelo murino <i>Cre:ERT; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> . ....	144
<b>Figura 85.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en las células epiteliales del modelo murino <i>Cre:ERT; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> acelera el incremento del volumen de las tiroides.....	145
<b>Figura 86.</b> Los plasmas recolectados de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> con CE promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.....	147
<b>Figura 87.</b> Los plasmas recolectados de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> con CE promueven la adquisición de fenotipos EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.....	148
<b>Figura 88.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la diseminación y colonización metastásica en pulmón <i>in vivo</i> . ....	150
<b>Figura 89.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen cambios morfológicos en las ESC. ....	151
<b>Figura 90.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la activación de las ESC.....	152
<b>Figura 91.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC. ....	154
<b>Figura 92.</b> Corroboración del aislamiento de CAFs de los adenocarcinomas endometriales del modelo murino <i>Cre:ER; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> .....	155
<b>Figura 93.</b> Los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> , presentan mayor actividad CAF respecto a los de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup></i> .....	156
<b>Figura 94.</b> Los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> , presentan mayores marcadores de fenotipos CAF respecto a los de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup></i> .....	157
<b>Figura 95.</b> El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> con CE inducen mayor activación de las ESC. ....	158
<b>Figura 96.</b> El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> con CE inducen la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC. ....	160
<b>Figura 97.</b> Las ESC activadas por lo CM de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A poseen mayores habilidades pro-tumorogénicas. ....	162
<b>Figura 98.</b> Los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> poseen mayores habilidades pro-tumorogénicas. ....	164

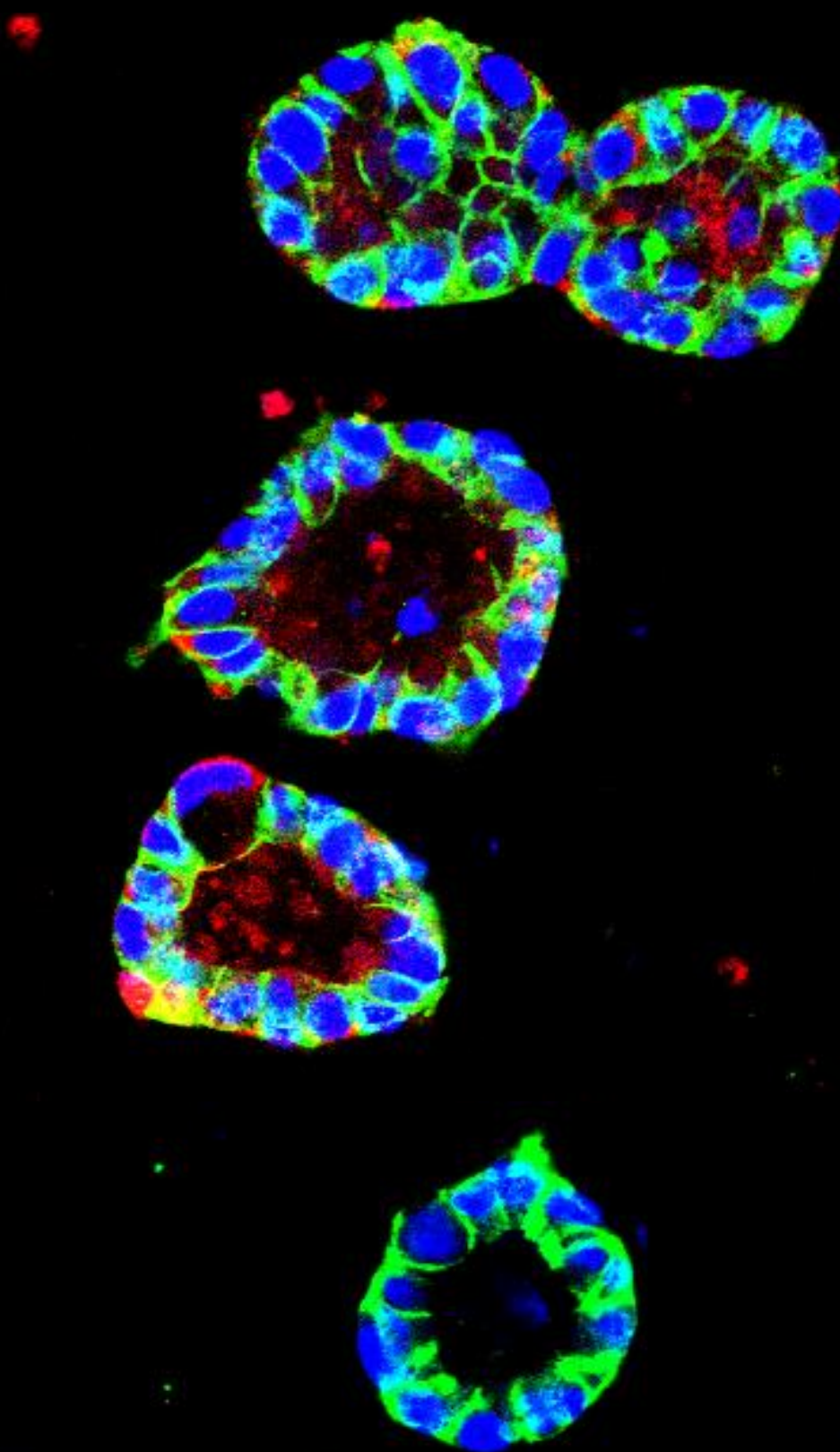
<b>Figura 99.</b> Las ESC activadas por los CM de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A y los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup></i> inducen fenotipos de EMT.....	165
<b>Figura 100.</b> La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la expresión de marcadores de activación estromal.....	166
<b>Figura 101.</b> La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la deposición de colágeno fibrilar tumoral.....	167
<b>Figura 102.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de activación estromal en tumores subcutáneos <i>in vivo</i> . ....	168
<b>Figura 103.</b> Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la deposición de colágeno fibrilar tumoral en tumores subcutáneos <i>in vivo</i> .....	169
<b>Figura 104.</b> La pérdida de expresión de ARID1A potencia la secreción de quimioquinas en las células de CEE. ....	170
<b>Figura 105.</b> La pérdida de expresión de ARID1A potencia la secreción de la quimioquina CXCL16 en las células de CEE.....	171
<b>Figura 106.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A secretan mayores niveles de quimioquina CXCL16. ....	172
<b>Figura 107.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan niveles elevados de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 además de promover la expresión de éstos en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	173
<b>Figura 108.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de CXCL16 y ADAM10 en tumores subcutáneos <i>in vivo</i> . ....	174
<b>Figura 109.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la secreción de la quimioquina CXCL16 <i>in vivo</i> . ....	174
<b>Figura 110.</b> La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la expresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10.....	176
<b>Figura 111.</b> La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa los niveles de CXCL16 secretado en plasma. ....	177
<b>Figura 112.</b> CXCL16 promueve la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	178
<b>Figura 113.</b> CXCL16 promueve alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	179
<b>Figura 114.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan hiperactivada la vía CXCR6/CXCL16 y promueven la activación de ésta en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	180
<b>Figura 115.</b> Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan cambios en la localización y expresión de CXCL16, YAP, p-paxilina y p-MLY2 y promueven dichos cambios en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	181

<b>Figura 116.</b> Tanto los tratamientos con rCXCL16 como el plasma de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup></i> con CE inducen la activación de la vía CXCR6/CXCL16. ....	182
<b>Figura 117.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A. ....	183
<b>Figura 118.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte la alteración en el fenotipo EMT, promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A. ....	184
<b>Figura 119.</b> La inhibición de CXCR6 revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A. ....	186
<b>Figura 120.</b> La inhibición de CXCR6 revierte la alteración en el fenotipo EMT promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A.....	188
<b>Figura 121.</b> El silenciamiento de CXCL16 en las células humanas de CEE con expresión alterada de ARID1A revierte su capacidad de promover la migración en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A. ....	188
<b>Figura 122.</b> La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastática promovida por las células de CEE con alteraciones de ARID1A en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A <i>in vivo</i> .....	190
<b>Figura 123.</b> La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastática promovida por las células de CEE con alteraciones de ARID1A en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A en los modelos murinos ortotópico xenograftos de endometrio. ....	192
<b>Figura 124.</b> La proteína rCXCL16 induce activación de las ESC. ....	193
<b>Figura 125.</b> La proteína rCXCL16 induce la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC.....	195
<b>Figura 126.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en células de CEE promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC y los CAF. ....	196
<b>Figura 127.</b> La pérdida de expresión de ARID1A en células de CEE promueve cambios en la localización y expresión de CXCL16, YAP, p-paxilina y p-MLY2 en las ESC y los CAF.....	198
<b>Figura 128.</b> La proteína CXCL16 promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC. ....	199
<b>Figura 129.</b> El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup></i> con CE promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC. ....	200
<b>Figura 130.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte la activación de las ESC promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A. ....	201
<b>Figura 131.</b> La inhibición de CXCR6 revierte la activación de las ESC promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A. ....	202



<b>Figura 132.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte el incrementado fenotipo CAF que presentan los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> . .....	203
<b>Figura 133.</b> La inhibición del receptor CXCR6 revierte el incrementado fenotipo CAF que presentan los CAFs aislados de CE de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> . .....	204
<b>Figura 134.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte las habilidades pro-tumorigénicas que poseen las ESC activadas por lo CM de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A. ....	205
<b>Figura 135.</b> La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte las habilidades pro-tumorigénicas que poseen los CAFs aislados de los CE de los ratones <i>Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup></i> . .....	206
<b>Figura 136.</b> La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A de promover el reclutamiento y la activación estromal en tumores subcutáneos <i>in vivo</i> . ....	208
<b>Figura 137.</b> Los tumores de CEE humano con alteraciones de ARID1A, presentan mayores niveles de expresión de mRNA de CXCR6 y ADAM10. ....	210
<b>Figura 138.</b> Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A promueven la migración y la activación del eje CXCR6/CXCL16 en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. ....	211
<b>Figura 139.</b> Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A secretan mayores niveles de CXCL16. ....	212
<b>Figura 140.</b> Los niveles de CXCR6 y ADAM10 se encuentra incrementados en las áreas de tumores de CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A. ....	213
<b>Figura 141.</b> Los tumores de CEE humano con alteraciones de ARID1A, presentan mayores niveles de expresión de mRNA de marcadores de activación estromal. ....	214
<b>Figura 142.</b> Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A promueven activación del eje CXCR6/CXCL16 en ESC. ....	215
<b>Figura 143.</b> Los niveles de $\alpha$ -SMA y FAP se encuentra incrementados en las áreas de tumores de CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A. ....	216
<b>Figura 144.</b> Modelo esquemático propuesto para la respuesta a los tratamientos con etopósido y el papel de HDAC6, en células de CE con alteraciones de ARID1A. ....	224
<b>Figura 145.</b> Resumen gráfico del modelo propuesto en el bloque de objetivos 1.....	226
<b>Figura 146.</b> Modelo esquemático propuesto del efecto de las células de CE con ARID1A alterado en las células de CE vecinas con expresión salvaje de ARID1A. ....	228
<b>Figura 147.</b> Modelo esquemático propuesto del efecto de las células de CE con ARID1A alterado en las células estromales del TME. ....	233
<b>Figura 148.</b> Resumen gráfico del modelo propuesto en el bloque de objetivos 2. ....	237





# LISTA DE TABLAS

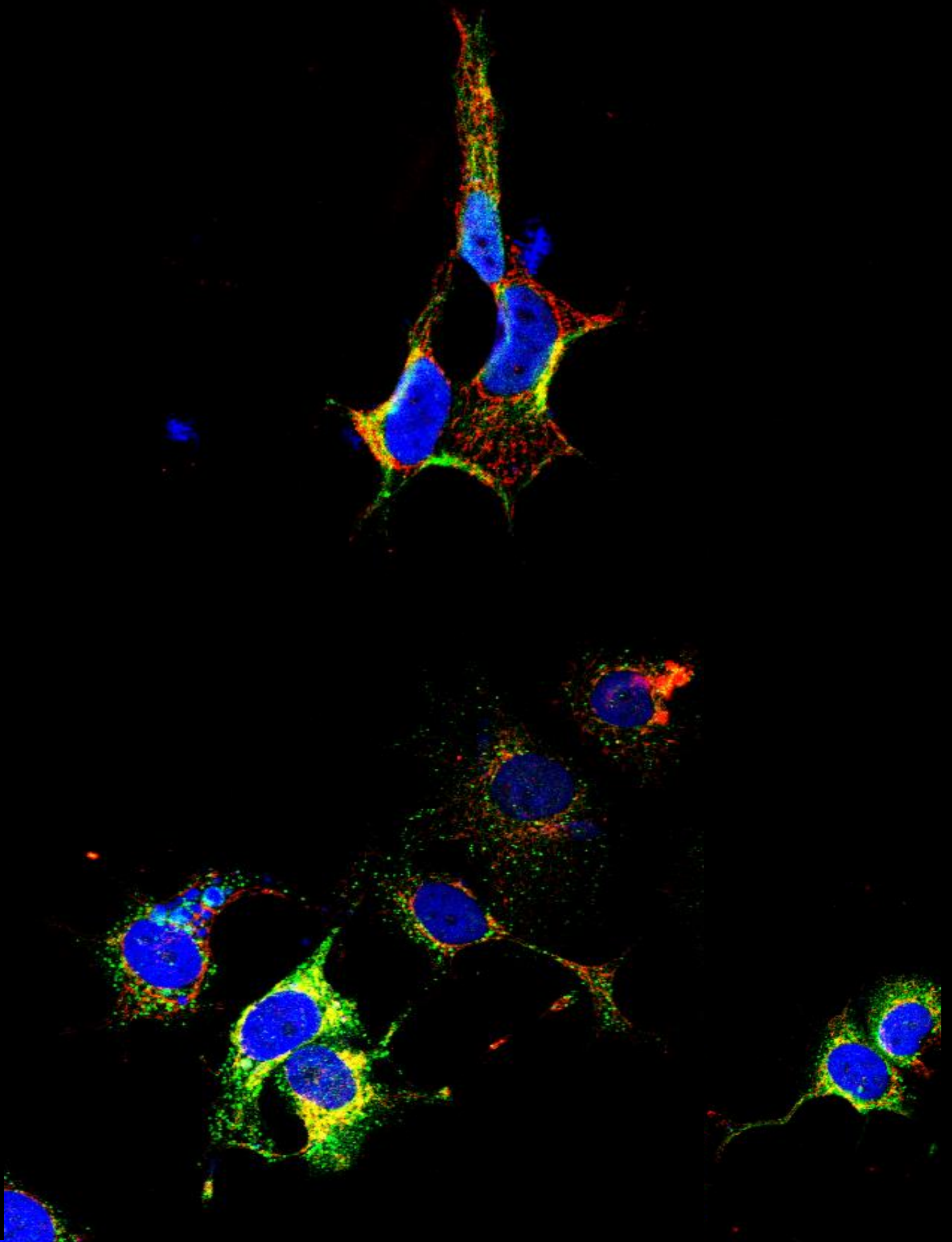
*“Todas las verdades son sencillas de entender una vez que se descubren; el punto es descubrirlas”*

*Galileo Galilei*



<b>Tabla 1.</b> Clasificación dualista de Bokhman del CE.....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación molecular del CE y características de cada uno.....	8
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de mutación de ARID1A en diferentes tipos de cáncer humano.....	36
<b>Tabla 4:</b> Características de las líneas celulares empleadas.....	53
<b>Tabla 5:</b> Plásmidos y secuencias diana empleada para el silenciamiento genético.....	61
<b>Tabla 6:</b> Características del genotipado de los modelos murinos transgénicos empleados en esta tesis.....	66
<b>Tabla 7:</b> Anticuerpos primarios empleados en la IHC.....	73
<b>Tabla 8:</b> Anticuerpos empleados en la IHF.....	75
<b>Tabla 9:</b> Sondas empleadas para el análisis de expresión de RNA.....	77
<b>Tabla 10:</b> Anticuerpos empleados en el westren blot.....	80
<b>Tabla 11:</b> Anticuerpos primarios empleados en la ICF.....	84
<b>Tabla 12:</b> Anticuerpos secundarios empleados en la inmunofluorescencia.....	85





# ABREVIACIONES

*"Haz las cosas lo más simple que puedas;  
pero no te limites a lo simple"*

**Albert Einstein**



## Nº

**2D:** Dos dimensiones

**3D:** Tres dimensiones

## A

**ADAM10:** Desintegrina y metaloproteínasa 10

**ARID:** dominio de interacción rico en AT

**ARID1A:** Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1

**ATM:** Ataxia telangiectasia mutada

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**ATR:** Ataxia telangiectasia y Rad3 relacionada

## B

**BAF:** *BRG1-associated factor*

**BER:** Reparación por escisión de base

## C

**CAF-+:** CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*

**CAF-f:** CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*

**CAFs:** fibroblastos asociados al cáncer

**CD:** dominio catalítico

**CDK:** quinasas dependientes de ciclina

**CE:** Carcinoma endometrial

**CEE:** Carcinoma endometrial endometriode

**CENE:** Carcinoma endometrial no endometriode

**CKIs:** Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina

**CM:** Medio condicionado

**CM-3:** Medios condicionados recogidos de células de CE con expresión alterada de ARID1A

**CM-CAF+:** CM recolectado de los CAF-+

**CM-CAFf:** CM recolectado de los CAF-f

**CM-ES3:** CM recolectado de las ES-3

**CM-ESV:** CM recolectado de las ES-V

**CM-V:** Medios condicionados recogidos de células de CE con expresión salvaje para ARID1A.

**Ct:** Umbral del ciclo

**CXCL16:** Ligando de quimiocina con motivo C-X-C 16

**CXCR6:** Receptos de quimiocina con motivo C-X-C 6

## D

**DC:** Células dendríticas

**DDR:** mecanismos de respuesta al daño del DNA

**DEMEM:** Medio de Eagle modificado de Dulbecco

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNA-PK:** DNA-dependent protein kinase

**DSB:** Roturas de doble cadena

## E

**ECM:** matriz extracelular

**EH:** Eosina Hematoxilina

**EMT:** Transición epitelio mesénquima

**EndMT:** transición endotelial a mesenquimal

**ES-3:** ESC previamente activadas con CM-3

**ESC:** Células estromales endometriales

**ES-V:** ESC previamente activadas con CM-V

**EV:** Vector vacío

## F

**FA:** Vías de la anemia de Fanconi

**FACS:** Clasificador celular activado por fluorescencia

**FAK:** Kinasa de adhesión focal

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos

**FEPE:** Fijado en parafina con formol

## G

**G1:** gap 1

**G2:** gap 2

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**GSEA:** Enriquecimiento de sets de genes

## H

**HBSS:** Solución salina equilibrada de Hank

**HDAC6:** histona deacetilasa 6

**HDACis:** inhibidores de HDACs

**HES:** Células epiteliales uterinas humanas

**HR:** Recombinación homóloga

**HS:** Suero de caballo

## I

**iCAF:** CAFs inflamatorios

**IHC:** Inmunohistoquímica

**IHF:** Inmunohistofluorescencia

**IK:** Ishikawa 3-H-12

**IL:** Interleucina

## L

**LUC:** Luciferasa

## M

**M:** mitosis

**mAb-CXCL16:** anticuerpo monoclonal neutralizante contra CXCL16

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MDSC:** Neutrófilos y células mieloides supresoras

**MET:** Transición mesénquima epitelio

**MGMT:** Metiltransferasa de ADN O6-metilguanina

**MLC:** Cadena ligera de miosina

**MLH1:** mutL Homology 1

**MMP:** Metaloproteasas 2 y 9

**MMR:** Reparación de desajustes

**MSCs:** células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea

**MSI:** Inestabilidad de microsatélite

**myoCAFs:** CAFs miofibroblásticos

## N

**NER:** Reparación por escisión de nucleótido

**NES:** secuencia de exportación nuclear

**NHEJ:** Unión de extremos no homólogos

**NK:** Células asesinas

**NKT:** Natural killer T

**NLS:** secuencia de localización nuclear

## O

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

## P

**P-+:** Plasmas recolectados de los ratones con CE *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/-</sup>*

**PARP:** Poli ADP Ribosa Polimerasa

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**P-f:** Plasmas recolectados de los ratones con *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*

**PFS:** Supervivencia libre de progresión

**PI3K:** fosfoinositida 3-quinasa

**POLE:** ADN polimerasa épsilon

**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

## R

**rCXCL16:** CXCL16 recombinante

**RI:** Radiaciones ionizantes

**RNA:** Ácido ribonucleótido

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**RPA:** proteína de la replicación A

**RSEM:** Datos de expresión génica

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

## S

**S:** interfase

**SCID:** Inmunodeficiencia combinada severa

**SD:** Desviación estándar

**SE14:** tetrapéptido con Ser-Clu

**sgRNA:** ARN de guía única

**shRNA:** Horquilla pequeñas de ARN

**SMI:** Moléculas inhibitoras pequeñas

**SPF:** Libre de patógenos específicos

**ss:** Monocatenario

**SSB:** Roturas de cadena simple

**ssDNA:** DNA monocatenario

**SWI/SNF:** SWItch / Sacarosa no fermentable

## T

**TAM:** Macrófagos asociados a tumores

**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer

**TGFβ:** Factor de crecimiento transformante beta



**TLS:** Síntesis de translesión

**TMB:** Alta carga mutacional tumoral

**TME:** Microambiente tumoral

U

**UBP:** dominio de dedo de zinc de unión a ubiquitina

V

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

W

**WB:** Western blot

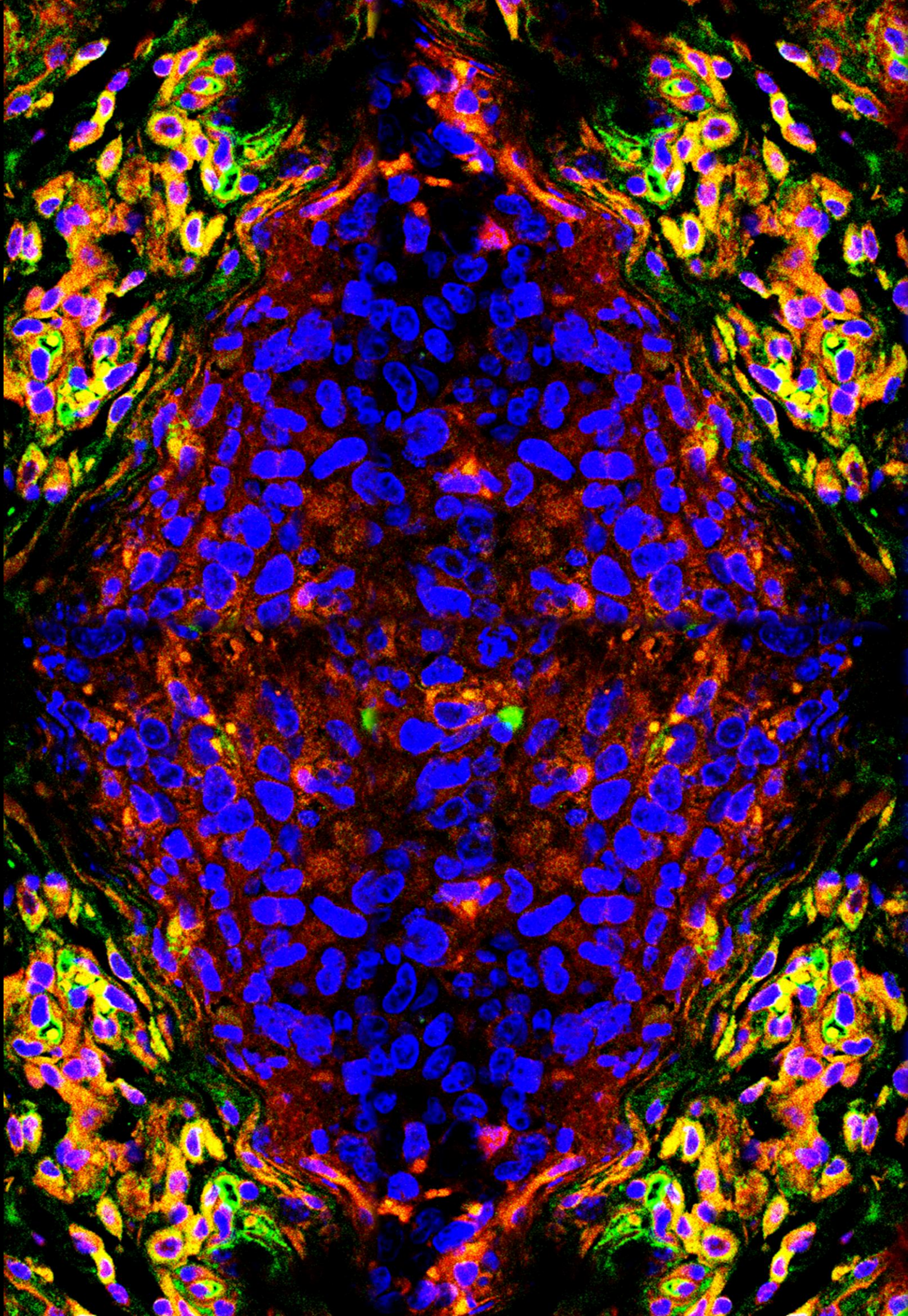
**WT:** Salvaje

Y

**YAP:** Proteína asociada a Yes









# 1. INTRODUCCIÓN

*"La duda es la semilla del conocimiento"*

**Francis Bacon**



## 1.1. EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

---

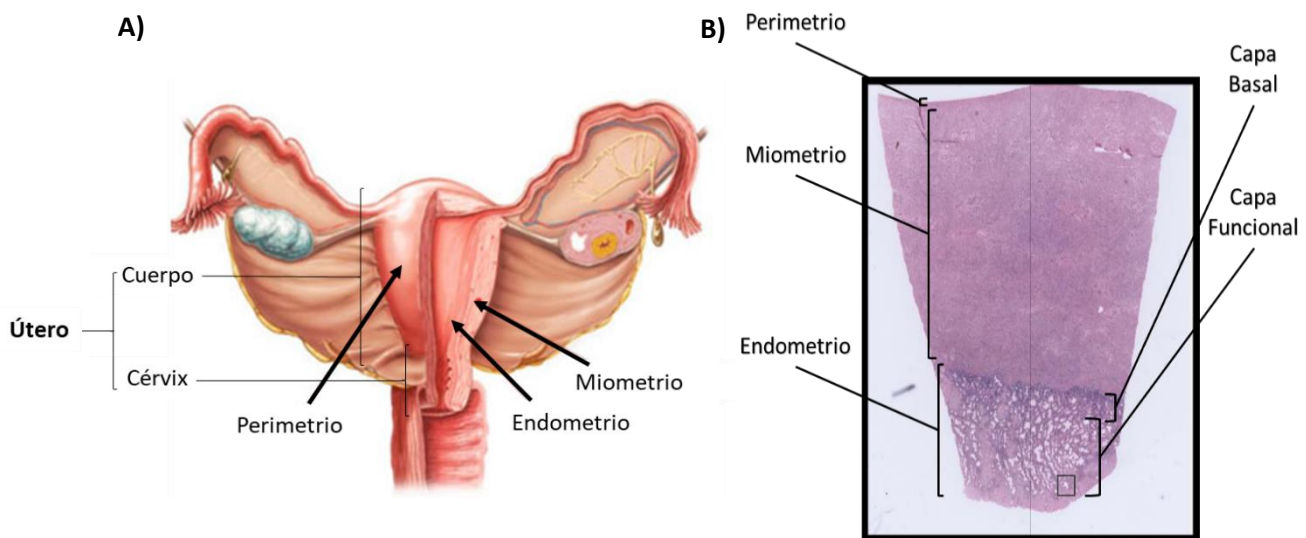
### 1.1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL: FISIOLÓGÍA DEL ÚTERO Y DEL ENDOMETRIO EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS

El útero humano es un órgano hueco con forma de pera, ubicado en la zona pélvica. El útero es primordial para el sistema reproductor femenino, puesto que toda implantación y crecimiento embrionario ocurre en él <sup>1</sup>.

Desde el punto de vista anatómico, el útero se compone de dos regiones principales: **el cuello o cérvix**, que es la porción inferior y angosta; y **el cuerpo**, que es la porción superior grande del órgano compuesta por una ancha pared y separada del cérvix por un istmo<sup>1,2</sup>. Desde el punto de vista histológico, esta pared uterina está compuesta por tres capas que desde la luz hacia afuera son (Figura 1):

- **Endometrio**, es la túnica mucosa interna. Histológicamente, está compuesto por: la *lamina epithelialis*, formada por epitelio columnar simple muy secretor, que constituye numerosas glándulas tubulares; y por la *lamina propia*, formada por tejido conectivo, también denominado estroma, que es rico en células estrelladas, en fibras reticulares y en material intracelular amorfo. Además, aunque en menor proporción, en la *lamina propia* también puede apreciarse la existencia de linfocitos, granulocitos y macrófagos. Fisiológicamente el endometrio se encuentra dividido en: la capa funcional superficial, constituida por las glándulas secretoras, las cuales son sensibles a estímulos hormonales y se renueva cada ciclo menstrual; y la capa basal, más profunda y vascularizada, no se modifica cada ciclo menstrual y es la encargada de regenerar la capa funcional<sup>1-3</sup>.
- **Miometrio**, es la túnica muscular media. Es una capa muscular gruesa formada por haces de músculo liso que forman tres estratos con limitación poco precisa: el estrato submucoso, el estrato vascular y el estrato subseroso. El primer y el último estrato se componen de fibras longitudinales paralelas al eje del órgano, mientras que el estrato vascular es más grueso y rico en vasos sanguíneos engrosados<sup>1-3</sup>.
- **Perimetrio**, es la túnica serosa externa. Es la cubierta peritoneal visceral del útero y se continúa con el peritoneo pélvico y abdominal, conectando así ambas caras del útero con las paredes y el suelo pélvico. Está compuesto por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo laxo<sup>1-3</sup>.



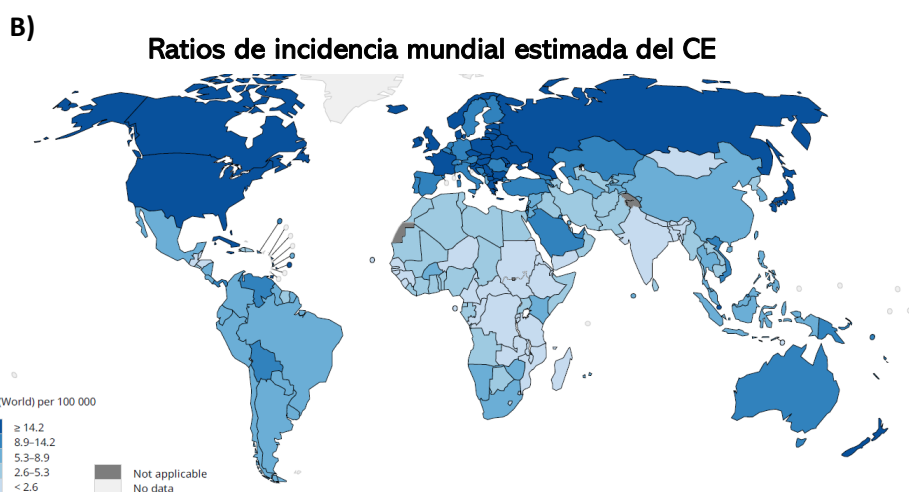
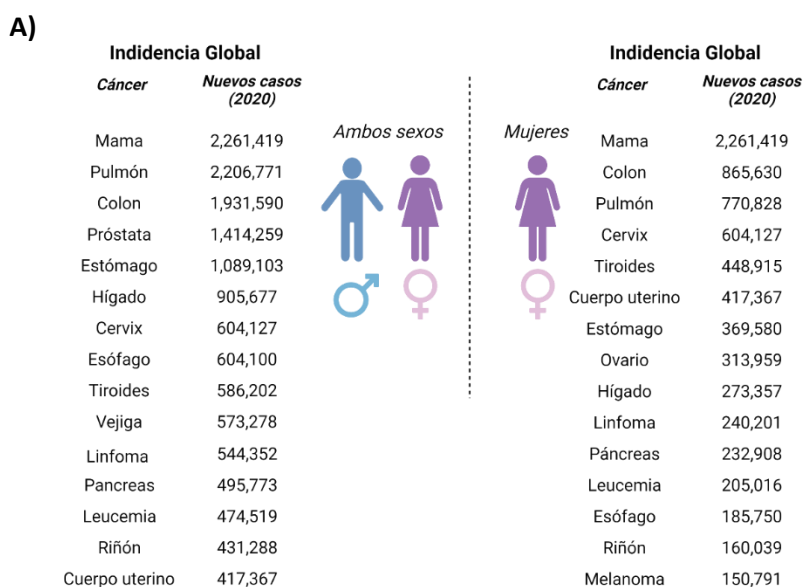


**Figura 1. Anatomía e histología del útero humano.** A) Representación gráfica que ilustra los órganos reproductores femeninos internos humanos. Se remarca las dos partes anatómicas de útero (cérvix y cuerpo) y las tres capas histológicas del útero (endometrio, miometrio y perimetrio). Figura adaptada de *endometrio-útero* - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. B) Imagen representativa de un corte histológico de un útero humano teñido con hematoxilina-eosina. Se remarca las tres capas histológicas del útero (endometrio, miometrio y perimetrio) y las dos capas fisiológicas del endometrio (funcional y basal). Figura adaptada de (Uterus4 n.d.).

El útero sirve como fuente hormonal, autocrina y paracrina, por lo que la presencia de receptores hormonales en las diferentes capas que lo forman es variable a lo largo del ciclo menstrual. En condiciones normales, el endometrio sufre alteraciones cíclicas conocidas como ciclo menstrual, el cual está dividido en tres fases: la **fase proliferativa**, en la cual folículos producidos en el ovario inducen un incremento de estrógenos a nivel sanguíneo (en particular, la estrona y el 17  $\beta$ -estradiol) impulsando la proliferación endometrial y regenerando la capa funcional; la **fase secretora**, en la cual se da una segunda ola de estrógenos pero al contrario que en la anterior, ésta no promueve la proliferación endometrial debido a la existencia de un aumento de progesterona que inhibe la acción de los estrógenos, con mitosis casi inexistentes, apreciándose un crecimiento provocado por una hipertrofia celular, un aumento de la vasculatura y la formación de un edema endometrial; y la **fase menstrual**, en la cual si no ha habido implantación cesa la producción de progesterona desmoronándose así la capa funcional y los vasos sanguíneos formados, provocando una secreción hemática y una disminución muy pronunciada del grosor endometrial <sup>1</sup>.

## 1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

El cáncer de endometrio (CE) se produce cuando las células del endometrio comienzan a proliferar fuera de control. El CE es la neoplasia ginecológica más frecuente, tratándose del sexto cáncer más común entre mujeres a nivel mundial y el quinceno a nivel general <sup>4,5</sup> (Figura 2-A). Se estima que en 2020 se diagnosticaron más de 417.000 nuevos casos (8,7 casos/100.000 mujeres) y fueron registrados más de 97.370 muertes a nivel mundial <sup>2,4</sup>. En los países desarrollados, se trata del cáncer ginecológico más común incrementándose su tasa de incidencia a 14,7 casos/100.000 mujeres<sup>2,4</sup> (Figura 2-B).



**Figura 2. Tasa estimada de incidencia global del CE.** A) Imagen representativa del número de casos diagnosticados de los 15 tipos de cáncer con mayor incidencia en 2020 a nivel mundial, separado por género. Adaptada de Endometrial cancer statistics World Cancer Research Fund International. B) Imagen representativa de la tasa de incidencia global del CE en función de la localización geográfica en 2020 por cada 100.000 mujeres. Adaptada de GLOBACAN 2020.

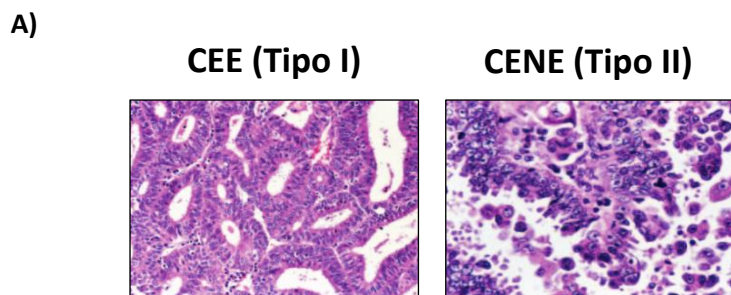
En el caso del CE el cribado rutinario para la detección precoz no se encuentra contemplado, y no se procede con el estudio hasta la aparición de síntomas. Los primeros procedimientos de **diagnóstico** son: la exploración ginecológica, incluyendo en ella la inspección con espéculo y colposcopia y tacto vagino-abdominal que permitirá definir el tamaño uterino, y la ecografía transvaginal guiada por ultrasonidos, en la cual mediante una sonda ecográfica se realiza la medición del endometrio. En función del resultado de éstas, se procede o no a la biopsia endometrial<sup>2</sup>.

Las biopsias endometriales son el “Gold Standard” para el diagnóstico del CE, existiendo diversos tipos de técnicas para su obtención: biopsia por aspiración (aspirados endometriales), se trata de una técnica mínimamente invasiva que permite la obtención de biopsias a ciegas de todas las caras y ángulos uterinos, por lo que presenta alta sensibilidad; la biopsia sólida, que consiste en mediante raspado conseguir la toma de un pequeño fragmento de endometrio sospechoso; y la histeroscopia dirigida, la cual por medio de un tubo flexible que permite la visualización directa del útero permitiendo obtener pequeñas muestras de cualquier zona sospechosa<sup>2</sup>.

Si tras los diagnósticos histológicos hay sospecha de posibles invasiones, se realizan pruebas de imagen, tales como resonancia magnética o la tomografía computarizada, pruebas más sensibles que permiten una mejor valoración de posibles invasiones<sup>2</sup>.

Respecto a la **clasificación**, clásicamente el endometrio ha sido clasificado en base a criterios clínicos, endocrinos y epidemiológicos<sup>6,7</sup>. Así, tradicionalmente los CE se diferencian en dos amplios grupos (Tabla 1):

- **CE de tipo I o endometriode (CEE)**: engloban alrededor de un 80% de los casos de CE y se encuentran ligados a un estado hiperestrogénico. Suelen tener lugar en mujeres peri o post menopaúsicas relativamente jóvenes. Al ser dependientes de estrógenos presentan elevados niveles de expresión de receptores de estrógenos y progesterona. Suelen desarrollarse a partir de lesiones precursoras como la hiperplasia endometrial (con y sin atipia nuclear). Suelen ser diagnosticados en estadios iniciales y de bajo grado (CEE1-2), por lo que su pronóstico suele ser favorable. A pesar de ello, aproximadamente un 20% de los casos de CEE diagnosticados son ya de alto grado (CEE3), presentando un patrón más agresivo relacionado con la aparición de metástasis distales siendo causante de un 39% de las muertes causadas por CE<sup>7-9</sup> (Figura 3).
- **CE de tipo II o no endometriode (CENE) o seroso**: representan entorno al 20% de los casos y no presentan relación con los estímulos hormonales. Suelen darse en mujeres de edad avanzada post menopaúsicas, generalmente con previo endometrio atrófico. Suelen diagnosticarse en estadios avanzados, presentando diseminaciones tempranas y peores pronósticos<sup>7-9</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Carcinoma endometrial.** A) Imágenes representativas de un corte histológico de una sección de un útero humano con CE de tipo I (izquierda) o de tipo II (derecha). Modificado de Matias-Guiu and Prat, 2013.

Características	Tipo I	Tipo II
Edad	Pre menopáusica	Post menopáusica
Prevalencia	80-90%	10-20%
Estadio en el diagnóstico	Temprano	Avanzado
Relación con el hiperestrogenismo	Si	No
Lesión precursora	Hiperplasia endometrial	-
Progresión	Lenta	Rápida
Pronóstico	Bueno	Malo

**Tabla 1. Clasificación dualista de Bokhman del CE.** Tabla indicadora de las características representativas de cada grupo de CE. Adaptación de Suarez, Felix, and Cohn 2017.

Desde el punto de vista patogénico esta caracterización resulta interesante, pero debido a que el CE presenta mecanismos patogénicos muy heterogéneos la Organización Mundial de la Salud (OMS) generó una nueva clasificación en base a las características histológicas y celulares. En esta nueva clasificación se incluyen nuevos tipos tumorales a partir de la integración de características moleculares de los tumores de CE<sup>10</sup>. De esta manera los actuales tipos histológicos de CE son:

- **Carcinoma endometriode**, corresponde con el CE de tipo I de la clasificación dualista y representa alrededor del 80% de los CE. Con arquitectura similar al endometrio sano, comprende un amplio espectro de diferenciación histológica, que se valora con el grado nuclear y arquitectural, parámetros que especifican la agresividad celular. Existen 3 grados (grado I, II y III) en función de la complejidad de su histología<sup>10</sup>.
- **Carcinoma seroso**, es el tipo de CENE más frecuente. Presentan una estructura papilar compleja. Este tipo de CE siempre se consideran de alto grado y suelen ser diagnosticados en estadios avanzados, siendo responsable del 40% de las muertes por CE<sup>10</sup>.

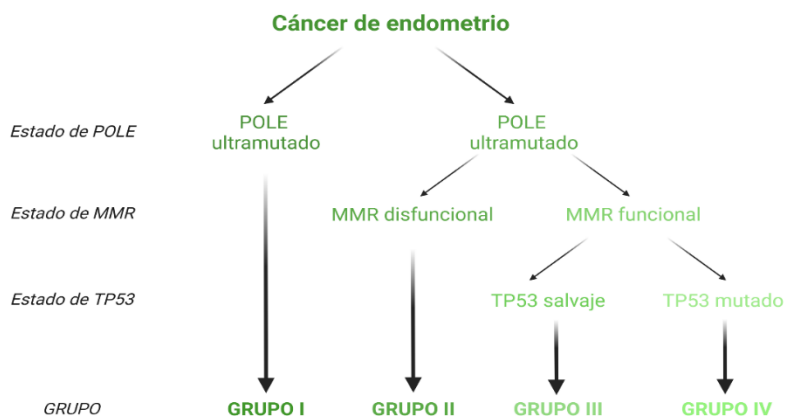
- **Carcinoma de célula clara**, presentan alta atipia nuclear y suelen ser estadios de alto grado. Es poco común y suele ser diagnosticado en estadios avanzados<sup>10</sup>.
- **Carcinoma indiferenciado y desdiferenciado**, el primero consta de células sin diferenciación evidente y el segundo de una mezcla de componente diferenciado e indiferenciado. Representa menos del 2% de los casos, pero éstos suelen ser muy agresivos, presentando elevada recurrencia y mortalidad<sup>10</sup>.
- **Carcinoma mixto**, se encuentra compuesto por una mezcla de dos o más tipos histológicos, de los cuales al menos uno es seroso o de célula clara. Su comportamiento depende del componente de mayor grado<sup>10</sup>.
- **Carcinoma escamoso**, compuesto por células con diferenciación escamosa. Se encuentra relacionado con condiciones inflamatorias crónicas. Representa el 0,5% de los casos con una agresividad dependiente del grado<sup>10</sup>.
- **Carcinoma mucinoso de tipo gastrointestinal**, extremadamente infrecuente. Formado por glándulas secretoras de mucina, generalmente de bajo grado<sup>10</sup>.
- **Adenocarcinoma mesonéfrico y *menonefric-like***, se trata de tumores recientemente descritos con poca información sobre su comportamiento.

Por otro lado, y a consecuencia de que la clasificación dualista faltaba de precisión al no contemplar la heterogeneidad celular, la red de investigación de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), propuso una nueva clasificación molecular independiente de la histología, creando una clasificación que integraba las características genómicas, transcriptómicas y proteómicas del CE<sup>8,11,12</sup>. Generándose así una nueva clasificación molecular que discierne en 4 grupos de tumores (Figura 4):

- **Grupo I o POLE (ultramutado)**, son CEE con mutaciones somáticas en la exonucleasa POLE y ratios de mutaciones muy elevadas, que tienen lugar en PTEN (94%), PIK3CA (71%), PIK3RI (40%), ARID1A (76%), KRAS (53%) y ARID5B (47%). Suelen ser de alto grado, pero asociados a buen pronóstico.
- **Grupo II o de inestabilidad de microsatélites (MSI)**, son CEE con inestabilidad de microsatélite frecuentemente con hipermetilación del MLH1 y una elevada ratio de mutaciones en PTEN (88%), RPL22 (33%), KRAS (53%), KRAS (35%), PIK3CA (54%), PIK3RI (40%) y ARID1A (37%). Suelen ser de tercer grado y asociados a pronósticos intermedios.
- **Grupo III o de bajo número de copias**, son CEE con pocas alteraciones en el número de copias, y baja tasas de mutaciones. Suelen ser de cualquier grado y con pronóstico intermedio.
- **Grupo IV o de alto número de copias y mutaciones en TP53 o *serus-like***, con un bajo ratio de mutación, pero muy frecuentes en TP53 (92%), además suelen presentar inestabilidad genómica con recurrentes ampliaciones (MYC, CCEN1, FGFR3 y SOX17). Suelen estar asociados a CE de tipo seroso, mixto y endometriode de alta grado, presentando peores pronósticos.

Profundizar en la caracterización de los diversos tipos de CE, así como la realización de una integración entre la clasificación molecular y la histología tumoral (Tabla 2), puede ser de gran importancia para la mejora tanto de la evaluación del pronóstico como para el manejo clínico de las pacientes<sup>8</sup>.

A)



**Figura 4. Diagnóstico para la clasificación molecular del CE.** A) Imagen representativa del algoritmo diagnóstico para la clasificación integrada molecular del CE, aplicable a todos los tipos histológicos.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Estado de POLE	Ultramutado	Normal	Normal	Normal
Alteraciones número de copias	Bajo	Bajo	Bajo	Alto
MSI/Metilación MLH1	Variable	Elevado	Estable	Estable
Tasa de mutaciones	Muy elevada	Elevada	Baja	Baja
Prevalencia de mutaciones	POLE (100%) PTEN (94%) PI3KCA (71%) FBXW7 (82%) ARID1A (76%) KRAS (53%) ARID5B (47%)	PTEN (88%) RPL22 (37%) KRAS (35%) PI3KCA (54%) ARID1A (37%)	PTEN (77%) CTNNB1 (52%) PI3KCA (53%) ARID1A (42%)	TP53 (92%) PI3KCA (47%)
Histología	Endometriode	Endometriode	Endometriode	Seroso, endometriode y mixto
Grado	1-3	1-3	1 y 2	3
PFS	Buena	Intermedia	Intermedia	Baja

**Tabla 2. Clasificación molecular del CE y características de cada uno.** PFS, supervivencia libre de progresión, en inglés *progression-free survival*. Adaptado de Murali et al.,2014.

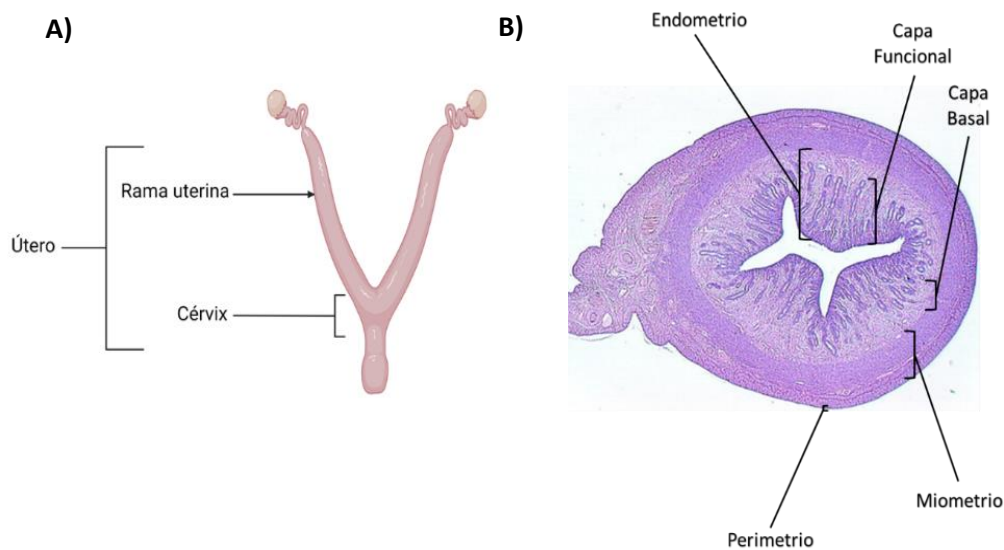
Respecto a los **tratamientos**, la intervención quirúrgica, mediante la histerectomía total, es el principal tratamiento para las mujeres con CE. Aun así, en algunos casos es necesario el empleo de más de un tratamiento. La elección de dichos tratamientos depende en gran medida tanto del tipo concreto de cáncer como del estadio de la enfermedad en el momento de su detección<sup>13</sup>. Entre los tratamientos complementarios o adyuvantes se encuentran la radioterapia, la quimioterapia, la terapia hormonal, la terapia molecular dirigida (con inhibición directa de moléculas diana) o la inmunoterapia<sup>13,14</sup>. Actualmente, entre los nuevos tratamientos disponibles más relevantes se pueden encontrar sobre todo tratamientos de inmunoterapia y terapias dirigidas. Los tratamientos de **inmunoterapia** se basan en ayudar al sistema inmune a combatir mejor el cáncer. Actualmente existen dos tratamientos de este estilo aprobados por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos): Dostarlimab, el cual se trata de un inhibidor del punto de control del sistema inmune que va dirigido contra la vía PD-1 y ha sido aprobado para paciente con CE recurrente y deficiencias del MMR (*mismatch repair*); y Pembrolizumab, el cual también es un inhibidor del punto de control del sistema inmune dirigido contra la vía PD-1/PD-L1 y ha sido aprobado para pacientes con CE avanzado entre los que se incluyen los CE con MSI-H o con una alta carga mutacional tumoral (TMB)<sup>15,16</sup>. Pembrolizumab también ha sido aprobado para su uso en combinación con la terapia dirigida lenvatiniv, en algunas pacientes con CE avanzado o recurrente, independientemente de su estado de MSI o TMB. Además, otras inmunoterapias y tratamientos combinatorios están siendo testadas en ensayos clínicos<sup>15,16</sup>. Los tratamientos de **terapias dirigidas**, se basan en fármacos u otras sustancias que interfieren con moléculas específicas, o dianas terapéuticas, para bloquear el crecimiento o la agresividad tumoral. Solamente algunas terapias dirigidas son empleadas en el CE y algunas de ellas solamente se emplean en ensayos clínicos, aunque muchas se encuentran fase de estudio<sup>15,17</sup>. Este tipo de terapias son básicamente empleadas en CE de alto riesgo, recurrente o metastático. Entre las principales terapias dirigidas podemos encontrar: el Lenvatinib, el cual es un inhibidor de quinasas que ayuda principalmente a bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos (inhibidor de la angiogénesis) y que, como anteriormente se ha mencionado, ha sido aprobado en combinación con inmunoterapia; el Bevacizumab, el cual mediante la inhibición de VEGF actúa también como inhibidor de la angiogénesis y que ha sido aprobado en combinación con quimioterapia o monoterapia; y los inhibidores de mTOR (como Everolimus o Temsirolimus), los cuales mediante la inhibición de mTOR impiden un normal crecimiento de las células tumorales y que han sido aprobados en combinación con quimioterapia y terapias hormonales<sup>15,17</sup>.

Cabe destacar que las metástasis distales son una de las principales causas de los tratamientos fallidos y de los malos pronósticos en los pacientes con CE, no existiendo un tratamiento extendido con el que se haya demostrado una reducción significativa de la supervivencia de dichos pacientes después de la recurrencia de la enfermedad<sup>18,19</sup>.



### 1.1.3. CÁNCER DE ENDOMETRIO EN MODELOS MURINOS

A diferencia del útero humano, el útero murino es bicornue poseyendo dos cuellos uterinos que conectan por la vagina a través del cérvix (Figura 5). De igual manera que en el caso de los humanos, el útero murino también experimenta cambios cíclicos, con la diferencia de que en el caso de los ratones lo que experimentan es un ciclo estral en vez de menstrual, el cual se da de manera ininterrumpida durante todo el año y tiene una duración de 4 a 5 días<sup>20</sup>.



**Figura 5. Anatomía e histología del útero murino.** A) Imagen representativa del útero murino, donde se pueden observar las dos ramas uterinas y el cérvix. B) Imagen representativa de una sección histológica de un útero murino adulto. Imagen adaptada de *Uterus | Microanatomy Web Atlas | Gwen V. Childs, Ph.D.*

El desarrollo de modelos murinos genéticamente modificados ha sido crucial para el estudio de mecanismos moleculares encargados de gobernar la formación y progresión tumoral, así como para el de la identificación y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. De manera global, dentro de los posibles modelos transgénicos murinos empleados para el estudio del cáncer podemos encontrar: los **modelos con ganancia de función**, empleados principalmente para el estudio de oncogenes, dentro de los cuales encontramos los modelos de inserción constitutiva (los cuales sobreexpresan un transgén constitutivamente) y los modelos condicionales knock-in (con expresión controlada del transgén); y los **modelos con pérdida de función**, en los cuales un gen se silencia o elimina con el fin de causar una pérdida de función de dicho gen, dentro de los cuales encontramos los modelos constitutivos knock-out (donde el gen diana se encuentra permanentemente inactivado) y los modelos condicionales knock-out (donde la pérdida del gen de interés es regulada espacial y temporalmente, mimetizando mejor la carcinogénesis espontánea)<sup>21</sup>. En particular, el sistema Cre-loxP es ampliamente utilizado como herramienta para la generación de los modelos condicionales Knock-out. Se basa en un sistema en donde la

recombinasa *Cre* reconoce fragmentos específicos de DNA (ácido desoxirribonucleico) denominados sitios *loxP* y media la delección específica de sitio de las secuencias de DNA que se encuentran entre dos sitios *loxP* directamente repetidos<sup>22</sup>. Para la generación de modelos espacialmente controlados, son necesarios dos elementos del sistema Cre-*loxP*: que la recombinasa *Cre* se encuentre expresada bajo un promotor que se active específicamente en la célula o tejido de interés y que la secuencia de DNA de interés que se encuentre flanqueada por las secuencias *loxP*. En estos modelos inducibles del sistema Cre, la especificidad y el momento de la recombinación se encuentran controladas bajo elementos regulatorios específicos de células (promotores y/o potenciadores) o de manera temporalmente inducible mediante inductores exógenos (como el tamoxifeno o la tetraciclina)<sup>22</sup>.

*PTEN* (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) es uno de los genes supresores de tumores más mutados en los carcinomas humanos, presentando delecciones en numerosas neoplasias. Mutaciones de pérdida de función de *PTEN* han sido notificadas en numerosos tipos de cánceres humanos, incluyendo el carcinoma endometrial en el cual pueden apreciarse alteraciones en *PTEN* en un 40% de los casos<sup>23,24</sup>. A lo largo de los años, numerosos tipos de modelos murinos con delecciones condicionales en el endometrio han sido generados para la mejora del estudio del carcinoma endometrial<sup>25</sup>. Pese a la amplia variedad de modelos murinos existentes en nuestro laboratorio, en 2013, Mirantes, C, et al definieron un nuevo modelo murino de ratón condicional knock-out portador de la delección de *PTEN* inducible por tamoxifeno (mediante la tecnología Cre-LoxP), en el cual mediante la administración de una dosis única de tamoxifeno se inducía la ablación completa de *Pten* principalmente en las células epiteliales. Esta pérdida conduce a un desarrollo extremadamente rápido y reproducible de carcinomas endometriales *in situ*, así como de neoplasias de próstata e hiperplasias de tiroides<sup>24</sup>. Generando así un modelo muy útil para la investigación en cáncer, tanto a nivel de investigación terapéutica como molecular.

## 1.2. EL CICLO CELULAR, LOS PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR Y DAÑO AL DNA

---

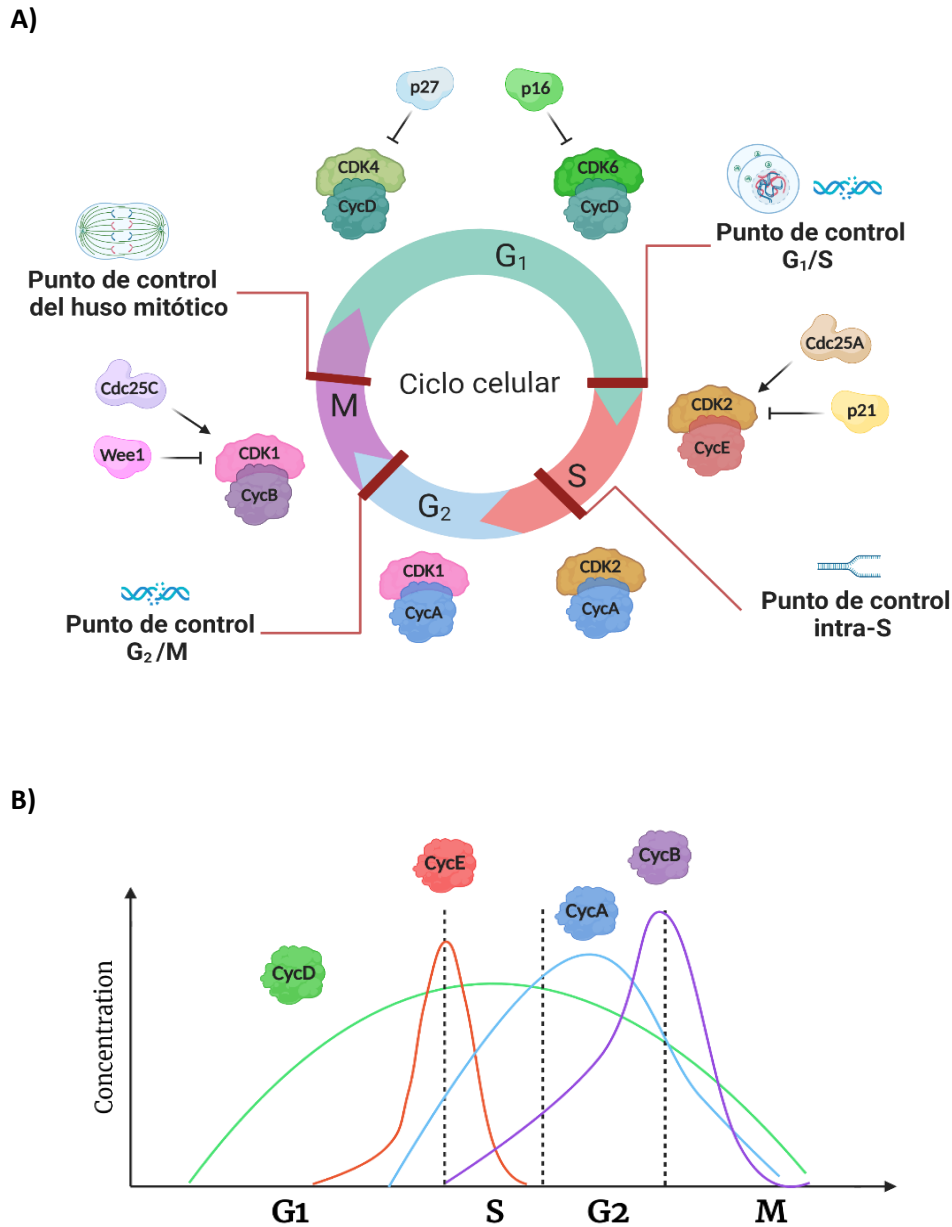
### 1.2.1. EL CICLO CELULAR

En células eucariotas, el ciclo celular es el proceso durante el cual una célula duplica su contenido celular completo y subsecuentemente, a través de la división, da lugar a dos células genéticamente idénticas<sup>26</sup>. Este proceso está controlado por una compleja red de mecanismos de regulación, control y balances que aseguran que no se cometan errores antes de que las células entren y progresen a través del ciclo celular<sup>26</sup>. El ciclo celular consta de dos fases principales que son la **interfase o fase S**, en la cual se da la replicación del DNA, y la **mitosis o fase M**, en la cual se produce la separación del DNA y la segregación del contenido celular en dos células hijas. Entre la fase S y M encontramos las denominadas fases de vacío (*gap phases*), la **G1** (que se da antes de la entrada en fase S) y la **G2** (la cual se da tras la salida de la fase S). Estas fases son periodos claves para la regulación del ciclo celular, decidiéndose en G1 si entrar o no en el ciclo celular y en G2 si iniciar el proceso que desencadenará en la segregación cromosómica (Figura 6-A). Durante G1, las células también pueden salir del ciclo celular a un estado reversible no proliferativo, conocido como quiescencia o G0<sup>26-28</sup>.

La progresión del ciclo celular se encuentra regulada por niveles secuenciales y oscilantes de la actividad de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs). Diferentes ciclinas reguladoras (las cuales van produciéndose y degradándose a lo largo del ciclo (Figura 6-B)) se unen a CDKs concretas, de manera que cada fase del ciclo celular se encuentra caracterizada por la formación de complejos específicos de heterodímeros ciclina/CDK, que mediante la fosforilación de diferentes genes diana, promueven una progresión del ciclo celular de manera secuencial y unidireccional (Figura 6-A)<sup>26-28</sup>. La actividad de las CDKs depende principalmente de procesos de fosforilación y desfosforilación reversibles, así como de la disponibilidad y degradación de sus cofactores (las ciclinas)(Figura 6-B), y de la presencia o no de diversos inhibidores de CDKs (CKIs)<sup>26-28</sup>.

De tal modo, durante la fase G1, en respuesta a estímulos mitóticos y de crecimiento, la ciclina D se acumula y forma complejos con CDK4/6 que conducen a la progresión de fase G0 o G1 a fase S. La actividad de CDK4/6 se encuentra regulada positivamente por la asociación con la ciclina D y negativamente controlada por la unión a CKIs de la familia INK4 (tales como p16, p15, p18 o p19)<sup>29,30</sup>. El complejo CDK4/6-ciclinaD activo, mediante la fosforilación del RB, libera el factor de transcripción E2F y promueve la progresión de fase G1 a S, induciéndose la transcripción de genes como la ciclina E y A, así como la de otras proteínas necesarias para la síntesis de DNA. La ciclina E forma un complejo con la CDK2, la cual se encontraba previamente secuestrada por los CKIs p21 y p27. Además la fosfatasa Cdc25A se encarga de promover la activación del complejo CDK2-ciclinaE mediante la eliminación de fosforilaciones inhibitorias<sup>29,30</sup>. Finalmente, la ciclina A sustituye a la ciclina E, permitiendo la progresión por la fase S. Durante la fase G2, la CDK2 es sustituida por la CDK1 y la proteína Cdc25C, mediante desfosforilaciones de residuos claves, activa el complejo CDK1-ciclinaA, el cual facilita la progresión por G2<sup>29,30</sup>. Posteriormente, durante la fase M, es la ciclina B la que se une a CDK1 formándose el complejo

CDK1-ciclinaB, promoviendo la mitosis. Finalmente, la salida mitótica es impulsada por el complejo APC/CCDC20, el cual provoca la proteólisis de la ciclina B, reduciéndose la actividad CDK a cero y reiniciándose el ciclo celular de las dos células hijas a la fase G1 (Figura 6-A)<sup>29,30</sup>.

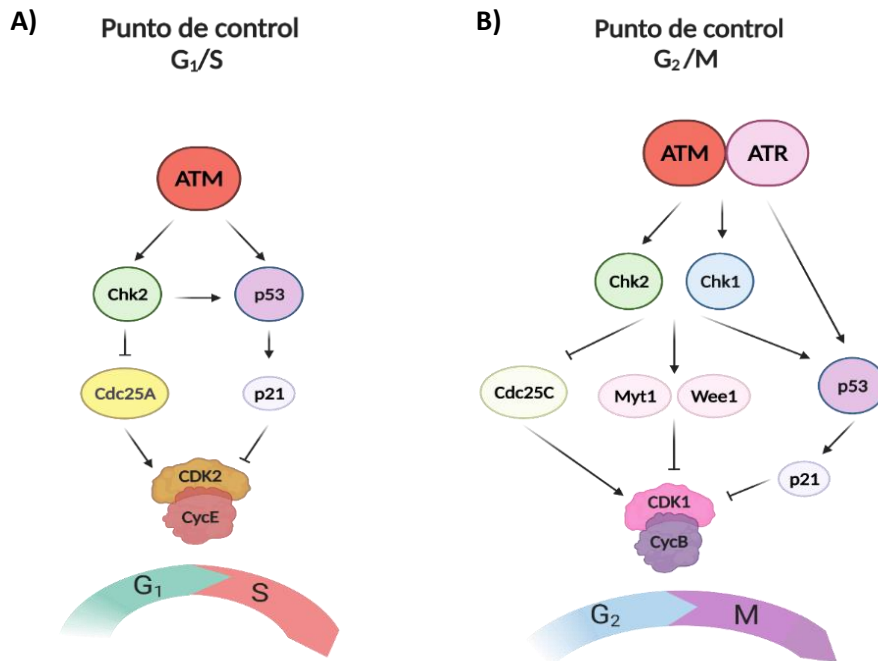


**Figura 6. Regulación del ciclo celular.** A) Imagen esquemática de las diferentes fases del ciclo celular, los diferentes puntos del control del ciclo celular y los diferentes complejos CDK-ciclina que regulan la progresión del ciclo celular en las diferentes fases y varios reguladores de estos complejos. B) Diagrama representativo de la concentración de las diferentes ciclinas a lo largo de las diversas fases del ciclo celular. S, interfase; G<sub>2</sub>, gap 2; M, mitosis; G<sub>1</sub>, gap 1. Creado con BioRender.com

### 1.2.2. PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR Y LAS CÉLULAS CANCEROSAS

La transición entre las diferentes fases del ciclo está regulada por los puntos de control del ciclo celular, de los cuales dependen las células para evitar la acumulación y propagación de errores genéticos durante la división celular<sup>26,31</sup>. En respuesta al daño en el DNA durante la interfase, al estrés replicativo durante la fase S o a un montaje incompleto del huso mitótico, puntos de control específicos arrestan o ralentizan el ciclo celular, mediante la inhibición de CDKs o del APC/CCDC20, promoviendo la reparación de estos daños o, en el caso de que sean irreparables, induciendo la muerte celular<sup>26,31</sup>. Los cuatro principales puntos de control del ciclo celular son (Figura 7):

- El **punto de control G1/S** (en la transición G1/S), se activa para prevenir la entrada a fase S en respuesta a señales inhibitorias del crecimiento, hipoxia o daño del DNA. La ataxia telangiectasia mutada (ATM) actúa de sensor, fosforilando Chk2. Éste una vez activo, induce la degradación de Cdc25A (fosfatasa activadora de CDK2), inactivándose así el complejo CDK2-cilinaE y quedando el ciclo celular transitoriamente arrestado en G1. Para hacer sostenido este arresto, ATM y Chk2 activan mediante fosforilación p53, promoviendo la transcripción del CKI p21<sup>26,31</sup> (figura 7-A).
- El **punto de control intra-S** (durante la fase S), se activa frente al estrés de la replicación del DNA. Durante este estrés, se produce la acumulación de DNA monocatenario (ssDNA, *single strain DNA*), el cual promueve la activación de la ataxia telangiectasia y Rad3 relacionada (ATR) y su efector Chk1. Chk1 induce la degradación Cdc25A (fosfatasa promotora de la activación de CDK2), y la activación de Wee1 (quinasa inhibidora de CDK2). Esta última, mediante fosforilaciones inhibitorias en CDK2, bloquea la progresión de la fase S<sup>26,31,32</sup>.
- El **punto de control G2/M** (en la transición G2/M), se activa para prevenir la entrada en fase M, en respuesta a una replicación incompleta del DNA o a daño en el DNA. ATM y ATR actúan como sensores promoviendo la activación de Chk1 y Chk2, los cuales promueven la degradación de Cdc25C (fosfatasa activadora de CDK1) y la activación de Wee1 y Myt1 (quinasas inhibidoras de CDK1). Estas dos últimas quinasas realizan fosforilaciones inhibitorias en CDK1 (en T14 y T15), bloqueando así la entrada en fase M<sup>26,31,32</sup> (figura 7-B).
- El **punto de control del huso mitótico** (durante la fase M, en la transición de metafase a anafase), se activa para asegurar que la repartición del DNA replicado es equitativa entre células hijas, evitando la segregación incorrecta de cromosomas. Cuando este punto de control se encuentra activo, forma un complejo que retrasa la salida de mitosis hasta que la repartición sea correcta. Cuando el arresto mitótico es muy prolongado las células desencadenan la muerte celular<sup>26,31,32</sup>.



**Figura 7. Vías moleculares de activación de los puntos de control del ciclo celular G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M.** Diagrama representativo esquemático de las vías moleculares de activación de A) el punto de control del ciclo celular G<sub>1</sub>/S y B) el punto de control del ciclo celular G<sub>2</sub>/M. S, interfase; G<sub>2</sub>, gap 2; M, mitosis; G<sub>1</sub>, gap 1. Creado con BioRender.com

La inducción de señales proliferativas sostenidas, que conllevan a una excesiva y continuada división celular, es una de las principales características de las células cancerosas. Éstas poseen una progresión de ciclo celular descontrolada donde, en la mayoría de casos, alguno de los puntos de control del ciclo celular ha de ser defectivo para que la célula llegue a ser cancerosa. Los estudios más recientes proponen que, más que una progresión incontrolada del ciclo celular, lo que conduce a la división celular continuada de estas células es la adquisición de mutaciones que les otorgan capacidades para evadir la apoptosis celular y comprometer la salida del ciclo celular, pese a la inestabilidad genética<sup>26,31</sup>. Una consecuencia importante de esta continua división celular es que muchas de estas células cancerosas se vuelven cada vez más dependientes de los mecanismos de control del ciclo celular restantes, para evitar la acumulación y propagación de una excesiva inestabilidad genómica. Conocer y caracterizar dichas dependencias puede ser una gran oportunidad para la mejora de las terapias mediante el desarrollo de nuevos tratamientos combinatorios<sup>26,31,33</sup>.

### 1.2.3. REPARACIÓN DEL DAÑO A DNA Y LAS CÉLULAS CANCEROSAS

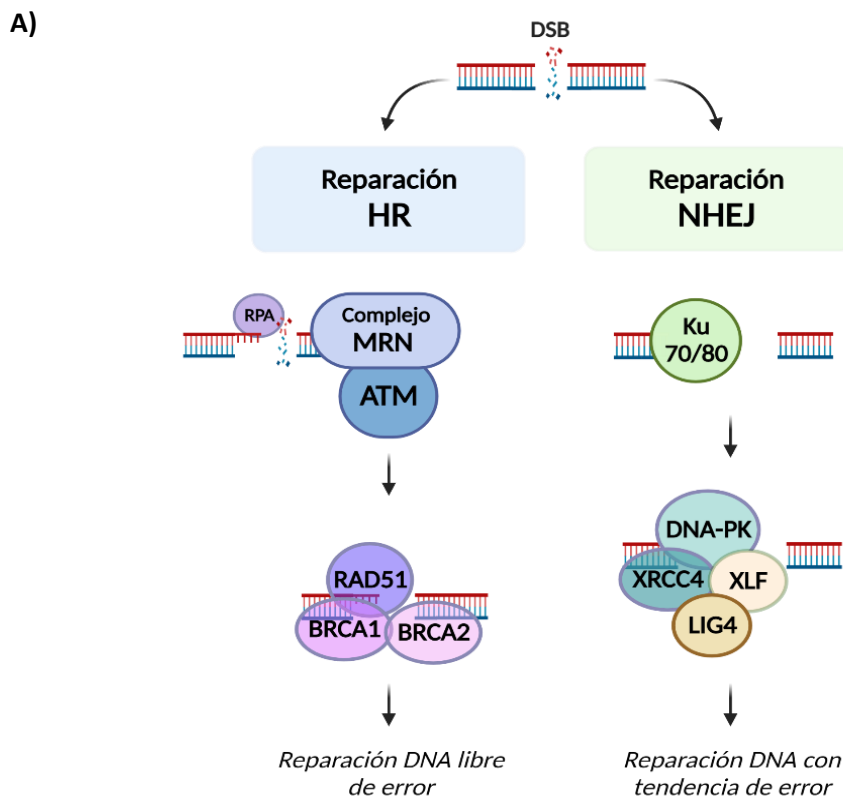
Las células están constantemente expuestas a daños endógenos y exógenos que afectan a la integridad de su DNA. Entre estos daños se encuentran desajustes de las bases del ADN introducidos durante la replicación del DNA; aductos de bases y enlaces cruzados generados por agentes químicos o luz ultra violeta; y roturas de cadena simple (SSB, *single-strand breaks*) o roturas de doble cadena (DSB, *double-strand breaks*), generadas a causa de la topoisomerasa abortiva, reacciones químicas o radiaciones ionizantes (IR)<sup>34,35</sup>. Con el fin de solventar estos daños en el DNA y transmitir sus genomas intactos a las células hijas, las células presentan diversos mecanismos de reparación asociados y complementarios entre ellos. En general, este estrés genotóxico del DNA y/o su disrupción induce inestabilidad genómica y elevada mutagénesis, que promueven la activación de los mecanismos de respuesta al daño del DNA (DDR, *DNA damage repair*). Los mecanismos de DDR, tras el reconocimiento de las lesiones del DNA, desencadenan una cascada de mecanismos para promover la reparación de dichas lesiones. Esta cascada se ayuda de una parada de la progresión celular, gracias a la activación de los puntos de control del ciclo celular<sup>34,35</sup>. Las células mamíferas presentan al menos 8 mecanismos de reparación del DNA diferentes para tratar de resolver multitud de diferentes lesiones genotóxicas, entre las que se encuentran el sistema de reparación del DNA por apareamiento erróneo (MMR, *mismatch repair*), la reparación por escisión de base (BER, *base-excision repair*), la reparación por escisión de nucleótido (NER, *nucleotide-excision repair*), síntesis de translesión (TLS, *translesion synthesis*), recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*), la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end joining*) y las vías de la anemia de Fanconi (FA, *Falconi anemia*) y la metiltransferasa de ADN O6-metilguanina (MGMT, *O6-methylguanine DNA methyltransferase*)<sup>34,35</sup>.

De todos los mecanismos de DDR, los empleados por las células para la reparación de daño DSB del DNA son la vía de HR y la de NHEJ. La vía de **HR**, es una vía de reparación del daño DSB libre de error y restringida a la fase S y G2 del ciclo celular, ya que emplean como molde para la reparación una cromátida hermana. En esta vía el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) se une al DSB, reclutando y activando ATM. Entonces, MRN produce la resección del extremo DSB para crear un extremo 3' de cadena simple (*ss, single-stranded*) que rápidamente es recubierto por las proteínas RPA (proteína de la replicación A). Las proteínas RPA acaban siendo sustituidas por la recombinasa Rad51 que, junto con otras proteínas como BRCA1 y BRCA2, forma un complejo que media la invasión en la cromátida hermana homóloga y permite la reparación libre de error del DNA (Figura 8). Por otro lado, la vía **NHEJ**, es una vía de reparación del daño del DNA DSB con tendencia a cometer errores, preferentemente usada en fases tempranas del ciclo celular en las que aún no hay disponibles cromátidas hermanas para usar de molde<sup>34,35</sup>. En esta vía, un heterodímero de las proteína Ku70/Ku80 se une a un extremo del DNA libre y recluta a la DNA-PKcs, que, una vez activada, media que las proteínas XRCC4, XLF y LIG4 realicen la alineación y ligación de los extremos DSB, independientemente de homología de secuencia (Figura 8)<sup>34-36</sup>.

Si los daños del DNA son extensivos y no pueden ser reparados, con el fin de mitigar su expansión, las células pueden optar por otras dos vías: salir permanentemente del ciclo celular (senescencia) o desencadenar la muerte celular programada (apoptosis), eliminando así las células mutadas potencialmente peligrosas<sup>34,35,37</sup>. Si los mecanismos de DDR fallan, quedándose



sin resolver estas lesiones en el DNA, y además, estas células son capaces de evadir los mecanismos de senescencia y apoptosis, puede producirse la acumulación de alteraciones genómicas. Esta acumulación hace que poco a poco las células vayan adquiriendo fenotipos más proliferativos y sobrevivientes, pudiendo llegar a convertirse en células tumorales<sup>34,35,37</sup>. De hecho, la importancia de la red de DDR para el mantenimiento del genoma y la prevención de la carcinogénesis se ve ilustrada en el hecho de que los genes que codifican para importantes componentes de las diferentes vías de DDR, son de los genes que mayores frecuencias mutacionales presentan en cáncer<sup>37</sup>. Sin embargo, las células tumorales necesitan de las capacidades residuales de reparación del DNA para sobrevivir al daño inducido por el estrés genotóxico, presentando dependencia de vías alternativas compensatorias. Esta observada dependencia, abre una posible diana terapéutica en las terapias antitumorales que exploten el sinergismo entre drogas inductoras de daño al DNA y la inhibición de las diferentes vías de DDR<sup>37</sup>.



**Figura 8. Vías moleculares de vías de reparación de daño DSB del DNA.** Diagrama representativo esquemático de las vías moleculares de reparación del daño DSB del DNA, HR y NHEJ. HR, recombinación homóloga; NHEJ, unión de extremos no homólogos. Creado con BioRender.com

#### 1.2.4. REPARACIÓN DEL DAÑO A DNA Y EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Pese a que algunos estudios sugieren que alteraciones en las proteínas del DDR podrían jugar un importante papel en la carcinogénesis endometrial y en su predicción, estas proteínas han sido muy poco estudiadas en relación al CE (excluyendo a las proteínas del complejo MMR, como MLH1, y la POLE, ambas empleadas para la clasificación molecular)<sup>11,38</sup>. Cada vez gana más fuerza el posible estudio de los componentes del DDR como potencial diana de terapias moleculares dirigidas en el CE<sup>11,38</sup>. Algunos estudios incluso proponen la evaluación del estado de combinaciones de genes de DDR como método pronóstico para mejorar las estrategias terapéuticas del CE<sup>39</sup>.

Actualmente se sabe que componentes fundamentales del DDR se encuentran alterados en el CE. De hecho, alteraciones en componentes como ATM o ATR han sido mayoritariamente encontradas en los casos de CE, observándose en un 18,7% y 12,1% de los casos, respectivamente<sup>40</sup>. También han sido observadas con elevada frecuencia en los casos de CE, alteraciones en chk1 (en un 3,8% de los casos), chk2 (en un 6,4%) y Wee1 (3,2%)<sup>40</sup>. Además, alrededor de un 15% de los casos de CENE presentan alteraciones en la vía de HRR y la pérdida de función de la vía de MMR se encuentra presente en un 28,6% de los CEE de bajo grado y un 54,3% de los CEE de alto grado, postulándose que estos pacientes podrían ser buenos candidatos para las terapias dirigidas contra las vías de DDR<sup>33</sup>. De manera que varios son los estudios clínicos actualmente activos en fases I/II, que evalúan el efecto de los inhibidores de los mecanismos de DDR en pacientes con CE. La mayoría de estos estudios se basan en el empleo de: inhibidores de la PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*), tales como Olaparib, Niraparib o Rucaparib; inhibidores de DNA-PK, como LY3023414; e inhibidores de ATR, como AZD6738. Todos ellos empleados con terapias complementarias<sup>33</sup>.

## 1.3. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA Y CÁNCER

---

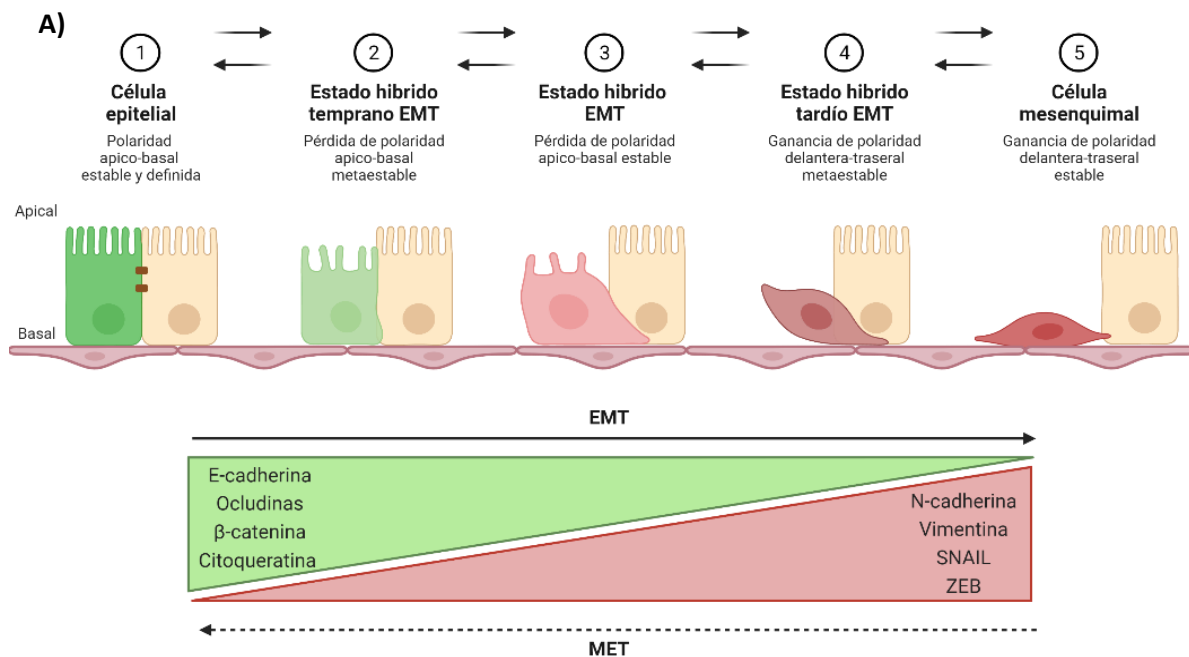
### 1.3.1. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

La **transición epitelio mesénquima (EMT, *epithelial mesenchymal transition*)**, es un conservado proceso morfogénico y molecular, por el cual las células epiteliales realizan una transición a estados mesenquimales. Para ello las células sufren diversos cambios entre los que se incluyen: la inducción de una pérdida de polaridad y de los contactos célula-célula; remodelaciones del citoesqueleto de actina que conducen a la elongación y movilidad celular debido a la formación de filopodios; y la adquisición de habilidades migratorias e invasivas, mediante la expresión de programas de genes de tipo mesenquimal<sup>41-43</sup>.

Las células epiteliales, no invasivas, se caracterizan por tener una fuerte polaridad ápico-basal que les confiere estabilidad, adherencia a la matriz y comunicación intercelular<sup>44</sup>. Esta polaridad viene establecida gracias a diversas y estrechas adhesiones célula-célula y célula-matriz tales como: **uniones estrechas**, que son las responsables de unir proteínas transmembranales al citoesqueleto y están compuestas por claudinas y ocludinas unidas a filamentos de actina; **uniones adherentes**, que son las responsables de uniones homofílicas entre células adherentes y están compuestas por  $\beta$ -catenina y cadherinas (de las cuales la E-cadherina es el componente central y su baja expresión se relaciona directamente con el EMT); **uniones Gap**, que proveen adherencia y permiten el paso de iones y están compuestas por complejos proteicos de conexina; **desmosomas**, que establecen conexiones puntuales entre células vecinas y están mediadas por desmogleínas y desmocolinas; y los **hemidesmosomas**, que establecen uniones focales fuertes entre las células y la matriz extracelular y están formados por integrinas<sup>44</sup>. A diferencia de éstas, las células mesenquimales presentan una polaridad antero-posterior y poseen uniones no estables, lo que les permite tener una mayor movilidad entre células<sup>44</sup>.

El EMT juega un papel fundamental en procesos como la morfogénesis y la formación de múltiples tejidos y órganos, pero también contribuye a la reparación celular y puede adversamente participar en la fibrosis de órganos y la progresión tumoral<sup>43,44</sup>. Una característica principal de la activación del proceso de EMT, es la pérdida de expresión de proteínas de uniones celulares características del fenotipo epitelial. Estas proteínas actúan no solo como proteínas de anclaje dando soporte a la estructura epitelial, sino que también regulan una serie de vías de señalización que al ser desreguladas pueden promover los fenotipos de EMT y la invasión<sup>45</sup>. A su vez, también se da un incremento de la expresión de genes mesenquimales como la N-cadherina, la fibronectina o la vimentina, proteínas críticas para la migración celular que actúan en la superficie celular (las dos primeras) o mediante la reorganización del citoesqueleto de actina en filamentos intermedios<sup>45</sup>. Estas transiciones facilitan la movilidad celular y la formación de nuevas protuberancias en la membrana, como los invadopodios, que junto al incremento de la expresión de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP), facilitan la degradación de la matriz extracelular. A su vez, también se da lugar a la formación de fibras de estrés de actina que incrementan la contracción celular. En conjunto, todas estas características dan lugar a la adquisición de comportamientos migratorios e invasivos por parte de las células<sup>45</sup>. Por lo que la pérdida de expresión de marcadores epiteliales y la ganancia de expresión de marcadores

mesenquimales es ampliamente usada como marcador de la transición EMT. Siendo la E-cadherina, ocludinas,  $\beta$ -catenina y citoqueratina los más comúnmente empleados como marcadores epiteliales y la N-cadherina, vimentina y metaloproteasas los más típicamente empleados como marcadores mesenquimales (Figura 9)<sup>41</sup>.



**Figura 9. Proceso de EMT.** A) Esquema representativo del proceso de EMT reversible y transicional, en el cual se aprecian los diferentes estados transicionales del proceso de EMT y los marcadores característicos de ambos fenotipos (epitelial y mesenquimal). Creado con BioRender.com

El EMT está regulado a diferentes niveles mediante: la integración de modificaciones epigenéticas (mediado por miRNA y modificadores de la cromatina como HDAC1 y 2 o SIN3A); la regulación transcripcional (siendo los factores de transcripción de mayor importancia SNAIL1, SNAIL2, ZEB1 and TWIST1); el *splicing* alternativo (mediado por ESRP1 y ESRP2); la estabilidad de proteínas (mediante ubiquitaciones y fosforilaciones); y localización subcelular de proteínas<sup>41-43</sup>. Además, muchas son las vías de señalización que participan en el desencadenamiento del EMT (entre las que se encuentran la vía de TGF $\beta$ , Wnt, Notch, NF $\kappa$ b o de las MAPK) y la mayoría conducen a la sobreexpresión de represores de marcadores epiteliales, tales como los genes *SNAIL*<sup>41-43</sup>.

El EMT es un proceso reversible, denominándose al proceso inverso transición mesénquima epitelio (MET)<sup>41</sup>. Además, los nuevos descubrimientos sobre el EMT han clarificado que el programa de EMT no es un “todo o nada”, no es un cambio entre dos únicos estados alternativos (mesenquimal o epitelial). Sino que se trata de un conjunto de estados transicionales múltiples y dinámicos, entre los fenotipos epitelial y mesenquimal, existiendo una plasticidad celular que

permite a las células estar en estados intermedios, bajo un EMT parcial (Figura 9)<sup>41,46</sup>. De hecho, en ciertos tumores de origen epitelial (tales como el de ovario, pulmón, mama o endometrio), dentro de un mismo tumor el proceso de EMT no es homogéneo. De tal manera, dentro de un mismo microambiente tumoral puede observarse un espectro de diferentes estados de EMT, en el que por ejemplo, mientras que el frente invasivo presenta una elevada ejecución de programas EMT, el cuerpo del tumor permanece fenotípicamente epitelial, existiendo un gradiente de fenotipos EMT<sup>41</sup>. Por ello, queda más o menos claro que, en la patogénesis del cáncer, las células neoplásicas en las fases más iniciales, se encuentran en un estado más similar al epitelial, y que a medida que se da la progresión tumoral, estas mismas células van adquiriendo gradualmente características mesenquimales<sup>47</sup>. Aunque rara vez los programas de EMT actúan como interruptores binarios, que alternan entre los extremos del espectro epitelial-mesenquimal, han sido notificados estudios en los que ciertos factores transcripcionales característicos del EMT se expresan constitutivamente. Sin embargo, cada vez es más evidente que estas observaciones solo se dan a nivel experimental como resultado de “artefactos experimentales”, y no a nivel fisiológico en los lugares de cicatrización de herida o en la progresión tumoral<sup>47</sup>. Además, se ha visto que no todos los tumores agresivos invasivos exhiben fenotipos de EMT, corroborándose la idea de que algunos tumores pueden presentar programas de EMT parciales o incompletos<sup>48</sup>.

Se han descrito importantes roles para el proceso de EMT y su plasticidad en diversas propiedades tumorales, tales como la invasión y metástasis, la adquisición de propiedades de células madre, la evasión inmune y la resistencia a la quimioterapia<sup>41</sup>. De todas ellas, como anteriormente se ha explicado, su relación con la invasión es la más ampliamente descrita. Sin embargo, su implicación en el resto de propiedades también puede ser de vital relevancia para la progresión tumoral. Por ejemplo, varios son los estudios que demuestran una asociación entre la transición EMT y la adquisición de propiedades similares a las de las células madre en diversos tipos de carcinomas, confiriéndoles propiedades de células madre cancerosas, que podrían facilitar la colonización de órganos distales<sup>49</sup>. Además, se ha visto que la transición EMT puede promover en las células tumorales epiteliales la expresión de varias moléculas inmunosupresoras que las hacen resistentes al ataque citolítico por parte de los linfocitos T CD8<sup>49</sup>. Finalmente, también ha sido descrito que en un contexto de neoplasia, el proceso de EMT puede elevar la adquisición de resistencias tanto a quimioterapias comúnmente empleadas como a terapias dirigidas, mediante la evasión apoptótica<sup>43,49</sup>.

Este rol tan importante del EMT en diferentes procesos relacionados con la progresión tumoral, sitúa a las terapias dirigidas contra las células residuales tumorales con programas de EMT activados, en el punto de mira de los tratamientos para los pacientes tumores metastáticos y recurrentes<sup>45</sup>. Varios son los estudios preclínicos que han testado moléculas inhibidoras pequeñas (SMI) contra vías de señalización asociadas al EMT<sup>45</sup>. Sin embargo, a la hora del diseño de nuevas terapias contra el proceso de EMT, hay que tener en cuenta la plasticidad celular de estos programas, valorando la posibilidad de que la reversión del EMT pueda desencadenar la recurrencia de células epiteliales ya diseminadas. Por lo que la opción más adecuada para este tipo de terapias, sería el uso de estas terapias anti-EMT en combinación con terapias conceptuales dirigidas contra las poblaciones tumorales epiteliales, combatiendo esta dinámica del proceso de EMT y la heterogeneidad tumoral<sup>45</sup>.

### 1.3.2. EMT Y CARCINOMA ENDOMETRIAL

En lo que respecta al CE, características distintivas de los programas de EMT han sido ampliamente descritas, asociándose con pronósticos adversos. Entre estas características se puede observar tanto la pérdida de expresión de E-cadherina, como de la inducción de sus represores.<sup>42,50</sup> Además, la activación, modulación y plasticidad de estos programas de EMT han demostrado tener un importante papel durante la invasión miometrial en el CE<sup>42</sup>.

Hurt et al. y Singh et al., describieron que elevados niveles de Zeb1 se encontraban relacionados con la progresión de los tumores ginecológicos<sup>50</sup>. Además, Kyo et al., observaron que el patrón de expresión de twist se daba preferentemente en las regiones marginales de los CE, y que éste se encontraba inversamente relacionado con la expresión de E-cadherina<sup>50</sup>. El factor transcripcional SNAIL, también se ha visto que juega un papel importante en el CE, correlacionándose además con la reducción de la expresión de receptor de estrógenos  $\alpha$ <sup>42,50</sup>. Por otro lado, varios son los estudios que han asociado la disminución de la expresión de E-cadherina, con incrementos de la  $\beta$ -catenina nuclear y la pérdida de receptor de estrógenos  $\alpha$ , adquiriéndose en estos tumores características más agresivas, especialmente de CE de alto grado<sup>42,50</sup>. Finalmente, también ha sido descrita la asociación entre niveles bajos de E-cadherina y la presencia de nódulos metastáticos en pacientes con CE<sup>42,50</sup>.

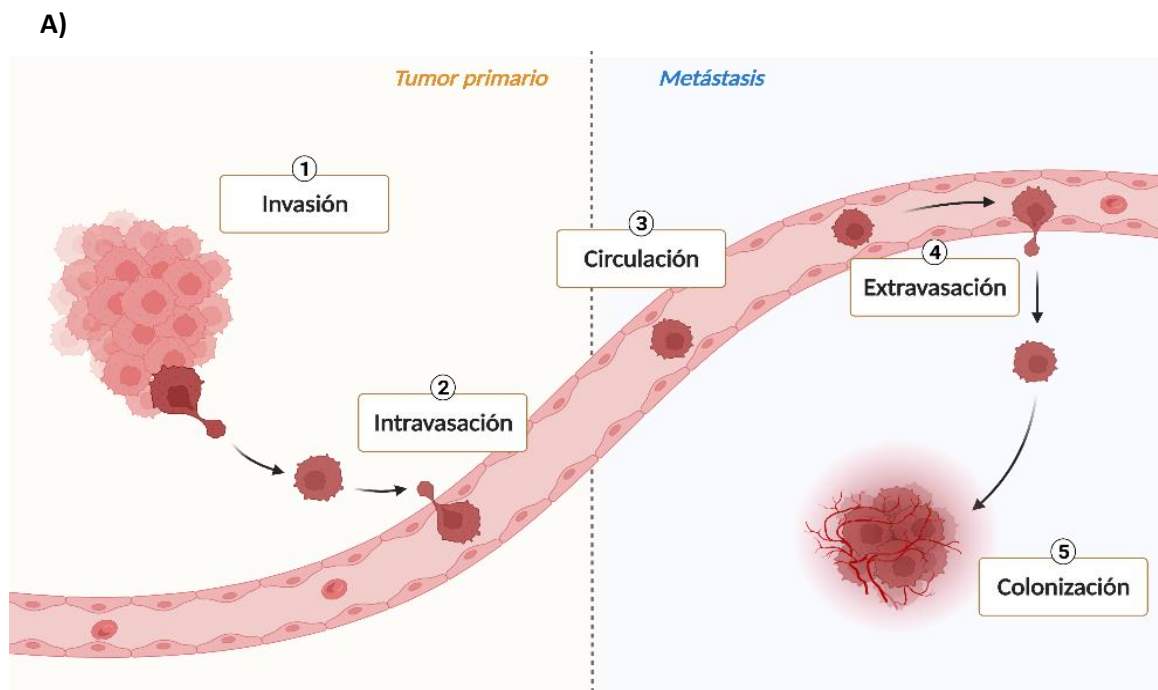
Además, otras alteraciones moleculares, no tan representativas pero relacionadas también con los procesos de EMT, han sido descritas en casos de CE. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de L1CAM muestra una correlación inversa con la expresión de E-cadherina, y que este hecho se encuentra asociado con peores pronósticos en las pacientes con CE<sup>42,50</sup>. También se ha observado que incrementos de BMI-1 en casos de CE contribuye a la adquisición de fenotipos invasivos vía EMT<sup>42,50</sup>.

Por lo que es evidente la relación existente entre los procesos de EMT y la adquisición de fenotipos más agresivos en los CE.

### 1.3.3. CASCADA METASTÁTICA, METÁSTASIS Y CARCINOMA ENDOMETRIAL

La activación del proceso de EMT ha sido relacionada con las células cancerosas, ligándola con la capacidad de diseminación de los tumores primarios, permitiendo la generación de metástasis en órganos distales<sup>41</sup>. La metástasis consiste en la diseminación de las células tumorales desde su localización y tumor de origen, a nuevas localizaciones donde forman tumores secundarios denominados metástasis<sup>51,52</sup>.

Para la formación efectiva de estas metástasis, las células han de pasar una serie de eventos secuenciales denominados cascada metastática. Durante la cascada metastática, las células tumorales deben adquirir cierta plasticidad, permitiendo la **invasión** del tejido mesenquimal subyacente, realizando la **intravasación** a los vasos sanguíneos y la **circulación** por el torrente sanguíneo, para finalmente realizar la **extravasación** y **colonización** de los órganos distales (Figura 10)<sup>41,46,53</sup>.



**Figura 10. Cascada metastática.** A) Esquema representativo del proceso de cascada metastática y sus diferentes fases: la invasión del tejido subyacente, la intravasación de los vasos sanguíneos, la circulación por el torrente sanguíneo, la extravasación y colonización en los tejidos distales. Creado con BioRender.com

La metástasis es responsable del mayor número de las muertes producidas en los pacientes con cáncer, observándose que cuando los tumores se expanden a órganos distantes la esperanza de vida decrece de manera extremadamente significativa<sup>51,52</sup>. A pesar de los avances en la detección y tratamiento de los tumores, en ocasiones, tras dichos tratamientos, existen células residuales diseminadas que permanecen presentes e indetectables debido a su pequeño tamaño, siendo una potencial fuente de recaída<sup>51,52</sup>. Este factor, junto con la complejidad del proceso de diseminación, hace que los principales retos para conseguir mejores resultados en la enfermedad metastáticas sean: 1) conseguir una mejor detección y cuantificación de la carga metastática durante los tratamientos (mejorando las técnicas de diagnóstico), 2) conseguir predecir que pacientes desarrollaran enfermedad metastática que se manifieste, 3) conseguir entender mejor los mecanismos que gobiernan las metástasis tumorales y 4) conseguir desarrollar terapias anti metastáticas más efectivas<sup>51,52</sup>.

En el caso del CE, el tumor puede diseminarse principalmente de tres modos: 1) por contigüidad (siendo ésta la vía más frecuente), infiltrando primero el miometrio y más tarde el cérvix, y pudiendo acabar metastatizando en la vagina, las trompas de Falopio o incluso en el recto o la vejiga; 2) por vía linfática (la cual es un poco menos frecuente), soliendo ser responsable de las metástasis ganglionares; o 3) por vía hemática (la cual es la más rara), que es la responsable de las metástasis a distancia, siendo pulmón el órgano más colonizado<sup>54,55</sup>. Aunque, a frecuencias



muy bajas, también se han observado la aparición de metástasis de CE en sitios atípicos como órganos intraabdominales, huesos, cerebro, pared abdominal o músculo<sup>56</sup>.

La mayoría de mujeres diagnosticadas con CE en estado avanzado o recurrente presentan un mal pronóstico. Las recurrencias locales o distales tras el tratamiento quirúrgico siguen siendo un gran problema en las pacientes con CE primario de alto riesgo<sup>56</sup>. El 64% de las recurrencias/metástasis ocurren en un plazo de 2 años alcanzándose el 87% de los casos a partir del tercer año posterior al tratamiento<sup>56</sup>. La media de supervivencia de las pacientes con CE metastático/recurrente es muy corta, situándose entre 12 y 15 meses en las mujeres con enfermedad medible<sup>57,58</sup>. Lamentablemente, la mayoría de terapias actuales para el CE metastático o recurrente se asocian a elevada toxicidad y eficacias limitadas. Por ello es extremadamente necesario el desarrollo de diagnósticos y terapias efectivas para el CE en estos estadios ya avanzados.

## 1.4. MICROAMBIENTE TUMORAL

---

### 1.4.1. ESTROMA ENDOMETRIAL Y FUNCIÓN DUAL DEL ESTROMA

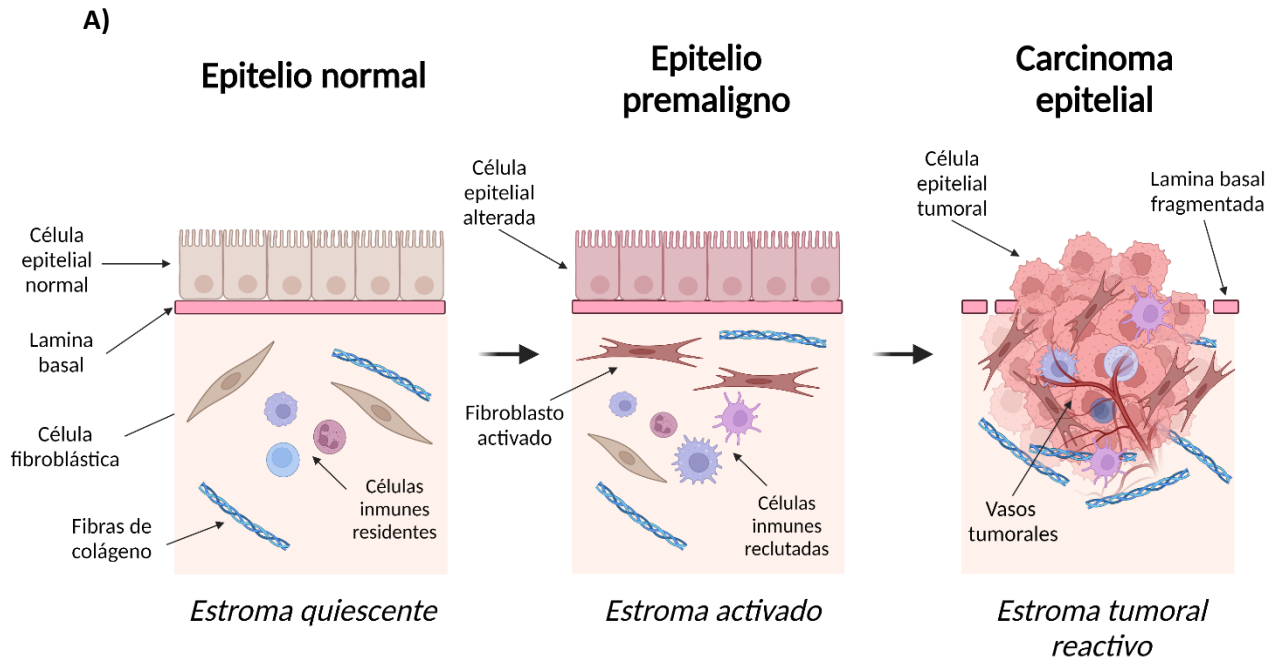
El estroma endometrial es el compartimento que proporciona el marco tisular conectivo y que constituye la parte más abundante del endometrio. Posee un importante papel en la proliferación y la remodelación endometrial, así como en la localización de las células inmunes periformes y en la ruptura endometrial durante el ciclo menstrual (bajo la estrecha regulación de los niveles de estrógeno y progesterona)<sup>59</sup>. Las células que constituyen el estroma endometrial son células pequeñas mesodérmicas principalmente de tipo fibroblástico que se encuentran junto con linfocitos, macrófagos, y vasos sanguíneos dispersos, soportadas estructuralmente por un componente no celular denominado matriz extracelular (ECM)<sup>60,61</sup>. Su morfología y agrupaciones puede variar en función de la fase del ciclo menstrual en la que se encuentre<sup>61</sup>.

En condiciones normales, los tejidos de los órganos intercambian múltiple información entre diferentes células, mediante contacto celular directo, citoquinas o la ECM. Estas señales son fundamentales para mantener la diferenciación celular y las complejas estructuras de los tejidos<sup>19,62,63</sup>. De hecho, una característica importante del estroma en un contexto normal es la generación y mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales, puesto que éstas reciben multitud de señales del medio que ayudan a mantener su superficie basal y mantenerse diferenciadas. La superficie basal de las células epiteliales está asociada con la membrana basal, una forma especializada de ECM que separa el compartimento basal del estromal dando soporte estructural y ayudando a la polarización. Esta capa es dinámica, y en función de su composición y características físicas, los diferentes factores solubles pueden ejercer diferentes efectos en las células epiteliales. Por lo que, una homeostasis en el microambiente es crucial para el mantenimiento de una correcta arquitectura tisular y el control de los posibles fenotipos malignos tempranos, pudiendo retrasar o incluso prevenir la tumorigénesis (Figura 11)<sup>19,62-64</sup>.

Sin embargo, durante la transformación premaligna de las células, la diferenciación celular de las células epiteliales cancerosas se ve comprometida y, aunque la membrana basal en esta fase sigue intacta, esta homeostasis celular entre los diferentes compartimentos se altera. De manera que las células estromales comienzan a ser activadas por medio de la secreción de factores de crecimiento moduladores del estroma (tales como VEGF, PDGF, EGFR o TGF $\beta$ ) (Figura 11)<sup>19,63</sup>.

De tal modo, en la progresión a carcinoma, esta cascada de activación paracrina por parte de las células cancerosas induce reacciones estromales como la vascularización o la respuesta inmune y promueve la activación de células estromales. Estas células estromales activadas a su vez reclutan y activan más células estromales, que a su vez generan más factores adicionales y proteasas, generándose un estroma tumoral activo que apoya la progresión y diseminación tumoral. Finalmente, tras esta activación estromal sostenida con presencia de proteasas, se produce la remodelación de la ECM, y con ella una degradación de la membrana basal que

permite un microambiente pro-migratorio y pro-invasivo de las células epiteliales (Figura 11)<sup>19,63</sup>.



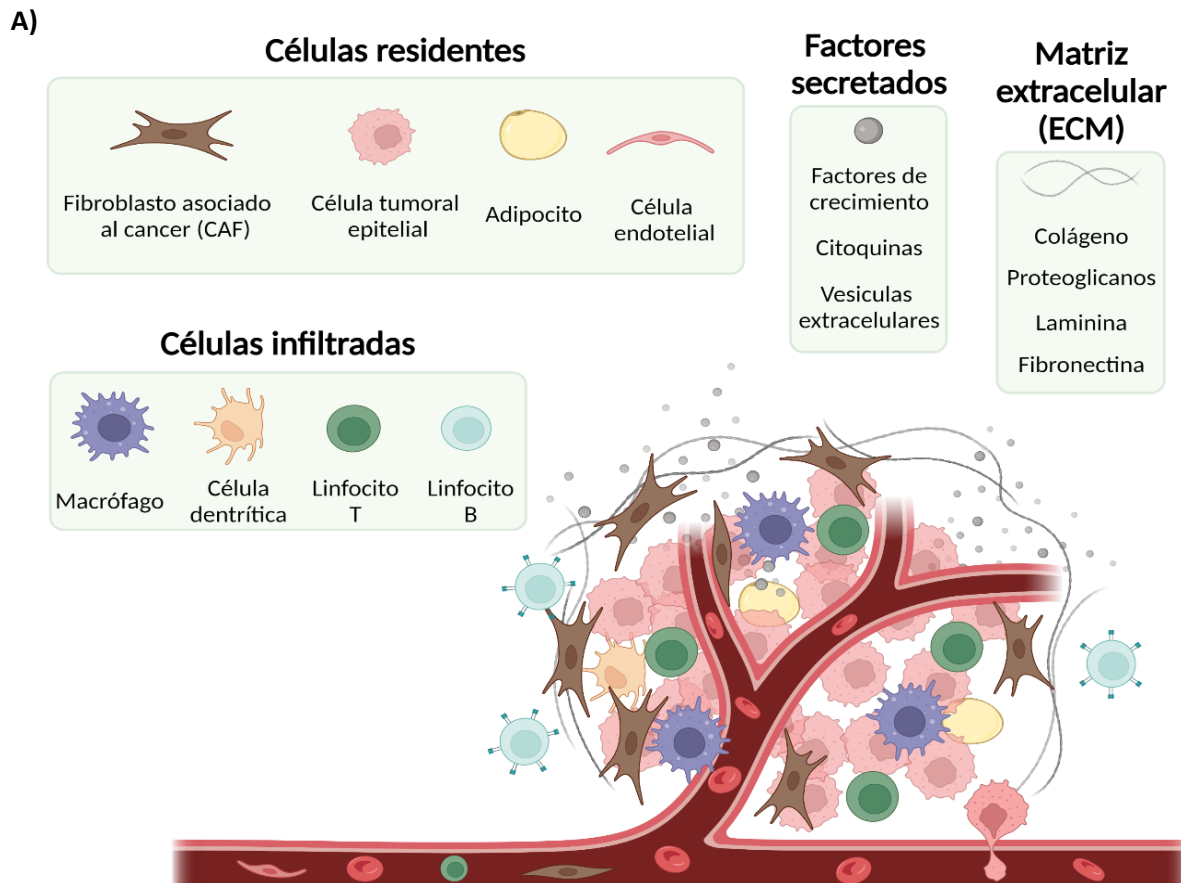
**Figura 11. Proceso de activación estromal.** A) Esquema representativo del proceso de activación estromal, en el cual se aprecia la pérdida de homeostasis tisular y las diferentes fases de la activación estromal tumoral desde el estroma quiescente de un tejido epitelial normal hasta el estroma tumoral reactivo generado en un carcinoma epitelial. Creado con BioRender.com

#### 1.4.2. MICROAMBIENTE TUMORAL: GENERALIDADES Y COMPONENTES.

Los tumores no son simplemente un grupo de células tumorales, sino que además están compuestos por una mezcla heterogénea de células residentes e infiltradas, factores secretados y EC. Todos estos componentes forman una entidad compleja y en continua evolución en la que se desarrolla el tumor, a la cual se le denomina microambiente tumoral (TME)<sup>65</sup>. El papel crítico del TME en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral ha sido planteado desde 1889, cuando Stephen Paget planteó la hipótesis de la “semilla y la tierra” (“*seed and soil*”), en la que sugiere que las células tumorales (la semilla) necesitan para crecer un microambiente favorable localizado en tejidos concretos (la tierra)<sup>19</sup>. Tal es la importancia otorgada en los últimos años al TME, que el tumor ya no es considerado como una masa de células cancerosas homogéneas, sino que se le reconoce con la complejidad de todas las diversas células que lo componen, llegando a ser incluido el TME como uno de las características representativas (“hallmarks”) del cáncer<sup>66,67</sup>.

La composición del TME varía en función del tipo de tumor, pero en general comúnmente están compuestos por: **células inmunes**, incluyendo linfocitos T y B, macrófagos asociados a tumores (TAM), células dendríticas (DC), células asesinas (NK, *natural killer*), neutrófilos y células mieloides supresoras (MDSC); **células estromales** tales como fibroblastos asociados al cáncer

(CAFs, *cancer associated fibroblast*), células endoteliales, pericitos, adipocitos y células mesenquimales estromales; la **ECM** (compuesta por colágenos, fibronectina, elastina y laminina); y otras **moléculas secretadas**, tales como factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, y vesículas extracelulares (Figura 12)<sup>65,67</sup>.



**Figura 12. Componentes del microambiente tumoral.** A) Esquema representativo de los componentes del microambiente tumoral conformado por células residentes, células infiltradas, factores secretados y matriz extracelular. Creado con BioRender.com

En el caso del CE, como en muchos tipos de tumores, se ha observado que el TME tiene una función muy importante en contribuir a la progresión tumoral. De hecho se ha visto que tumores primarios de CE, generados a causa de mutaciones en *PTEN*, *KRAS*, *TP53* e inestabilidad de microsatélite, no son capaces de progresar a carcinomas de alto grado o metástasis si no van acompañadas de un soporte favorable y pro-tumorogénico del TME<sup>19</sup>. Como ya se ha mencionado en puntos anteriores, la invasión y metástasis de las células de CE es una de las principales razones de los tratamientos fallidos y malos pronósticos de las pacientes con CE, por lo que la identificación de señales del TME promotoras de la progresión tumoral, podrían servir potencialmente como biomarcadores y posibles dianas terapéuticas del CE de alto grado metastático/recurrente, ayudando a la mejora de estos casos<sup>19</sup>.

## 1.5. FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER (CAF)

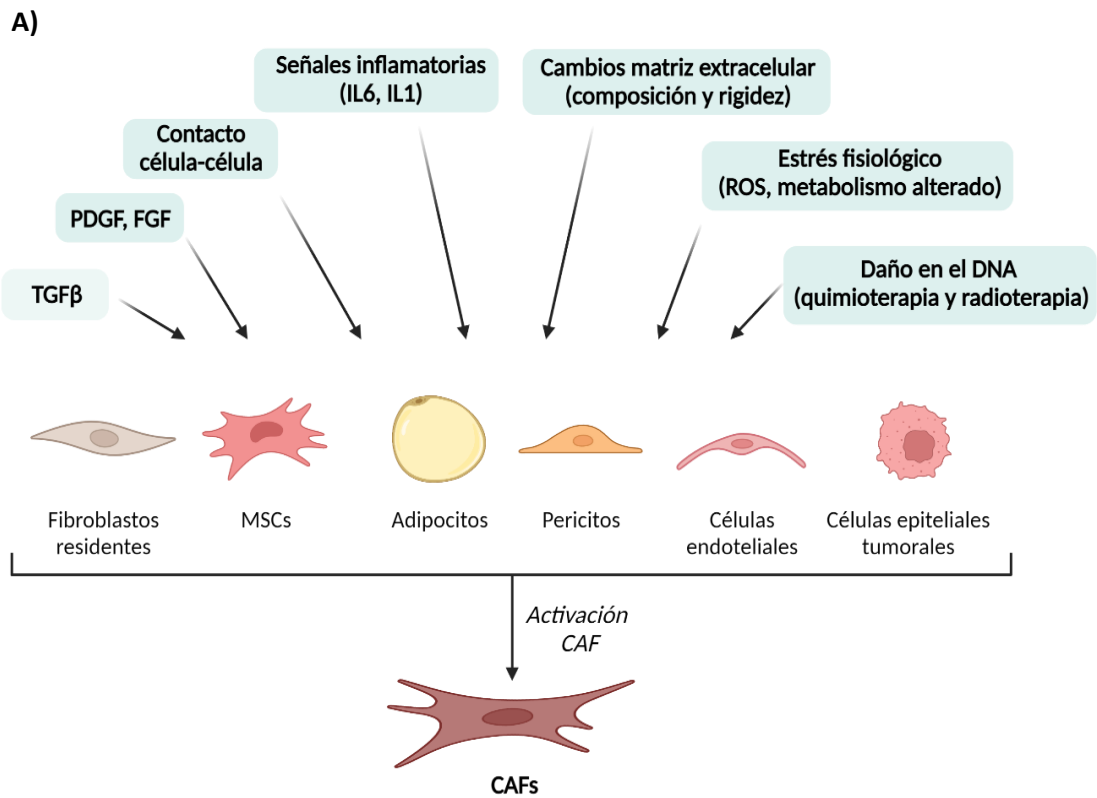
---

### 1.5.1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y ACTIVACIÓN DE LOS CAFs

Los CAFs son el mayor componente del estroma tumoral, y juegan un papel crítico en facilitar la interacción entre las células tumorales y el TME. Dentro del microambiente tumoral, los CAFs son los encargados de producir la mayoría de los componentes extracelulares, incluyendo entre ellos factores de crecimiento, citoquinas, diferentes enzimas y componentes de la matriz extracelular<sup>65,68</sup>. Tal es así, que estas células son primordiales en la relación del TME con las células tumorales, por medio de 4 caminos principalmente: 1) promoviendo la proliferación y metástasis tumoral, 2) promoviendo la neoangiogénesis, 3) remodelando la ECM, y 4) promoviendo la inmunosupresión tumoral. Además, proporcionan resistencia a las terapias antitumorales, impidiendo el acceso de los fármacos<sup>65,68,69</sup>.

Los CAF son un grupo heterogéneo de células altamente versátiles, plásticas y resilientes que se encuentran tanto en el tumor primario como en los focos metastáticos, y que poseen una clara implicación en la progresión tumoral<sup>65,68,69</sup>. Pese a su gran heterogeneidad, este grupo de células se caracterizan por: ser negativas para marcadores epiteliales, endoteliales y leucocitarios, y positivas para marcadores mesenquimales como la vimentina; presentar morfologías elongadas, en forma de huso; y carecer de las mutaciones encontradas en las células tumorales a las que soportan<sup>65,68,69</sup>.

La gran heterogeneidad de los CAF es contribuida a la múltiple cantidad de precursores celulares de los que puede proceder, tales como: fibroblastos residentes del tejido en estado quiescente (son la principal fuente de células precursoras de los CAF), células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (MSCs), adipocitos, pericitos, células endoteliales (que han sufrido transición endotelial a mesenquimal, EndMT) o células cancerosas bajo transición EMT (Figura 13)<sup>65,68,69</sup>. Aun así, el origen preciso de los CAF y sus subpoblaciones permanece elusivo. Esto es debido parcialmente a la amplia plasticidad funcional y fenotípica de estas células, y a su consecuente falta de biomarcadores de linaje bien definidos<sup>68,69</sup>. Pese a ello, existen una amplia variedad de marcadores intracelulares, extracelulares y de membrana empleados para aislar o identificar a los CAFs tales como  $\alpha$ -SMA (*Alpha Smooth Muscle Actin*), vimentina, FSP-1 (Proteína específica de fibroblastos), FAP (Proteína de Activación de Fibroblastos), PDGFR $\alpha$  y  $\beta$  (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), COL1A1, COL1A2 o LUM entre otros<sup>70,71</sup>. Además, nuevos marcadores de CAFs están constantemente siendo encontrados, gracias a la gran cantidad de estudios y a la actual implementación de nuevas tecnologías como el scRNA-seq<sup>70,71</sup>.



**Figura 13. Mecanismos de activación y origen de los CAFs.** A) Esquema representativo de los múltiples mecanismos que contribuyen a la activación de los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), así como de las potenciales células de origen de los CAF que han sido reportadas. MSC, células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. Creado con BioRender.com

En un estado fisiológico normal del desarrollo, los fibroblastos son los mayores productores de ECM. Los fibroblastos son células normalmente quiescentes, que pueden ser activados en respuesta a daño tisular, produciendo TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor-beta*) que desencadena la expresión de  $\alpha$ -SMA y la adquisición de fenotipos altamente contráctiles, estado en el cual se les denomina miofibroblastos<sup>63</sup>. También se ha observado que estos fibroblastos tienen capacidades de desdiferenciar células epiteliales vecinas, promover la angiogénesis, y coordinar la función del sistema inmune, por medio de la secreción de citoquinas. Así, queda demostrado que los fibroblastos, además de su típico rol en la producción de ECM, tienen importantes papeles en la comunicación intercelular, afectando tanto en la homeostasis celular como en la reparación tisular<sup>72</sup>. Teniendo en cuenta el papel que juegan los fibroblastos en la reparación y homeostasis tisular, es posible que rasgos característicos de las funciones de los CAFs, correspondan con las funciones fisiológicas de estos fibroblastos<sup>72</sup>.

Respecto a la activación y adquisición en los fenotipos CAF, se ha observado que muy rara vez son debido a alteraciones genéticas de los propios CAF, sino que existen señales bien caracterizadas que promueven esta activación y transformación. Entre estas señales destacan

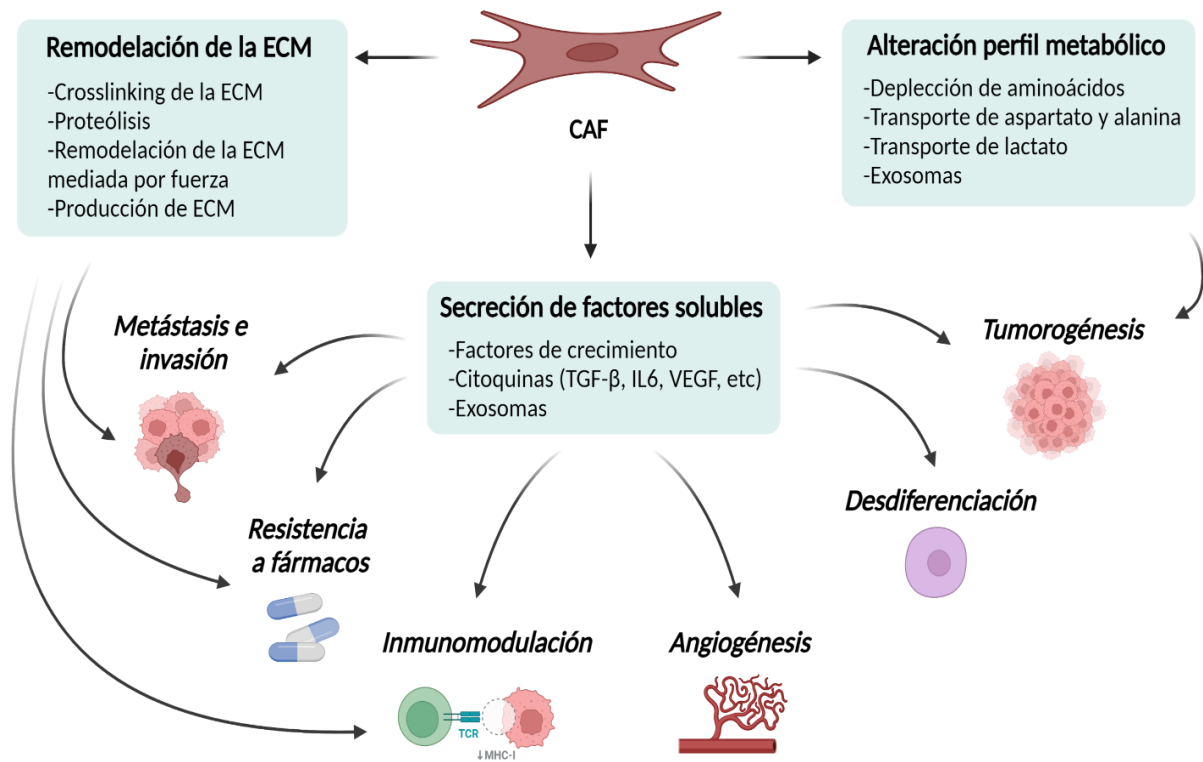
principalmente: 1) la activación de la vía de señalización de TGF- $\beta$ , que converge en la expresión de  $\alpha$ -SMA y la contractibilidad del citoesqueleto; 2) la secreción de PDGF, FGF y otros factores por parte de las células tumorales y estromales; 3) el contacto directo entre células tumorales y los fibroblastos; 4) señales inflamatorias por citoquinas moduladoras como IL1 o IL6; 5) cambios físicos de la matriz extracelular, tanto por la rigidez como por la composición; 6) la presencia de estrés fisiológico, tanto por la presencia de ROS (especies reactivas de oxígeno) como por alteraciones del metabolismo; o 7) la presencia de daño DSB del DNA, inducida por la quimioterapia y la radioterapia<sup>70-72</sup>. Estas señales son producidas tanto por las células tumorales como por las células estromales del entorno (siendo tanto paracrinas como autocrinas), y se producen de manera sostenida para una vez activado, mantener el fenotipo CAF y su función pro-tumoral (Figura 13)<sup>70-72</sup>.

### 1.5.2. FUNCIONES, SUBTIPOS Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Los CAFs son capaces de secretar una gran variedad de factores de crecimiento, citoquinas (tales como TGF- $\beta$ , IL6, VEGF o CXCL12), exosomas y diferentes tipos de proteínas (desde colágeno a metaloproteasas), que sostienen el crecimiento y la progresión tumoral mediante su implicación en una amplia variedad de funciones biológicas<sup>68,71</sup>. De tal modo, mediante la remodelación de la matriz (ya sea favoreciendo la rigidez de ésta, mediante la producción de matriz (estromagénesis), o favoreciendo su permisividad por medio de la secreción de proteasas (remodelación de la ECM)), la secreción de diversos factores solubles y la alteración del estado metabólico, los CAFs se encuentran involucrados en múltiples procesos pro-tumorales entre los que destacan: 1) la tumorigénesis, 2) la angiogénesis, 3) la metástasis e invasión, 4) la inmunosupresión, 5) la resistencia a fármacos y 6) el mantenimiento de fenotipos desdiferenciados (“cancer stemness”) (Figura 14)<sup>68,71</sup>.



A)



**Figura 14. Mecanismos de funcionamiento de los CAFs.** A) Esquema representativo de los múltiples mecanismos y funciones en los que se encuentran involucrados los fibroblastos asociados al cáncer (CAF,) y como contribuyen a la actividad pro-tumoral. ECM, matriz extracelular. Creado con BioRender.com

La gran diversidad de funciones y heterogeneidad atribuida a los CAFs presentaba la cuestión de si un solo tipo de CAF simultáneamente podía realizar todas estas funciones, o si por el contrario, existen diferentes subespecializaciones y la posibilidad de intercambiar entre estos diferentes estados<sup>68</sup>. Actualmente, existen una gran cantidad de pruebas que combinan una amplia variedad de ensayos funcionales con tecnologías de scRNA-seq, cuyos resultados señalan a una cierta especialización de los CAFs<sup>68</sup>. Varios son los grupos que han reportado distintas subpoblaciones de CAFs, con múltiples diferentes funciones dentro del TME y con perfiles de expresión variados en función del tipo tumoral, pero también con algunas firmas comunes entre ellos<sup>71</sup>. De hecho, existe una observación general y recurrente entre diferentes tipos tumorales, que separa los CAFs principalmente en dos subgrupos distintivos: los que presentan el denominado fenotipo **myoCAF**s (CAFs miofibroblásticos), localizados más próximos a las células tumorales, presentan un fenotipo contráctil y con capacidad de producir y remodelar la matriz, y una elevada expresión de TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA y COL1A; y los que presentan un fenotipo **iCAF** (CAF's inflamatorios), localizados en lugares más distales de a las células tumorales, presentan un secretoma proinflamatorio e inmunomodulador y expresan elevados niveles de IL-6, IL1 y CCL2<sup>68,73</sup>. Sin embargo, se ha observado que existen poblaciones de CAFs que pueden presentar fenotipos combinados de myoCAF e iCAF, indicando que estas subpoblaciones de CAFs no se

encuentran fijas en estados diferenciados, si no que tienen capacidades potenciales de presentar plasticidad y conversión entre los diferentes estados<sup>70</sup>. Tal es la heterogeneidad de los CAFs, que además de la clara función pro tumoral que poseen, recientes estudios han descrito que en algunos casos pueden llegar incluso a presentar un rol antitumoral en función del contexto<sup>72</sup>. Estos CAFs con efectos inhibidores del tumor, se encuentran en el TME en estados tempranos del desarrollo tumoral, actuando como un mecanismo de defensa para retener el crecimiento tumoral en las fases más tempranas de la tumorigénesis<sup>74</sup>. De igual manera, fibroblastos normales presentes en el TME en estadios tempranos del crecimiento tumoral, han sido relacionados con propiedades antitumorales<sup>74</sup>. Aun así, pese a compartir una amplia gama de características, existen claras diferencias respecto a las características moleculares y grados de efecto antitumoral, entre estos fibroblastos normales y los CAF antitumorales<sup>74</sup>. En base a la clara heterogeneidad y dinámica espaciotemporal de los CAFs, los diferentes subtipos de CAFs identificados, han sido postulados como “estados transicionales” en vez de como tipos celulares.

Debido a las importantes funciones que desempeñan los CAF en la progresión tumoral, esta población estromal y sus funciones son una prometedora estrategia para las terapias antitumorales. Además, debido a la evidente diversidad de los CAFs, las nuevas terapias dirigidas estromales proponen la caracterización del perfil de los CAFs de los pacientes de manera individualizada, con tal de ofrecer unos tratamientos más personalizados. Durante la pasada década, han sido desarrollados muchas terapias que poseen como diana terapéutica los CAFs, cuyas estrategias principales se basan en: 1) la depleción directa de CAFs (usando marcadores de superficie relacionados con los CAF como  $\alpha$ -SMA o FAP); 2) la reprogramación de CAFs a fibroblastos quiescentes, reduciendo la progresión tumoral y haciendo a las células tumorales más susceptibles a los tratamientos (con compuestos como el ATRA o la Vitamina D); 3) actuando contra las interacciones entre los CAFs y el microambiente de alrededor, por medio del bloqueo de las señales de activación de los CAF (inhibiendo IL6, IL1, TGF- $\beta$  o PDGFR), el bloqueo de las señales producidas por los CAF para remodelar el sistema inmune (inhibiendo compuestos como la IL-33 que transforma macrófagos de M1 a M2), o mediante el ataque contra la ECM derivada de los CAF, deprivando así a las células de su nicho protector (con por ejemplo enzimas degradadoras del ácido hialurónico)<sup>70</sup>.

### 1.5.3. CAFs Y CÁNCER DE ENDOMETRIO

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, el CE de alto grados o metastático ha sido asociado con cambios sustanciales del TME<sup>49</sup>. En comparación con otros tumores sólidos, el endometrio uterino presenta una abundante composición estromal, que se encuentra dispuesta incrustando las glándulas epiteliales. Por ello el estroma endometrial juega un papel fundamental en el TME del CE, a la hora de contribuir a la agresividad tumoral y la resistencia a fármacos<sup>75</sup>. Ha sido descrito que, en el CE, la activación de los CAFs conduce a un incremento de expresión de los marcadores  $\alpha$ -SMA, FAP, FSP1 y vimentina<sup>76,77</sup>. Varios son los estudios que demuestran los efectos funcionales de los CAFs en la progresión tumoral del CE de manera tanto paracrina como autocrina, por medio de la secreción de diversos factores e induciendo la modulación de diversas vías tales como PI3K/Akt o MAPK/ERK y la actividad de metaloproteasas como MMP2 y MMP9<sup>76,77</sup>. De tal manera, es clara la relación entre los CAFs y las células

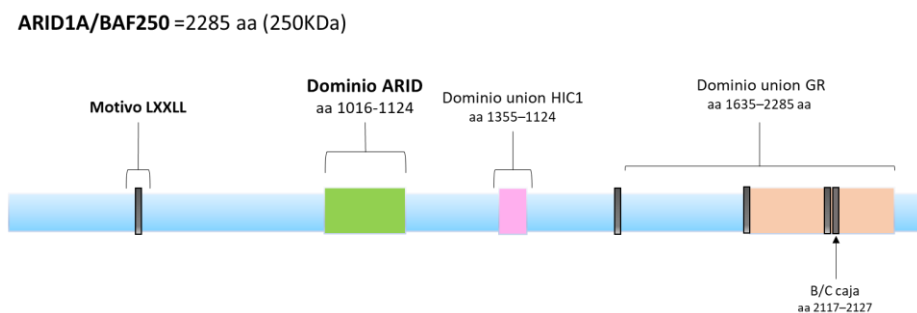
tumorales en el CE, resaltándose la relevancia traslacional que las terapias basadas en los CAFs pueden tener en este tipo de tumores<sup>75</sup>. Sin embargo, son muy limitados los conocimientos sobre la implicación de los CAFs en relación a su heterogeneidad, origen, marcadores y subpoblaciones, en el CE<sup>75</sup>. Por lo que, teniendo en cuenta la arquitectura típica del endometrio cuya población estromal se sitúa extremadamente próxima a las glándulas epiteliales, así como los estudios que describen la implicación de los CAFs en el CE, es indudable el papel que los CAFs juegan en la evolución de las células tumorales endometriales. Por lo que es remarcable la necesidad de adquirir un mayor conocimiento y caracterización sobre los CAFs en el CE<sup>75</sup>. Ya que, a pesar del potencial rol que los CAFs pueden jugar en la progresión y agresividad del CE, y pese a que en otros tipos tumorales el papel que juegan los CAFs ha sido ampliamente estudiado, su rol dentro del TME del CE se encuentra relativamente poco estudiado, existiendo muy pocos estudios que analicen sus mecanismos y funciones<sup>75,78,79</sup>. Dada la creciente importancia del papel del TME en el CE, el incremento de investigaciones para mejorar y ampliar la comprensión de la activación, señalización y funciones de las CAFs en el CE, podría ser de vital importancia para las pacientes con CE.

## 1.6. ARID1A

### 1.6.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

ARID1A también conocida como BAF250, p270 o SMARCF1, es una proteína perteneciente a la familia de proteínas acarreadoras del dominio de unión a DNA altamente conservado llamado ARID (*dominio de interacción rico en AT*), el cual interacciona con el DNA de una manera no específica de secuencia<sup>80-83</sup>. Por otro lado, el dominio C-terminal de ARID1A, presuntamente de elevada importancia por permitir las interacciones proteína-proteína, contiene múltiples copias del conocido dominio LXXLL, el cual facilita la interacción entre proteínas. Pese a que ARID1A está implicada en numerosas interacciones proteína-proteína, la más ampliamente conocida y estudiada es aquella que le hace formar parte del complejo remodelador de la cromatina *SWItch / Sacarosa no fermentable* (SWI/SNF), siendo la subunidad más importante de dicho complejo<sup>80-83</sup>(Figura 15).

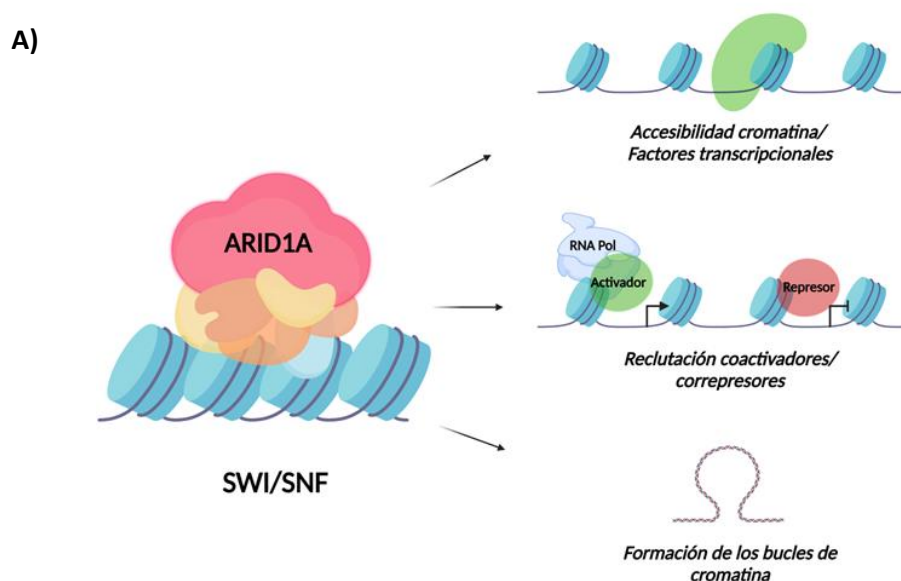
A)



**Figura 15. Estructura de la proteína ARID1A.** A) Imagen esquemática del mapa de la estructura de ARID1A, destacándose los dominios de putativas interacciones.

El complejo SWI/SNF es un complejo remodelador de la estructura de la cromatina dependiente de ATP (Adenosín Trifosfato), por lo que mediante el empleo de energía procedente de la hidrólisis del ATP, provoca la rotura de las interacciones histona-DNA, movilizand así los nucleosomas y alterando la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al DNA<sup>84,85</sup>. Son varias las actividades atribuidas a este complejo que podrían contribuir a la regulación transcripcional, incluyéndose entre ellas: la modulación de la accesibilidad a la cromatina y la unión de factores de transcripción; el reclutamiento de complejos coactivadores o correpresores con actividad modificadora de histonas; y la facilitación de la formación de los bucles de cromatina necesarios para aproximar ciertos promotores con sus potenciadores distales (Figura 16)<sup>81</sup>. ARID1A forma parte de la subfamilia del complejo SWI/SNF BAF (*BRG1-associated factor*). Éste complejo está compuesto por más de 15 subunidades y de todas ellas ARID1A es una de las subunidades

encargadas de la unión directa al DNA, además SWI/SNF posee un núcleo funcional formado por una subunidad ATPasa (SMARCA2 o SMARCA 4) y tres subunidades adicionales que potencian dicha actividad (SAMRCB1, SMARCC1 y SMARCC2) <sup>80-83</sup>.



**Figura 16. Actividades complejo SWI/SNF.** A) Imagen esquemática de las actividades atribuidas al complejo SWI/SNF remodelador de la cromatina.

### 1.6.2. ARID1A EN CÁNCER

Estudios de secuenciación del genoma del cáncer, revelan la existencia de una gran frecuencia de mutaciones en los genes que codifican para los componentes del complejo SWI/SNF, presentando dicho complejo una frecuencia mutacional estimada del 20% de todos los cánceres humanos <sup>80-83</sup>. Dentro de este porcentaje, la subunidad que más frecuentemente mutada se encuentra es ARID1A, encontrándose afectada en un elevado porcentaje de casos en diferentes tipos de cáncer (Tabla 3) <sup>83</sup>. Todas estas mutaciones de *ARID1A* se encuentran distribuidas a lo largo de toda la secuencia de del gen y suelen ser inactivadoras (deleciones o mutaciones *nonsense*), desencadenando, de manera general, en una pérdida de expresión de proteína de ARID1A detectable por ensayos de inmunohistoquímica <sup>82,86,87</sup>. Aunque no está del todo definida la función de ARID1A en la progresión tumoral, son varios los estudios que sugieren un importante papel para ARID1A en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular, tres procesos primordiales en la supresión tumoral. En base a estas líneas de evidencia, ARID1A ha sido postulado como un gen supresor tumoral <sup>86</sup>. Además, pese a que normalmente las mutaciones de los genes supresores normalmente suponen alteraciones de ambos alelos, en el caso de ARID1A la mutación en solamente uno de los dos alelos causa la pérdida de funcionalidad de ARID1A indicando una haploinsuficiencia genética <sup>88</sup>.

Sin embargo, otras líneas de investigación postulan un rol mucho más complejo para ARID1A en su participación en la tumorigénesis, en función del contexto tumoral <sup>80</sup>. Por un lado, estudios realizados en algunos tipos de carcinomas como ovario indican que la pérdida de ARID1A *per se*,

no es suficiente para iniciar el desarrollo tumoral, requiriéndose de la aberración complementaria de otras vías moleculares implicadas en carcinogénesis para que se de dicha iniciación<sup>89</sup>. Mientras que, por otro lado, algunos estudios realizados en carcinomas como el de colon, ovario o hígado postulan que ARID1A podría incluso llegar a tener una función oncogénica bajo condiciones específicas de contexto, pudiendo desempeñar un importante papel en la formación tumoral durante las fases tempranas del desarrollo tumoral<sup>80</sup>. Sugiriéndose así, un rol contexto-dependiente para ARID1A en la formación y desarrollo tumoral.

Tipo de tumor	% de mutación de ARID1A
Carcinoma hepatocelular	10-17%
Carcinoma de ovario de célula clara	46-57%
Carcinoma de ovario endometriode	30%
Carcinoma endometrial de bajo grado	47%
Carcinoma endometrial de alto grado	60%
Carcinoma de colon	10%
Carcinoma gástrico	10%

**Tabla 3. Frecuencia de mutación de ARID1A en diferentes tipos de cáncer humano.** Porcentaje de mutación de ARID1A en diferentes tipos de cáncer humano. Adaptado de Xu and Tang, 2021.

Aun así, y a pesar de este posible rol para ARID1A en la iniciación de la carcinogénesis en ciertos contextos, la mayoría de estudios relacionan, en una amplia variedad de cánceres, la existencia de una pérdida de expresión de ARID1A con procesos pro-tumorales. Numerosos estudios en diversos modelos tumorales han elucidado varios mecanismos subyacentes a la supresión tumoral relacionados con la pérdida de función de ARID1A, tales como implicaciones en la vía PI3K/AKT, en el ciclo celular, en la señalización de la regularización hormonal, en la proceso de EMT, en los puntos de control inmunológicos o en la reparación del DNA<sup>80,87</sup>.

Actualmente, debido el efecto crítico como supresor tumoral demostrado para ARID1A, numerosos nuevos estudios se basan en el análisis del estado mutacional de ARID1A para la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Estos trabajos se centran principalmente en terapias dirigidas basadas en la estrategia de letalidad sintética. Conceptualmente, este tipo de

estrategias se basan en un escenario en el que la pérdida de función de dos genes por separados permite la viabilidad celular, pero la pérdida concurrente de ambos conduce a la letalidad celular. Múltiples posibles dianas han sido ya encontradas en relación al perfil mutacional de ARID1A (tales como PARP, ATR, EZH2, HDAC6 o PI3K) con posibles candidatos en ensayos clínicos desarrollándose actualmente. Postulándose así el perfil mutacional de ARID1A como un potencial biomarcador para la medicina de precisión de los cánceres relacionados. Aun así, en base al complejo rol observado por parte de ARID1A, es necesario la realización de nuevos estudios que exploren los mecanismos moleculares relacionados con ARID1A en los diferentes estadios de la carcinogénesis y en diferentes tipos de cánceres<sup>80,83,87</sup>.

### 1.6.3. MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE ARID1A EN CÁNCER

Debido al complejo rol de ARID1A en la tumorigénesis, varios son los grupos que han desarrollado modelos murinos knock-out condicionales para estudiar los efectos de la inactivación de ARID1A *in vivo*<sup>87</sup>. Estos modelos han sido de gran utilidad tanto para la generación de modelos preclínicos empleados para corroborar la eficacia de nuevas terapias, como para proporcionar información sobre las funciones de ARID1A en determinados contextos (revelando que ARID1A posee roles oncogénicos muy específicos del contexto).

Sun et al., en 2017 mediante el empleo del modelo transgénico condicional knock-out *Ubc-CreER<sup>T</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, con pérdida específica de ARID1A en **hígado**, definieron que en hígado ARID1A puede tener tanto funciones pro-tumorales (retrasando su pérdida la iniciación tumoral) como antitumorales (acelerando su pérdida la progresión y diseminación metastática), en función del contexto en el que se encuentre<sup>87,90</sup>. También en 2017, Mathur et al., mediante el empleo del modelo *Vil1-CreER<sup>T2</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* con pérdida específica de ARID1A en **colon**, descubrieron que en colon la pérdida de ARID1A derivaba a la formación de tumores invasivos (presentando una función antitumoral), pero que en determinados contextos dicha pérdida retrasaba la iniciación tumoral (observándose una función oncogénica)<sup>91</sup>.

En cuanto a los modelos murinos de ARID1A de cánceres ginecológicos, Guan, et al. en 2014 mediante el empleo de un modelo *AdCre; Arid1a<sup>ff</sup>*, con pérdida específica de ARID1A en **ovario**, demostraron que la pérdida de ARID1A no era suficiente *per se* para promover la tumorigénesis del carcinoma de ovario. Sin embargo, cuando la pérdida de ARID1A en ovario coexistencia con mutaciones en otros oncogenes, dicha pérdida resultaba en fenotipos tumorales de mayor agresividad<sup>89,92</sup>. Al contrario de estos resultados, en 2016, Zhai et al., demostraron que la pérdida de ARID1A desencadenada en la adquisición de fenotipos epiteliales y mejores ratios de supervivencia en modelos de adenocarcinoma endometriode de ovario, mediante el empleo del modelo de *Arid1a, AdCre; Arid1a<sup>ff</sup>*<sup>93</sup>.

Todos estos modelos vuelven a poner de manifiesto el complejo rol e implicación de ARID1A en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral.



#### 1.6.4. ARID1A EN EL CARCINOMA ENDOMETRIAL

Las mutaciones de *ARID1A* son frecuentemente encontradas entre mujeres con carcinoma endometrial, observándose con una frecuencia mutacional de alrededor del 40% en CEE de bajo grado, la cual se ve elevada hasta alrededor de un 60% en los casos de CEE de alto grado. Por el contrario, la presencia de alteraciones de *ARID1A* en los CE serosos se reduce drásticamente a solamente un 11% de los casos. Además, el proyecto del TCGA confirmó que *ARID1A* se encuentra alterado en una alta proporción en los CE de tipo I o endometriode (Tabla 2), concretamente en los subgrupos de POLE hipermutado, MSI hipermutado y de bajo número de copias<sup>80,94</sup>.

Estas elevadas ratios de mutaciones de *ARID1A* identificadas en los CE, junto con que se han descrito asociaciones significativas entre la reducción de expresión de *ARID1A* y menores rangos de supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con CE, evidencian un importante rol para *ARID1A* en la carcinogénesis endometrial<sup>95</sup>. Postulándose así a *ARID1A* como un buen marcador pronóstico del CE.

Sin embargo, de igual manera que en los carcinomas mencionados anteriormente, se estipula un papel más complejo para *ARID1A* en cuanto a su participación en el desarrollo y progresión del CE en función del contexto y circunstancias en el que se encuentre. Por un lado, algunos estudios revelan una escasez de alteraciones de *ARID1A* en lesiones pre cancerosas endometriales en comparación con las observadas en casos de CEE. Teniendo en cuenta el papel pro-tumorogénico observado para *ARID1A*, estos datos sugieren que *ARID1A* podría estar jugando un importante rol en la iniciación y transformación tumoral de estas lesiones pre malignas, a través de mutaciones somáticas inactivadoras<sup>95</sup>. Además, en concordancia con estos resultados, varios estudios que comparan zonas endometriales con lesiones pre malignas, asocian la pérdida de expresión de *ARID1A* con transformaciones malignas y una posterior concurrencia en CE<sup>96</sup>. Postulándose así, que *ARID1A* posee un importante rol en al inicio de la tumorogénesis.

Por otro lado, estudios recientes han encontrado que los endometrios humanos afectados con endometriosis (una enfermedad hormono-dependiente inflamatoria del endometrio) presentan una elevada carga de mutaciones en *ARID1A* en este tipo de tejidos en comparación con el epitelio sano<sup>97</sup>. Teniendo en cuenta que la endometriosis muy rara vez progresa a CE, estos resultados sugieren que las mutaciones en *ARID1A*, no son suficientes para liderar la transformación a CE en dichos tejidos. De hecho, en muestras de CE humanas, las mutaciones en *ARID1A* suelen coocurrir junto con mutaciones en *PI3K* o *PTEN*, sugiriendo que podría ser necesaria la presencia de defectos en estas vías que colaboren con la pérdida de *ARID1A*, para la promoción de la progresión tumoral<sup>87</sup>. Además, como aliciente de esta idea, un reciente estudio en el cual se realizó la secuenciación de 98 biopsias de tumores primarios junto con la de sus metástasis pareadas, demostró que mientras que en la mayoría de tumores primarios el estado de *ARID1A* se mantenía intacto, sus clones metastáticos presentaban mutaciones deletéreas de éste. Esta gran heterogeneidad filogenética sugería que *ARID1A* se encontraba involucrado en la progresión tumoral, más que en su iniciación<sup>98</sup>. Por lo que, estos estudios

suscitan la idea de que ARID1A posee un importante papel en el desarrollo de los tumores previamente establecidos.

De tal modo, la realización de estudios para entender el rol preciso de ARID1A en la iniciación/progresión tumoral del CE podría ser de vital importancia para la mejora del diagnóstico y desarrollo de tratamientos a medida, con tal de realizar un mejor diagnóstico y gestión de los pacientes con CE.

## 1.7. HISTONA DEACETILASA 6

### 1.7.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La histona deacetilasa 6 (HDAC6) pertenece a la clase IIb de las HDACs. Se trata de la única HDAC predominantemente localizada en citoplasma y con especificidad de sustrato por proteínas no histonas<sup>99,100</sup>. HDAC6 es el miembro de las HDACs con mayor número de residuos y el único que posee dos dominios catalíticos totalmente funcionales y un dominio de dedo de zinc C-terminal (dominio ZnF-UBP) con alta afinidad por la ubiquitina, además de una secuencia de exportación nuclear (NES) y un dominio para la retención citoplasmática (SE14) (Figura 17)<sup>52</sup>. Se ha descrito que mediante la modulación de la acetilación reversible de múltiples sustratos, HDAC6 interactúa con varias proteínas relacionadas con la migración celular, la respuesta inmune, la transcripción proteica, la proliferación celular, la muerte celular, la degradación de proteínas y las vías de respuesta de estrés<sup>52</sup>. Debido a su peculiar estructura, sus sustratos diana y sus funciones biológicas, el rol de HDAC6 ha sido estudiado en numerosas enfermedades tales como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades inflamatorias<sup>99,101</sup>.

#### A) HDAC6 =1216 aa (131KDa)



**Figura 17. Estructura de la proteína HDAC6.** A) Imagen esquemática del mapa de la estructura de HDAC6, destacándose los dominios de putativas interacciones. NLS, secuencia de localización nuclear; NES, secuencia de exportación nuclear; CD, dominio catalítico; SE14, tetrapéptido con Ser-Clu; UBP, dominio de dedo de zinc de unión a ubiquitina.

### 1.7.2. HDAC6 Y CÁNCER

HDAC6 es un componente clave regulador de varias vías de señalización pro-tumorogénicas y su expresión se encuentra incrementada en varios tipos de cáncer, convirtiéndose así en una viable diana terapéutica para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales<sup>99,100</sup>. Se ha descrito que HDAC6 está involucrado en la supervivencia y la transformación maligna de las células tumorales

de ovario y mama, por medio de la activación de la vía de las MAPK<sup>99,102,103</sup>. Por ello se postula que HDAC6 juega un importante papel tanto en la transformación oncogénica como en el mantenimiento de los fenotipos ya transformados. Además, existe una clara relación entre los niveles de HDAC6 y la predisposición de padecer metástasis en algunos tipos de cáncer como el de mama<sup>99</sup>. De hecho, varios son los estudios que describen la implicación de HDAC6 en la formación de metástasis por medio de diversos procesos como la regulación de las invadopodias, la degradación de la matriz extracelular o la inducción de los procesos de EMT<sup>104-106</sup>.

También se ha demostrado un papel esencial de HDAC6 en la modulación del sistema inmune en relación al cáncer, por medio de la alteración de la expresión de antígenos asociados a tumores, proteínas MHC de clase I, moléculas co-estimuladoras o citoquinas<sup>103</sup>.

Finalmente, además de todas estas implicaciones, HDAC6 también tiene una gran implicación en la supervivencia celular de varios tipos de tumores, promoviendo la evasión de la apoptosis por medio de su actuación en proteínas implicadas en las vías apoptóticas, tales como p53 (inhibiendo su función apoptótica) o Ku70 (promoviendo su función en la reparación del DNA y evasión apoptótica)<sup>100,105,107</sup>.

Esta clara implicación de HDAC6 en numerosas funciones biológicas relacionadas con la agresividad de las células tumorales, ha hecho que HDAC6 se considere una prometedora diana para las terapias antitumorales. Numerosos son los estudios que proveen evidencias de la eficacia del empleo de inhibidores de HDAC6, tanto solos como en combinación con otros agentes, en diversos tipos de cáncer tales como mama, melanoma u ovario<sup>99,100,108</sup>. En los últimos años, múltiples inhibidores selectivos han sido diseñados y varios de ellos han sido seleccionados para ser probados en ensayos clínicos (tales como ACY-1215 (Ricolinostato), ACY-241 (Citarinostato) o KA2507). Los resultados de todos estos ensayos en conjunto, sugieren que la inhibición de HDAC6 en combinación con otros agentes quimioterapéuticos podrían mostrar prometedores resultados en el tratamiento tumoral. Sin embargo, pese a ver demostrado no producir ningún tipo de toxicidad, todavía ninguno de ellos ha sido aprobado para la clínica<sup>103,109</sup>.

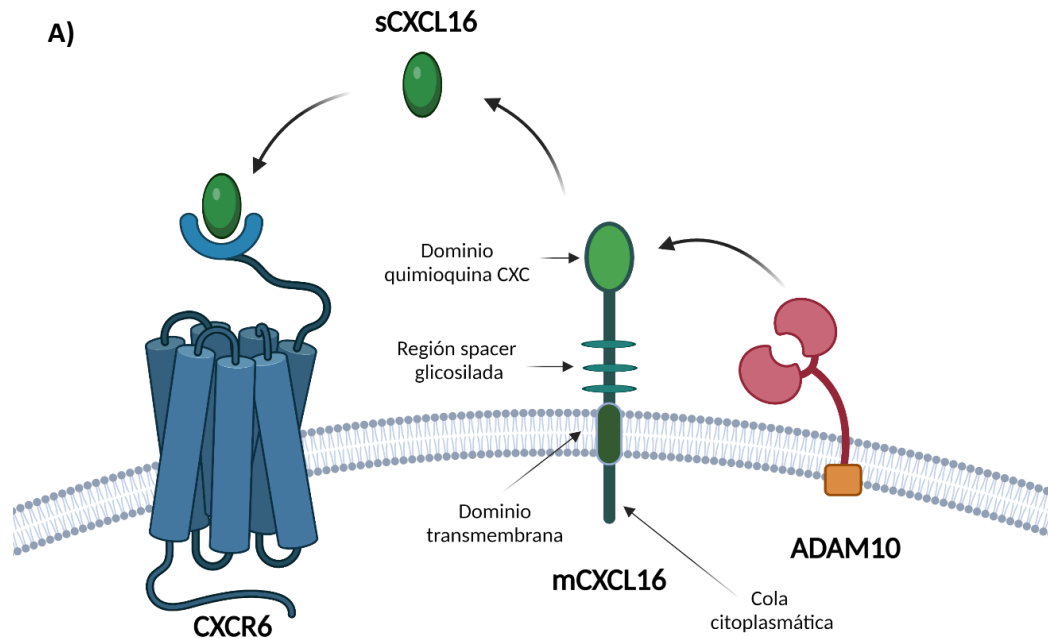
Varios son los estudios preclínicos, *in vitro* e *in vivo*, que han identificado que las HDACs parecen estar implicadas en la **tumorogénesis del CE**, y estar relacionadas con CE de alto grado con peores pronósticos y menores supervivencias<sup>110</sup>. Por lo que los inhibidores de HDACs (HDACIs) representan prometedores agentes terapéuticos para las pacientes con CE. En particular, los HDACIs han mostrado tener efectos sinérgicos en combinación con agentes quimioterapéuticos tradicionales en ensayos preclínicos con células de CE<sup>110</sup>. No obstante, es necesario la realización de ensayos clínicos que demuestren su eficacia y seguridad de estos inhibidores en tratamientos con pacientes de CE. Aun así, pese a esta implicación de las HDACs en el CE y el rol de la HDAC6 en diversos tipos tumorales, muy poco hay descrito sobre la implicación de HDAC6 en el CE. Zheng et al., son los únicos que mediante estudios preclínicos sugieren que HDAC6 juega un papel crítico en el desarrollo del CE, relacionando su sobreexpresión con fenotipos de mayor agresividad y peores pronósticos de las pacientes con CE<sup>111</sup>.

## 1.8. LIGANDO DE QUIMIOCINA CON MOTIVO C-X-C 16 (CXCL16)

---

### 1.8.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las quimioquinas son una superfamilia de citoquinas quimiotácticas que cuenta con alrededor de 50 miembros y 20 receptores de quimioquinas asociados, jugando todos ellos papeles muy importantes induciendo la migración y activación de las células en diversos procesos biológicos como la regulación del sistema inmunitario, la embriogénesis, la angiogénesis, la organogénesis, el desarrollo tumoral y la cascada metastática<sup>112-114</sup>. Los sistemas de receptores de quimioquinas han sido relacionados extensamente con las células neoplásicas apreciándose en particular su involucración en la invasión<sup>112</sup>. CXCL16 es la quimioquina más grande del grupo CXC, componiéndose de 254 aa en humanos y 246 en ratones (presentando una homología de casi el 70% entre ambas especies)<sup>113,115</sup>. CXCL16 es una de las dos únicas quimioquinas que se encuentran tanto de forma soluble (sCXCL16) como transmembrana (mCXCL16)<sup>113,115</sup>. mCXCL16 con un peso molecular de 60 KDa, presenta además de una pequeña cola citoplasmática, un dominio quimioquina CXC y un dominio transmembranas, separados ambos por una región spacer de aproximadamente 100 aa que se encuentra altamente glicosilada<sup>113</sup>. Después de que mCXCL16 sea cortada específicamente por la desintegrina y metaloproteasa 10 (ADAM10), el dominio quimioquina (de 35 KDa) es liberado convirtiéndose en un factor soluble de CXCL16 (sCXCL16) (Figura 18)<sup>113</sup>. Ambas formas tienen diferentes funciones, mientras que la forma soluble sCXCL16 actúa como quimioquina y es la responsable de la quimiotaxis de las células que poseen el receptor CXCR6 (Chemokine C-X-C-Motif Receptor 6), la forma transmembrana mCXCL16 tiene propiedades de adhesión con células que expresan CXCR6<sup>113</sup>.

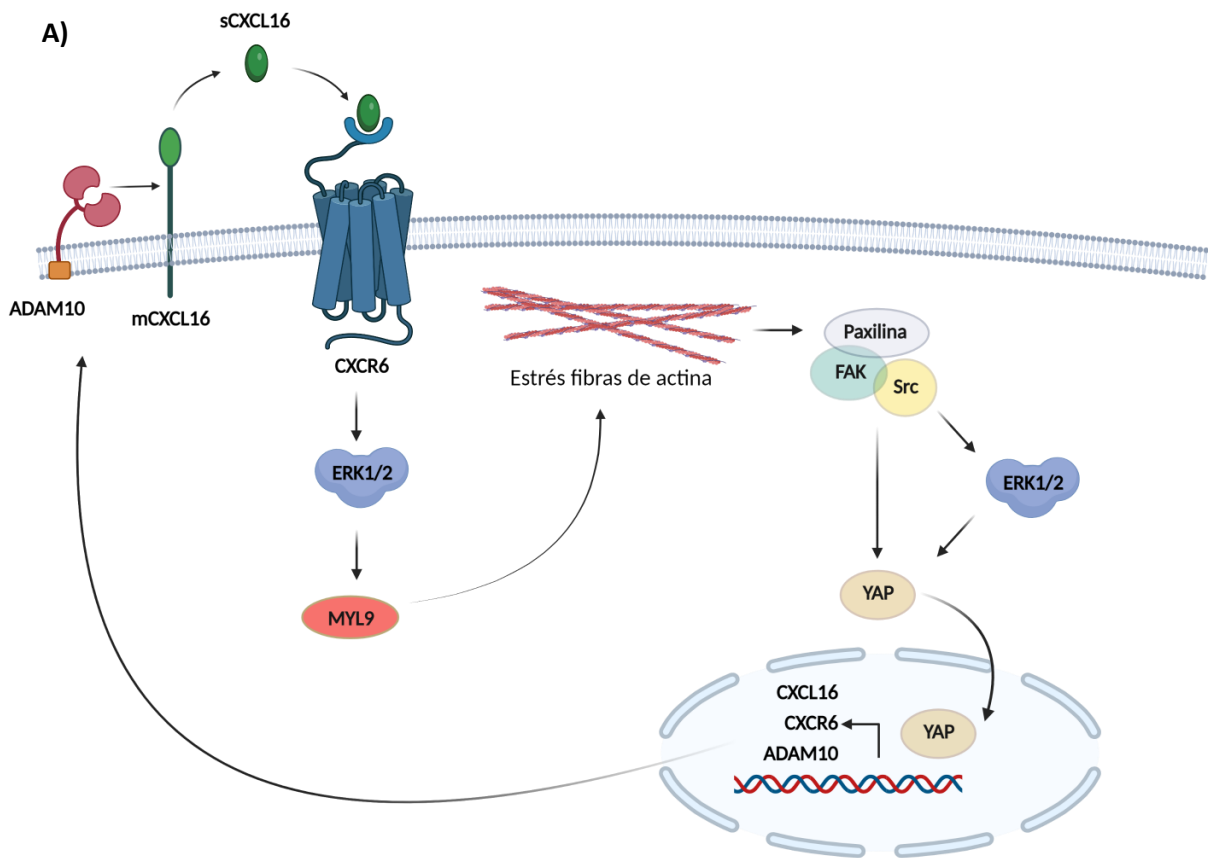


**Figura 18. Eje CXCR6/CXCL16/ADAM10.** A) Esquema representativo de la forma soluble (sCXCL16) y transmembranal (mCXCL16) de la quimioquina CXCL16, así como de su receptor único CXCR6 y la metaloproteasa ADAM10 asociada a la generación de la forma soluble de CXCL16. Creado con BioRender.com

El receptor de quimioquinas CXCR6, también conocido como Bonzo, STRL33 o TYMSTR, es el único receptor de quimioquinas que reconoce CXCL16<sup>113</sup>. CXCR6 requiere de la subunidad G $\alpha$ i para la transducción de señal y una vez activo se encarga de dirigir la activación de múltiples vías de señalización entre las que destacan la señalización por calcio, la vía PI3K/Akt y la vía de las MAPK/ERK<sup>113</sup>.

En especial, ha sido ampliamente descrito que la activación de la vía CXCR6/CXCL16 promueve la migración e invasión de varios tipos de células tumorales basándose en la activación de la vía MAPK/ERK, la cual promueve la activación de RoA. La activación de RhoA a su vez induce la contractilidad basada en la actomiosina y a la reorganización del citoesqueleto de actina a través de la fosforilación de MLC (cadena ligera de miosina), generándose estrés de las fibras de actina<sup>112,113,116</sup>. Esta tensión generada con el citoesqueleto de actomiosina, genera la activación de adhesiones focales, mediante la activación de la vía fosfo-paxilina/FAK/Src. Ésta, a su vez, provoca la activación y traslocación nuclear de YAP/TAZ, tanto directamente como por medio de la vía de las MAPK/ERK<sup>117-119</sup>. Por último, la activación de YAP además de promover la migración celular, la activación de CAFs y la sobreexpresión de metaloproteasas como MMP2, MMP9 y ADAM10, también induce la sobreexpresión y secreción de CXCL16, generándose así

un bucle de retroalimentación positiva, que conduce a una activación robusta y sostenida de esta vía CXCR6/CXCL16 (Figura 19)<sup>119,120</sup>.



**Figura 19. Eje CXCR6/CXCL16/ADAM10 y activación de la vía paxilina/FAK/Src.** A) Esquema representativo del bucle de retroalimentación positiva formado entre el eje CXCR6/CXCL16 y la vía paxilina/FAK/Src, promoviendo la activación de YAP. Creado con BioRender.com

## 1.8.2. CXCL16 Y CÁNCER

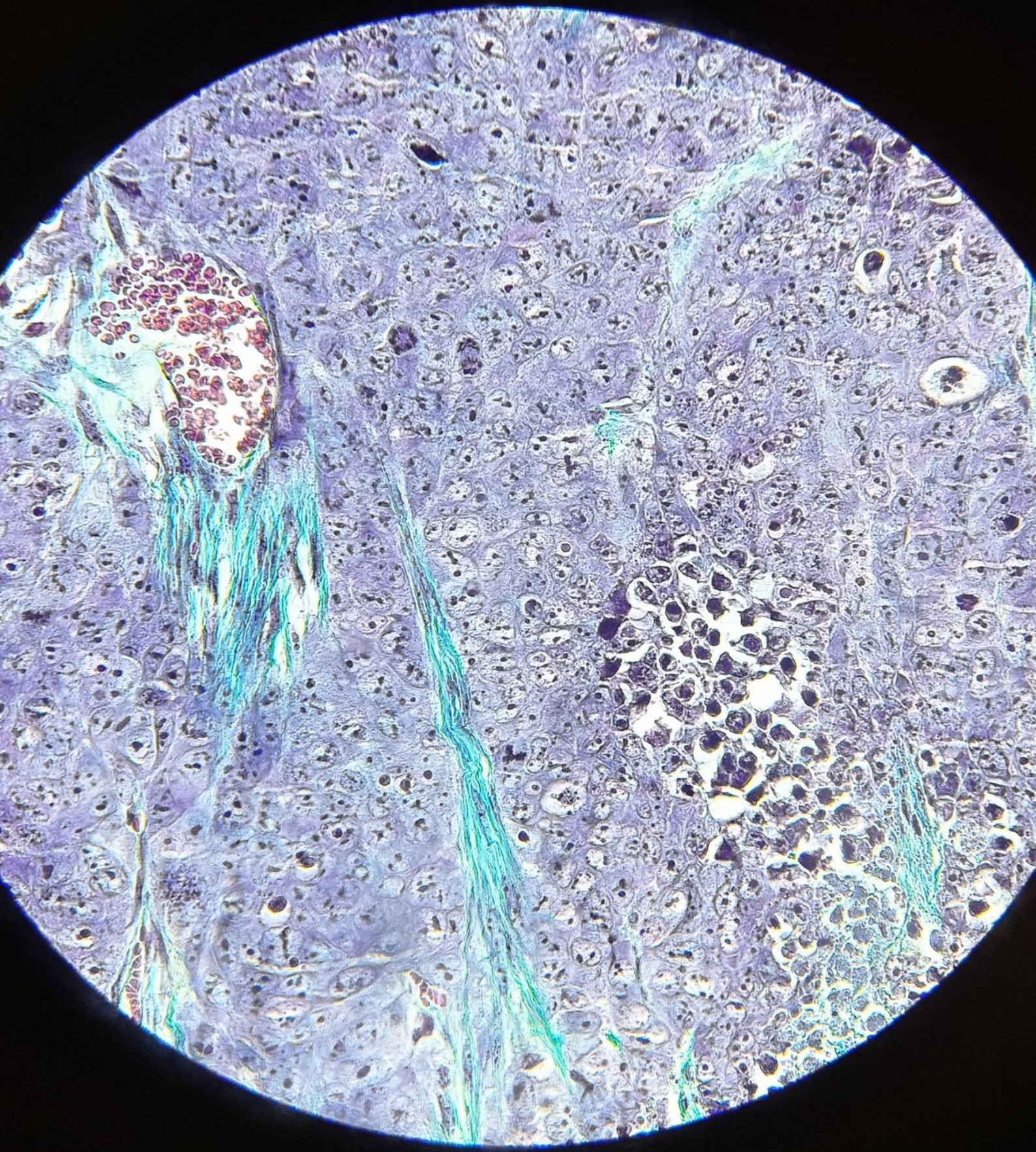
La influencia de CXCL16 en el microambiente tumoral ha sido demostrada, observándose una elevada expresión de CXCL16 y CXCR6 tanto en las células tumorales como en las células de TME, en numerosos tipos de cánceres humanos entre los que se incluyen el cáncer de páncreas, el de tiroides, el de mama o el glioblastoma<sup>113,115</sup>. Diversos factores han sido descritos que pueden promover la expresión de CXCL16, entre los que encontramos: la desregulación de la vía de Notch, KRAS o YAP; la expresión de TNF $\alpha$  y algunos miRNAs; la hipoxia; la radiación; o incluso el microbioma<sup>115,120</sup>. Además, varios son los estudios que correlacionan la expresión de CXCL16/CXCR6 con una mayor agresividad tumoral<sup>114</sup>. Se han descrito implicaciones de CXCL16 en diversos procesos pro-tumorales como: la activación de CAFs; la inducción del proceso EMT y desarrollo de metástasis; la resistencia a terapias; la remodelación de ECM (mediante la promoción de expresión de MMP2, MMP9 y ADAM10); la angiogénesis (promoviendo la expresión de VEGF e IL8); o la modulación del sistema inmune potenciando la evasión del sistema inmune en el tumor<sup>113-115</sup>. Sin embargo, también han sido reportadas funciones

antitumorales de CXCL16, por medio de la atracción de linfocitos infiltrantes del tumor antitumorales, en concreto de las denominadas células NKT (natural killer T) cuya acumulación favorece la regresión tumoral<sup>115</sup>.

En general, muchos estudios relacionan la sobreexpresión del eje CXCL16/CXCR6 con la existencia de peores pronósticos y niveles más bajos de supervivencia en diversos tipos tumorales como el de colon, páncreas, próstata, riñón o mama<sup>114</sup>. Además, varias son las evidencias que soportan que la expresión de CXCL16 podría ser usada como marcador pronóstico<sup>113-115</sup>. Sin embargo, el impacto de la expresión de CXCL16/CXCR6 en la supervivencia puede diferir notablemente entre diferentes tipos de cáncer, sugiriendo que las funciones de esta vía podrían ser dependientes altamente de contexto<sup>113-115</sup>.

En el caso del CE, escasos estudios existen sobre la relación entre CXCL16 y el desarrollo del CE. Pese a ello, si ha sido demostrado que el incremento de la expresión de CXCL16 en el tumor, se relaciona con una disminución de la supervivencia global de las pacientes<sup>113</sup>. Una caracterización más exhaustiva del rol de CXCL16 en la tumorigénesis es necesaria, puesto que todos estos resultados sugieren que CXCL16 podría tratarse de una potencial diana para el diagnóstico y el tratamiento del CE.







## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*“Ningún gran descubrimiento se ha conseguido sin haber hecho antes una audaz suposición”*

**Isaac Newton**



## 2.1. HIPÓTESIS

---

El tratamiento del CE en estadios avanzados supone un gran desafío biomédico debido a la baja efectividad de los tratamientos actuales. Actualmente, se sobreentiende que las metástasis o recurrencias no ocurren al azar, si no que existe un componente intrínseco del tumor primario que define estos fenotipos agresivos. Además, está demostrado que la activación del TME posee un papel fundamental e imprescindible para la progresión de estos fenotipos tumorales agresivos.

ARID1A presenta una tasa de mutación muy elevada en los CE, aunque su papel en la tumorigénesis endometrial es hoy en día un punto de discusión.

Sobre estas bases, la finalidad de la presente tesis es el estudio de los mecanismos moleculares que se dan en los CE con pérdida de expresión de ARID1A, a nivel de la iniciación tumoral y/o la progresión tumoral, así como su efecto en el TME endometrial, con el fin de mejorar la predicción, prevención y generación de nuevos tratamientos para las pacientes con CE que presentan mutaciones de ARID1A.

## 2.2. OBJETIVOS

---

Con el fin de elucidar esta hipótesis los objetivos de la tesis fueron divididos en dos:

### OBJETIVO 1. DESCRIBIR EL PAPEL DE ARID1A EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN TUMORAL DEL CE.

**Objetivo 1.1.** *Analizar los efectos de la pérdida de ARID1A en un contexto endometrial normal, estudiando si es un evento iniciador de la tumorigénesis endometrial.*

**Objetivo 1.2** *Analizar los efectos de la pérdida de ARID1A en un contexto oncogénico previamente establecido, estudiando si confiere al tumor primario existente una modificación adaptativa de mayor malignidad.*

**Objetivo 1.3.** *Estudio de las vías moleculares alteradas en los CE con pérdida de expresión de ARID1A, con tal de descubrir las vías implicadas y desarrollar posibles estrategias terapéuticas.*

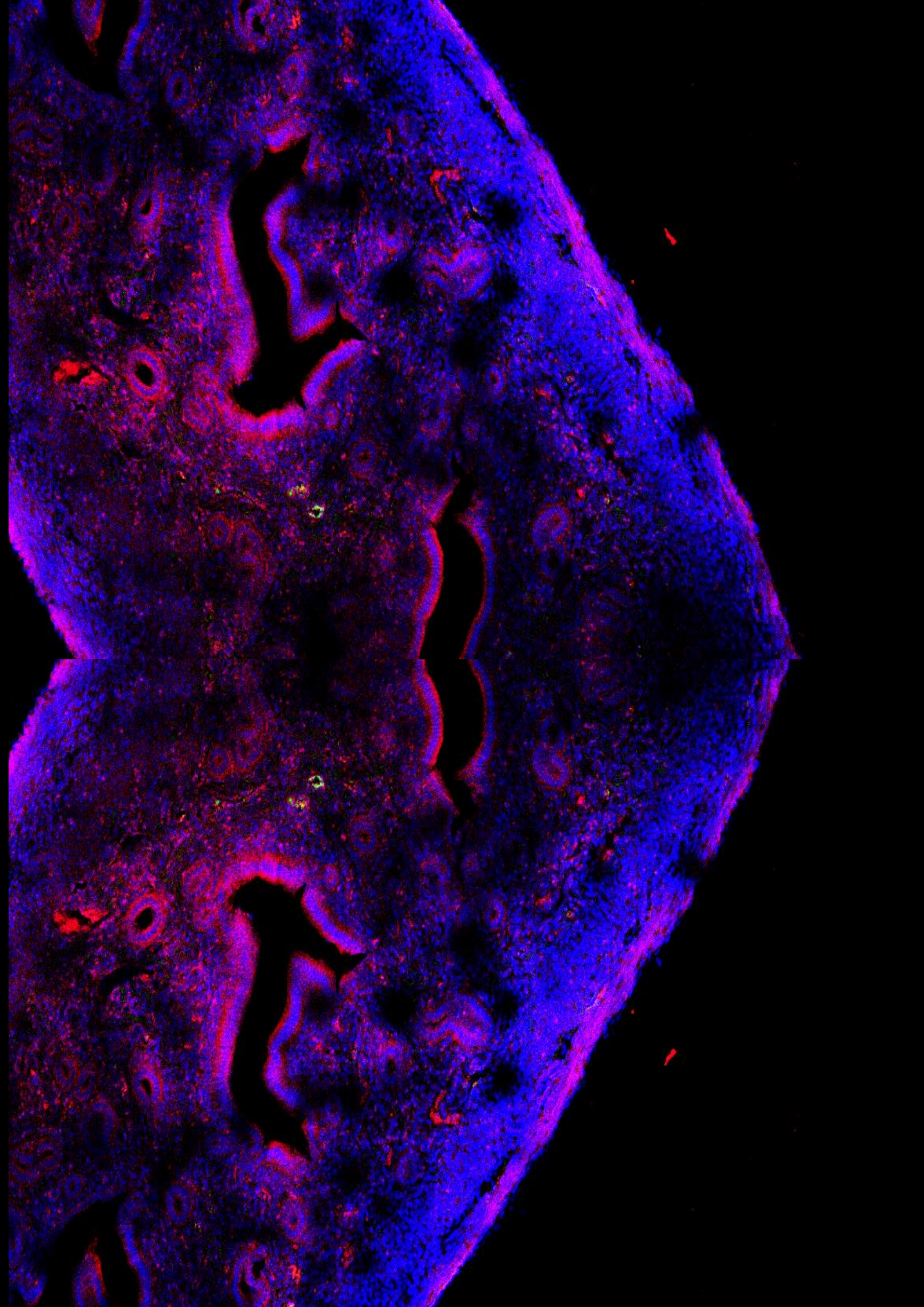
### OBJETIVO 2. DESCRIBIR EL PAPEL DE ARID1A EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DEL CE.

**Objetivo 2.1.** *Analizar el efecto de las células de CE con pérdida de ARID1A en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A de alrededor, con el fin de evaluar si son capaces de promover fenotipos de mayor agresividad.*

**Objetivo 2.2.** *Analizar el efecto de las células de CE con pérdida de ARID1A en las células estromales del TME, con el fin de evaluar si son capaces de reclutar y activar dichas células y modular sus funciones pro-tumorigénicas.*

**Objetivo 2.3.** *Estudio de las vías moleculares alteradas en los CE con pérdida de expresión de ARID1A responsables de la activación del TME, con tal de descubrir las vías implicadas y desarrollar posibles estrategias terapéuticas.*





# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

*“El genio se hace con un 1% de talento, y un 99% de trabajo”*

**Albert Einstein**





### 3.1. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS

En este trabajo se han empleado por un lado, la línea celular espontáneamente inmortalizada derivada de endometrio proliferativo benigno por medio de histerectomía, *Human uterine epithelial cells* (HES); y por otro, diferentes líneas celulares humanas de CEE: Ishikawa 3-H-12 (IK), HEC-1A, AN3CA y MFE-296. Las características y procedencia de estas células se detallan en la tabla 4.

Nombre	Procedencia	Origen	Dilución de mantenimiento
HES	Endometrio benigno proliferativo	Dr. Doug Kniss en la Universidad Estatal de Ohio	1/8
IK	Adenocarcinoma endometrial endometriode	Sigma-Aldrich, 9904020	1/8
HEC-1A	Adenocarcinoma endometrial endometriode	Análisis de isoenzimas de autenticación ATCC	1/8
AN3CA	Adenocarcinoma endometrial endometriode	Análisis de isoenzimas de autenticación ATCC	1/8
MFE-296	Adenocarcinoma endometrial endometriode	Sigma-Aldrich, 98031101	1/8

**Tabla 4: Características de las líneas celulares empleadas.** Nombre, procedencia de aislación, origen de obtención y características de mantenimiento.

Todas estas líneas celulares crecen de manera adherente en monocapa a placas de poliestireno en presencia de medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino inactivado (*Fetal bovine serum*, FBS; Invitrogen), 1 mmol/L de HEPES (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L de piruvato sódico (Sigma-Aldrich), 2 mmol/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomycin (Sigma-Aldrich) y 0,1% de anfotericina B (Sigma-Aldrich), incubadas a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

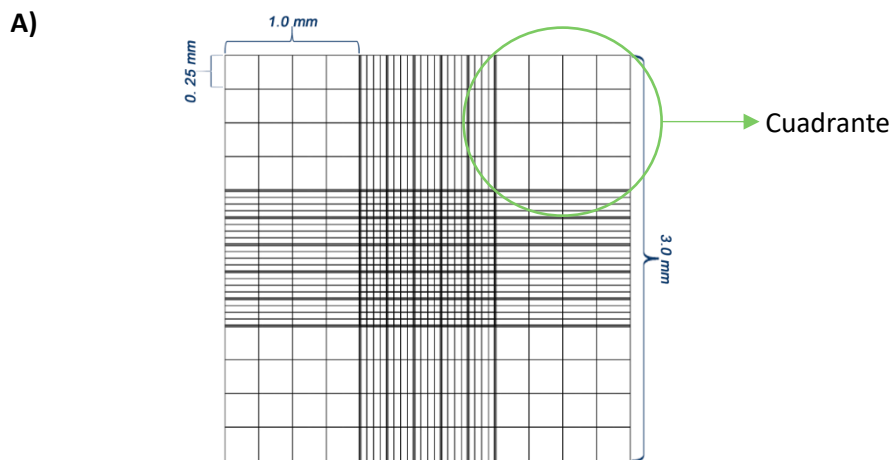
Estas líneas son divididas cada 3-4 veces cuando entran en confluencia, para asegurar su mantenimiento. En primer lugar, las células se lavan con tampón fosfato salino (PBS) y continuamente se disgregan con tripsina al 0,25% de EDTA (Sigma-Aldrich) incubándolas

durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente la tripsina es inactivada con medio DMEM con el 10% de FBS y las células son recogidas y centrifugadas durante 3 minutos a 1000 rpm. Finalmente, el pellet obtenido se resuspende en el mismo medio de cultivo. Para asegurar el mantenimiento de las líneas estas células son plantadas en su dilución de mantenimiento concreta en nuevas placas p100.

### 3.1.2. CONTAJE CELULAR

El conteo celular se realizó manualmente mediante el empleo de una cámara de Neubauer. Para ello se cogieron 10µL de la suspensión celular y se cargaron en dicha cámara de Neubauer (figura 20). El número de células de varios cuadrantes fue contado y la concentración celular fue calculada en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ de células por cuadrante}}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes}} \times \frac{10^4}{\text{factor de dilución}}$$



**Figura 20. Esquema de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.** A) Esquema representativo de los 9 cuadrantes de la cámara de Neubauer, señalizando lo que se considera un cuadrante.

### 3.1.3. CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN CELULAR

Tras los procesos de tripsinización y centrifugación, se realizó un lavado extra con PBS y las células se resuspendieron en 1mL de medio de congelación, compuesto por FBS y 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich). Posteriormente esta suspensión se almacenó en tubos de criopreservación (ClearLine) y a su vez estos fueron inmediatamente situados en un container

de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , durante al menos 24h. Transcurrido este tiempo los tubos de criopreservación fueron almacenados en el tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación celular, los tubos de criopreservación fueron calentados en el baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente tras su descongelación las suspensiones celulares fueron inmediatamente diluidas con medio de cultivo precalentado. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron centrifugada durante 5 minutos y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en medio celular. Las células fueron cultivadas en placas p100 de mantenimiento.

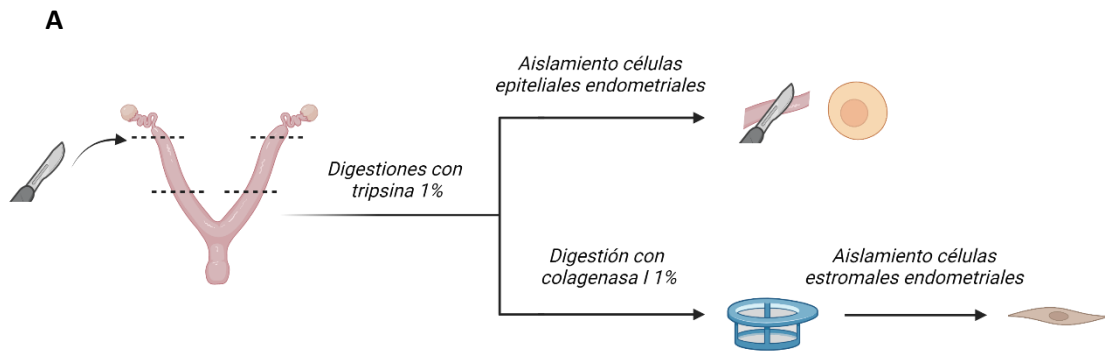
### 3.1.4. AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES Y ESTROMALES DE ENDOMETRIO DE RATÓN Y CULTIVO EN 2 DIMENSIONES

Para el aislamiento de las células epiteliales de endometrio de ratón, se sacrificaron las hembras en cuestión por dislocación cervical, se realizó la extracción de su útero, asegurándose de eliminar todos los restos de grasa cervical y se cortó cada útero en 3-4 trozos. Estos trozos de útero fueron lavados con *Hank's balanced salt solution* (HBSS; (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente digeridos con 1% de tripsina (Gibco) en HBSS, durante 1h a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación y posteriormente durante 45 min a temperatura ambiente (*Room temperatura*, RT) en agitación. Transcurrido este periodo, la tripsina fue inactivada con medio DMEM con el 10% de FBS. A partir de aquí, se puede obtener tanto células epiteliales endometriales como células estromales endometriales (Figura 21).

En este momento por un lado se procedió a la **extracción de las células epiteliales** del lumen endometrial. Para ello con ayuda de una hoja de bisturí se presionó levemente sobre los trozos previamente digeridos, arrastrando así las células epiteliales al exterior. Estas células fueron recogidas y lavadas con PBS 1X 2 veces centrifugando entre lavados a 700rpm durante 5 min. Después estas células epiteliales fueron disgregadas mecánicamente pasándolas por una pipeta p1000 pipeteando “*up and down*” 50 veces. A continuación, estas células que se encontraban en agregados celulares de 4 a 5 células, fueron resuspendidas en medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de anfotericina B, y fueron cultivadas en sus correspondientes placas de cultivo en 2 dimensiones (2D), a  $37^{\circ}\text{C}$  con saturación de humedad y 5%  $\text{CO}_2$ . A partir de aquí se podrán generar cultivos en 3 dimensiones (3D) si cabe la necesidad (protocolo indicado más adelante).

Para la **extracción de las células estromales**, los restos de los fragmentos de endometrio previamente digeridos una vez ya separadas las células epiteliales, fueron cortados con la hoja de bisturí en fragmentos más pequeños, lavados con PBS 1X y centrifugados a 1000 rpm durante 3 min. Posteriormente estos fragmentos fueron disgregados con una solución de colagenasa IA al 1% (200mg/ml, Worthington Biochemical Corporation) en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS, e incubada durante 2h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 700rpm. Transcurrido este tiempo la solución fue filtrada con un Steril Cell Strainer de  $40\mu\text{M}$  (Fisherbrand) y las células estromales aisladas fueron sembradas en una placa p100 con medio de células estromales compuesto por DMEM/F12 suplementado con 4% de FBS, 2 mmol/L de piruvato sódico, 1% de

penicilina/estreptomicina y 0,5% de *Insulin-Transferrin-Sodium Selenite* (ITS). Transcurridas 24 h se les realizó un lavado con PBS 1X y se les cambio el medio a medio fresco. Las células fueron incubadas a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.



**Figura 21. Esquema del procedimiento de aislamiento de células epiteliales o estromales a partir de úteros murinos.** A) Esquema representativo de los diferentes procesos seguidos para separar y aislar las células epiteliales de las estromales de los úteros murinos obtenidos. Creado con BioRender.com

### 3.1.5. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS (CM) DE CÉLULAS EN CULTIVO

Los medios condicionados (CM) son medios recolectados de cultivos celulares bajo condiciones específicas de cultivo, conteniendo metabolitos, factores de crecimiento, citoquinas y proteínas extracelulares secretadas por las células en cultivo. Para su recolección las células en cuestión fueron plantadas bajo sus condiciones normales de crecimiento y se dejaron crecer hasta alcanzar el 70% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia en cuestión las células cultivadas fueron lavadas con PBS 1X y se les añadió el medio fresco deseado para su recolección. Transcurridas 48h los CM fueron recolectados y centrifugado a 1000 rpm durante 3 min. Estos CM son recuperados y pasados por un filtro de 22µM. Finalmente los CM fueron almacenado a -80°C hasta su uso.

### 3.1.6. GENERACIÓN DE MONOCULTIVOS TRIDIMENSIONALES (3D) CON LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE CE

Primero de todo, se dispuso una capa de Matrigel® (BDBiosciences) de 10µl (en el caso de pozos de M96) y se dejó polimerizar a 37°C durante 30 min. Posteriormente se plantaron 1.500 células/pozo, resuspendidas en 100µl de medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de anfotericina B, y se incuban de 5 a 8 días a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

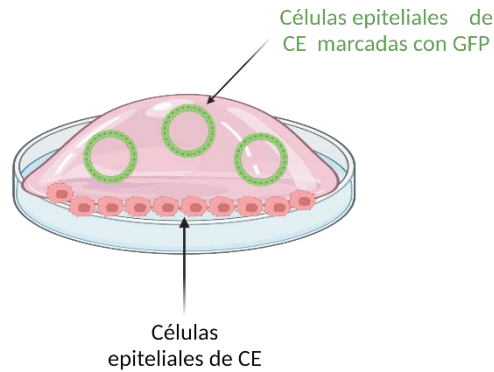
### 3.1.7. GENERACIÓN DE MONOCULTIVOS TRIDIMENSIONALES (3D) CON CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE ENDOMETRIOS MURINOS

Las células epiteliales fueron aisladas, como se indica en el apartado 3.1.4, a partir de hembras con el genotipo deseado y con una edad de 3 a 4 semanas. Una vez las células fueron disgregadas, éstas fueron plantadas en 2D en medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de anfotericina B, e incubadas durante 24 h a 37°C, con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, estas células fueron lavadas con PBS 1X y disgregadas con tripsina al 0,25% de EDTA durante 5 min a 37°C. Seguidamente, la tripsina fue bloqueada con medio DMEM al 10% de FBS, y la suspensión fue centrifugada a 700 rpm durante 5 min. A continuación, se les realizó dos lavados con PBS 1X centrifugando de nuevo a 700 rpm durante 5 min. Finalmente, el pellet fue disgregado mecánicamente haciendo de nuevo “*up and downs*” con la pipeta p1000 cuidadosamente hasta formar agregados de 2 a 8 células. Acto seguido, las células fueron resuspendidas al volumen final deseado con medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B y 3% de Matrigel® plantándose a una concentración de  $4 \times 10^4$  agregados celulares/ml en pocillos sobre los que previamente había sido polimerizado una base de Matrigel® (de 10 µl, en el caso de pozos de M96) y se volvieron a incubar durante 24 h a 37°C, con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, el medio es cambiado por medio DMEM/F12 suplementadas con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de anfotericina B, 0,5% de ITS, 5 ng/ml de EGF (epidermal growth factor; Invitrogen) y 3% de Matrigel®

### 3.1.8. GENERACIÓN DE CO-CULTIVOS TRIDIMENSIONALES (3D) CON DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE CE

Primero de todo, se resuspendieron unas 1.000 células epiteliales endometriales (las deseadas para cada condición) en 10 µl de Matrigel® por cada pozo de M96, generándose una base que se dejó polimerizar a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se plantaron 1.500 células epiteliales endometriales/pozo resuspendidas en 100 µl de medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de anfotericina B, y se incuban de 5 a 8 días a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Remarcar que las células epiteliales plantadas posteriormente en 3D previamente fueron infectadas con el marcador fluorescente GFP (*Green fluorescence protein*) con tal de poder diferenciarlas de las células iniciales (Figura 22).

A)

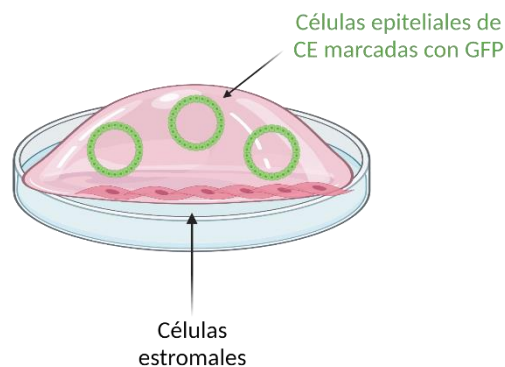


**Figura 22. Imagen representativa de los co-cultivos 3D de células epiteliales endometriales.** A) Imagen representativa de los diferentes componentes de los co-cultivos 3D de células epiteliales, mostrándose cuáles serían las células marcadas con fluorescencia (GFP) y cuáles no lo estarían. Creado con BioRender.com

### 3.1.9. GENERACIÓN DE CO-CULTIVOS TRIDIMENSIONALES (3D) CON LÍNEAS CELULARES DE CE Y CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES (ESC)

Primero de todo, se resuspendieron unas 1.000 células estromales endometriales (las deseadas para cada condición) en 10  $\mu$ l de Matrigel<sup>®</sup> por cada pozo de M96, generándose una base que se dejó polimerizar a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se plantaron 1.500 células epiteliales endometriales/pozo resuspendidas en 100  $\mu$ l de medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS, 1 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de anfotericina B, y se incubaron de 5 a 8 días a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Remarcar que las células epiteliales previamente fueron infectadas con el marcador GFP (*Green fluorescence protein*) con tal de poder diferenciarlas de las células estromales (figura 23).

A)



**Figura 23. Imagen representativa de los co-cultivos 3D de células epiteliales endometriales.** A) Imagen representativa de los diferentes componentes de los co-cultivos 3D de células epiteliales marcadas fluorescentemente con GFP y las células estromales en cuestión sin marcar. Creado con BioRender.com

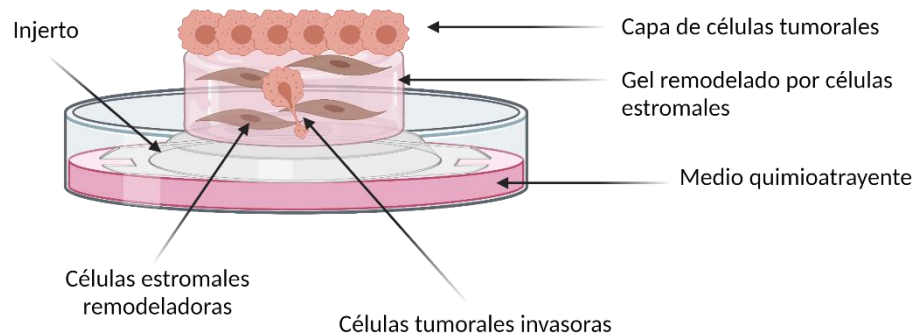


### 3.1.10. GENERACIÓN DE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE CÉLULAS DE CE Y CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES (ESC)

Para la generación de los cultivos organotípicos de endometrio, primero de todo  $2,5 \times 10^6$  células estromales endometriales fueron resuspendidas en  $100 \mu\text{l}$  de medio de células estromales (compuesto por DMEM/F12 suplementado con 4% de FBS, 2 mmol/L de piruvato sódico, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,5% de ITS). Esta suspensión fue a su vez disuelta en una mezcla de 50% de Colágeno tipo I (4mg/ml; Thermo Fisher Scientific), 25% de Matrigel, 6,25% de FBS y medio de células estromales, generándose un gel que fue depositado en un pozo de M24 e incubado durante 1h a  $37^\circ\text{C}$  con saturación de humedad y 5%  $\text{CO}_2$ . Transcurrida la hora de incubación, 1ml de medio de células estromales fue añadido cuidadosamente al pocillo y se dejó incubar durante 16h de nuevo a  $37^\circ\text{C}$  con saturación de humedad y 5%  $\text{CO}_2$ . Pasado dicho tiempo, se aspiró el medio muy cuidadosamente y se añadió una suspensión de  $5,5 \times 10^5$  células tumorales de interés resuspendidas en el medio de las células tumorales DMEM (descrito previamente en el apartado 3.1.1) a un volumen final de  $500 \mu\text{l}$ . De nuevo se volvió a incubar durante 16h a  $37^\circ\text{C}$  con saturación de humedad y 5%  $\text{CO}_2$ . Finalmente, pasadas dichas horas de incubación, se preparó el injerto donde se montó el cultivo. Para ello, primero se preparó por cada cultivo 1ml de la mezcla de 50% de Colágeno tipo I (4mg/ml; Millipore), 25% de Matrigel, 6,25% de FBS y medio de células estromales por cada injerto (Millipore) a preparar. Esta mezcla fue depositada en la parte superior del injerto poniéndose seguidamente a incubar durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrida la hora de incubación, los geles fueron fijados con PFA 4% estéril durante 2h a temperatura ambiente; lavados tres veces con PBS 1X durante 10min; y neutralizados añadiéndoles medio de las células tumorales e incubando durante 30min a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente, estos fueron traspasados con cuidado a pozos de M6. Una vez preparados los injertos, se dispuso a colocar los geles compuestos por células estromales y tumorales previamente preparados sobre dichos injertos. Para ello, primero con mucho cuidado se retiró el medio que cubría los geles de los pocillos M24 y con ayuda de una espátula previamente esterilizada, se montaron los geles encima de los injertos previamente colocados en pozos de M6, con cuidado de no fragmentarlos y de mantener la orientación situando las células tumorales en la parte más superior (figura 24). Una vez montados los geles encima de los injertos, se añadió medio de las células tumorales hasta alcanzar la base del injerto y se añadieron a cada gel (encima de la porción de células tumorales)  $100 \mu\text{l}$  de la mezcla de 50% de Colágeno tipo I, 25% de Matrigel, 6,25% de FBS y medio de células estromales, para una mejor preservación de la estructura y la orientación de los componentes del cultivo. Finalmente se incubó durante 6-7 días a  $37^\circ\text{C}$  con saturación de humedad y 5%  $\text{CO}_2$ .

Finalizado este periodo, para el análisis de los cultivos organotípicos, los cultivos fueron fijados con formol durante 16h a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez fijados, fueron lavados tres veces con PBS 1X durante 10min. Finalmente, estos cultivos fueron procesados generándose bloques de parafina en los que se realizaron tinciones de Eosina Hematoxilina (EH), explicada en apartados posteriores.

A)



**Figura 24. Imagen representativa de los cultivos organotípicos endometriales.** A) Imagen representativa los diferentes componentes de los cultivos organotípicos, compuestos por células tumorales endometriales y células estromales endometriales capaces o no de remodelar la matriz o gel, haciendo estos gels más permisivos o no a la invasión de las células tumorales a través de ella. Creado con BioRender.com

### 3.1.11. TRANSFECCIÓN, PRODUCCIÓN VIRAL E INFECCIÓN IN VITRO

Para la producción del plásmido basado en el sgRNA, los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia sgRNA fueron clonados en el vector lentiviral lentiCRISPRv2, mediante el uso de los sitios de restricción BsmBI. Las secuencias de sgRNA diana ARID1A.1 5'-CACCGATGTTGTTGGTGGAAGACGG; ARID1A.2 5'-CACCGGCTTTCTTCAGCTCCGAGGG; ARID1A.3 5'-CACCGTATGGCCAATATGCCACCTC. Estas secuencias diana son funcionales tanto contra la secuencia de *ARID1A* humana como contra la secuencia de *Arid1a* murina. En el caso del gen de *HDAC6*, se emplearon plásmidos que llevaban secuencias shRNA contra *HDAC6*, adquiridos comercialmente (*abm*, 2313409). De igual manera el caso del gen *CXCL16* se emplearon plásmidos que llevaban secuencias shRNA contra *CXCL16*, adquiridos comercialmente (*abm*, 171720910395). Todas las secuencias de los mencionados oligonucleótidos son válidas tanto para el gen humano como el murino y se encuentran descritas en la tabla 5. Para la incorporación de GFP, se empleó el plásmido YFP-GFP cedido por el Dr. Xavier Dolcet, de la Universitat de Lleida. Para la incorporación de luciferina se empleó el plásmido basado en HIV1 que expresa luciferasa de luciérnaga cedido por el Dr Eloi Gari de la Universitat de Lleida (España).

Nombre	Vector	Gen	Secuencia diana
<i>sgARID1A.1</i>	lentiCRISPRv2	<i>ARID1A</i>	5'-CACCGATGTTGTTGGTGAAGACGG
<i>sgARID1A.2</i>	lentiCRISPRv2	<i>ARID1A</i>	5'-CACCGGCTTTCTTCAGCTCCGAGGG
<i>sgARID1A.3</i>	lentiCRISPRv2	<i>ARID1A</i>	5'-CACCGTATGGCCAATATGCCACCTC
<i>shRNA HDAC6</i>	piLenti-siRNA-GFP	<i>HDAC6</i>	5'-ACCATCAATGTCCTTGAACCAGGTGG
<i>sgRNA CXCL16</i>	piLenti-siRNA-GFP	<i>CXCL16</i>	5'-GCCACCAGAAGCATTACTT

**Tabla 5: Plásmidos y secuencias diana empleada para el silenciamiento genético.** Se especifica la secuencia diana de los genes silenciados y los genes diana, así como el plásmido en el que están clonados y nombre otorgado.

La producción de partículas lentivirales fue conseguida mediante la transfección de las células empaquetadoras HEK-293 con PEI linear (40 $\mu$ M), en combinación con los plásmidos lentivirales de interés y los plásmidos auxiliares (pdPAX2 empaquetador y pMD2G de la envuelta) en un ratio de 1:1. Transcurridas 6 h post transfección, se cambió el medio de las células empaquetadoras con DMEM suplementado con 10% FBS, 1mM de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich) y 1mM de piruvato sódico. Las células fueron incubadas durante 4 días a 37°C, con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se recolectó el medio conteniente de las partículas virales, se centrifugó durante 10 min a 200g y se filtró a través de un filtro de 45 $\mu$ m (Millipore). Posteriormente, estos medios fueron concentrados mediante el empleo de columnas concentradoras Vivaspin (SartoriusStedim Biotech GmbH). Este medio concentrado fue almacenado a -20°C.

Para la infección de las células, este medio concentrado fue añadido a las células a infectar, diluido en medio fresco a una 1/25 de concentración, junto con polybrene (Sigma-Aldrich) a una 1/60 de concentración. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C, con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Tras este periodo, el medio fue reemplazado por medio fresco y las células se dejaron crecer regularmente para permitir su expresión fenotípica.

### 3.1.12. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

- **Tamoxifeno**

El tamoxifeno (Sigma-Aldrich) es adquirido en polvos y disuelto para su uso *in vitro* en etanol puro a una concentración stock de 1mM. Para inducir la escisión *in vitro* de los genes en cuestión en las células epiteliales endometriales de los ratones con la Cre:ER<sup>T+/+</sup>, una vez

aisladas al ser plantadas en 2D se añaden al medio una única dosis de 0,5µg/mL de tamoxifeno.

- **Etopósido**

El etopósido (Sigma-Aldrich, E1383) para los tratamientos *in vitro*, fue disuelto en DMSO a una concentración stock de 50mM. Para los diferentes tratamientos, el etopósido es diluido en medio de cultivo utilizando las concentraciones indicadas para casa tipo de experimento, de 1µM a 5µM.

- **ACY 1215**

El inhibidor de HDAC6, ACY 1215 (MedChemExpress, HY-16026), para los tratamientos *in vitro*, fue disuelto en DMSO a una concentración stock de 100 µM. Para los tratamientos, el ACY 1215 fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de final de los tratamientos de 6µM.

- **Anticuerpo neutralizante anti-CXCL16**

El anticuerpo neutralizante anti-CXCL16 (Thermo Fisher Scientific, 256213) para los tratamientos *in vitro* fue disuelto en PBS 1X a una concentración stock de 500µg/ml. Para los tratamientos, fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de final de los tratamientos de 8 µg/ml.

- **ML 339**

El inhibidor de CXCR6, ML 339 (R&D Systems, 5943), para los tratamientos *in vitro*, fue disuelto en DMSO a una concentración stock de 100µg/ml. Para los tratamientos, fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de final de los tratamientos de 140ng/ml.

- **Proteína recombinante CXCL16 (rCXCL16)**

La proteína recombinante CXCL16 humana (PeproTech,Inc) fue usada para experimentos tanto de células humanas como murinas, puesto que presenta una homología del 82% con la murina <sup>121</sup>. para los tratamientos *in vitro*, fue disuelto en PBS 1X a una concentración stock de 100µg/ml. Para los tratamientos, fue diluido en medio de cultivo hasta alcanzar la concentración de final de los tratamientos de 25ng/ml.

## 3.2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

---

### 3.2.1. ÉTICA Y MANTENIMIENTO DE RATONES

En esta tesis para los modelos de experimentación animal se han empleado modelos murinos inmunocomprometidos SCID (*severed combined immunodeficiency*), alojados en instalaciones SPF (*specific-pathogen free*) y modelos murinos transgénicos o modificados genéticamente, alojados en instalaciones convencionales. Los ratones se han sometido a procedimientos libres de patógenos y han sido mantenidos a una temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa de  $50\pm 5\%$  y siguiendo ciclos de 12 h de luz/oscuridad con acceso *ad libitum* a comida y agua.

Todos los experimentos in vivo aquí realizados empleando modelos murinos de experimentación han sido regidos por las siguientes disposiciones legales:

- Ley 5/1995, de 21 de junio, de la Generalidad de Cataluña, de protección de los animales empleados para experimentación animal y para otros fines científicos.
- Decreto 214/1997, de 30 de julio, de la Generalidad de Cataluña, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas.
- 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 marco de la legislación europea, la Directiva 63/2010/UE, que deroga a la Directiva 86/609/CEE, de 22 de septiembre del Consejo de Europa sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

Además, todos los procedimientos con modelos murinos han sido realizados bajo la supervisión del correspondiente personal del centro y siempre respetando las directrices legales y éticas vigentes. El estudio ha sido aprobado por el Comité ético de experimentación animal de la Universitat de Lleida.

### 3.2.2. RATONES CAG-CRE:ER<sup>T</sup>

Los ratones CAG-Cre:ER<sup>T</sup> (denominados durante esta tesis como Cre:ER<sup>T</sup>) (B6.CG-Tg(CAG-cre/Esr1)5Amc/J) fueron generados en el laboratorio del Dr. Andrew P. McMahon mediante la técnica de la inyección pronuclear, en la que el material genético se inyecta en el pronúcleo de un ovocito fecundado. Nuestro laboratorio adquirió los ratones Cre:ER<sup>T</sup> a través de la compañía The Jackson Laboratory.

Estos ratones expresan la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor CAG acoplado al promotor del citomegalovirus (CMV). El transgén contiene la proteína de fusión formada por la recombinasa Cre y una forma mutante del dominio de unión al ligando de receptor de estrógenos murino (ER<sup>T</sup>), impidiéndose así la unión a estrógenos endógenos. Esta proteína de fusión Cre: ER<sup>T</sup> se encuentra constitutivamente en citoplasma cuando no es estimulada, pero en presencia de tamoxifeno es capaz de translocarse al compartimento nuclear actuando así la cre como recombinasa sobre las secuencias LoxP existentes. Esta colonia de ratones se mantiene en heterocigosis, y los animales Cre:ERT<sup>+</sup>/- son viables, fértiles, presentan un tamaño normal, y además no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento.

### 3.2.3. RATONES ARID1A FLOXEADO (*ARID1A*<sup>f/f</sup>)

Los ratones *Arid1a*<sup>f/f</sup> fueron cedidos por el Dr. I. Lei, generándose a partir de la inyección de células ES *Arid1a*<sup>f/+</sup> en blastocitos de ratón, generándose ratones *Arid1a*<sup>f/+</sup>, que posteriormente por medio de cruzamientos se convirtieron en ratones *Arid1a*<sup>f/f</sup>.

Estos ratones presentan secuencias LoxP flanqueando el exón 8 del gen *Arid1a*, y la eliminación de dicho exón conduce a una mutación de cambio de marco que lidera la degradación del tránsito mutante y como consecuencia a la ausencia de ARID1A, en presencia de alguna recombinasa Cre<sup>122</sup>. De esta manera, su uso permite la escisión de *Arid1a* en diferentes tejidos o momentos del desarrollo en función de la recombinasa empleada.

Esta colonia murina se mantiene en estado de heterocigosis *Arid1a*<sup>f/f</sup> y es viable, fértil, presentan medidas normales y no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento, puesto que si no son cruzados con ninguna recombinasa los niveles de expresión de ARID1A son salvajes.

### 3.2.4. RATONES PTEN FLOXEADO (*PTEN*<sup>f/f</sup>)

Los ratones *Pten*<sup>f/f</sup> (C;129S4-Ptentm1Hwu/J) fueron generados por el Dr. Hong Wu mediante la técnica de la electroporación de células madre embrionarias (ESC) y posterior inyección en blastocistos. Nuestro laboratorio los adquirió a través de *The Jackson Laboratory*.

Estos ratones presentan secuencias LoxP que se encuentran flanqueadas por el exón 5 de *Pten*, que codifica para el dominio de fosfatasa. En presencia de una recombinasa Cre, se produce la escisión del exón 5, desencadenándose la pérdida de PTEN. De esta manera, su uso permite la escisión de *Pten* en diferentes tejidos o momentos del desarrollo en función de la recombinasa empleada.

Esta colonia murina se mantiene en estado de heterocigosis *Pten*<sup>f/f</sup> y es viable, fértil, presentan medidas normales y no muestran alteraciones morfológicas ni de comportamiento, puesto que si no son cruzados con ninguna recombinasa los niveles de expresión de PTEN son salvajes.



### 3.2.5. RATONES CAG-Cre:ER<sup>T</sup> ARID1A<sup>f/f</sup> (Cre:ER<sup>T</sup> ARID1A<sup>f/f</sup>)

Los ratones CAG-Cre:ER<sup>T</sup> Arid1a<sup>f/f</sup> (denominados durante esta tesis como Cre:ER<sup>T</sup> Arid1a<sup>f/f</sup>) fueron generados durante estas tesis a partir del cruce de la colonia Cre:ER<sup>T</sup> y la colonia Arid1a<sup>f/f</sup>.

Para conseguir la eliminación de Arid1a, los ratones CAG-Cre:ER<sup>T</sup> Arid1a<sup>f/f</sup> fueron pinchados intraperitonealmente con una inyección de 0,5 mg de tamoxifeno entre las 4-5 primeras semanas de vida de los ratones. Transcurridas las 3-4 semanas se observa una pérdida generalizada de ARID1A principalmente en las células epiteliales.

### 3.2.6. RATONES CAG-Cre:ER<sup>T</sup> PTEN<sup>f/f</sup> ARID1A<sup>f/f</sup> (Cre:ER<sup>T</sup> PTEN<sup>f/f</sup> ARID1A<sup>f/f</sup>)

Los ratones CAG-Cre:ER<sup>T</sup> Pten<sup>f/f</sup> Arid1a<sup>f/f</sup> (denominados durante esta tesis como Cre:ER<sup>T</sup> Pten<sup>f/f</sup> Arid1a<sup>f/f</sup>) fueron generados durante estas tesis a partir del cruce de la colonia Cre:ER<sup>T</sup> Arid1a<sup>f/f</sup> y la colonia Pten<sup>f/f</sup>.

Para conseguir la eliminación de Arid1a, los ratones CAG-Cre:ER<sup>T</sup> Pten<sup>f/f</sup> Arid1a<sup>f/f</sup> fueron pinchados intraperitonealmente con una inyección de 0,5 mg de tamoxifeno entre las 4-5 primeras semanas de vida de los ratones. Transcurridas las 3-4 semanas se observa una pérdida generalizada de PTEN y ARID1A principalmente en las células epiteliales.

### 3.2.7. SEXADO Y GENOTIPADO

Los ratones fueron separados y sexados a los 21 días de vida. Para su genotipado, los ratones fueron dormidos con isoflurano al 2% mediante vía inhalatoria, se marcaron mediante un código de cortes en la oreja (con tal de posteriormente poder identificarlos) y se obtuvo una pequeña biopsia de la cola, inferior a 5mm.

Posteriormente estas biopsias fueron digeridas con un tampón de genotipado constituido por 100mM de Tris PH 8,5; 200 mM NaCl, 5 mM EDTA y 0,2% SDS, en el que es diluido la proteinasa K a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich). Las digestiones tuvieron lugar durante 3-4 h a 57°C y en agitación constante a 700 rpm. Seguidamente, la proteinasa K fue inactivada sometiéndola a una incubación a 95°C durante 5 min y se descartaron los restos de biopsia no digeridos por medio de una centrifugación de 10 min a 12.000 rpm. A continuación, con el sobrenadante rescatado se realizó una precipitación del DNA mediante la adición de etanol absoluto frío. Finalmente, este DNA precipitado se resuspendió en H<sub>2</sub>O milliQ.

Obtenido el DNA de las biopsias, se procedió a la realización de la reacción de PCR (*polymerase chain reaction*) correspondiente para cada muestra (tabla 6). Los productos obtenidos de PCR se analizaron por medio de la separación por electroforesis en gel de agarosa y las bandas fueron visualizadas empleando tinción con *Safe View Nucleic Acid Stain* (NBS Biologicals).

Gen	Primers		Programa de PCR			Medida	
<b>Cre:ER<sup>T</sup></b>	Fwd	ACG AAC CTG GTC GAA ATC GT GCG	Tª (°C)	Tiempo	Ciclos	Genotipo	Medida
			94°C	3'	1	Cre:ER <sup>T-/-</sup>	No banda
	Rev	CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AG	94°C	30''	32	Cre:ER <sup>T+/-</sup>	350 bp
			60°C	1''			
		72°C	2'	1			
			72°C	2'			
			4°C	∞			
<b>Pten<sup>fl/fl</sup></b>	Fwd	CAA GCA CTC TGC GAA CTG AG	94°C	2'	1	Pten <sup>+/+</sup>	156 bp
			94°C	45''	32	Pten <sup>fl/+</sup>	156 y 328 bp
	65°C	45''					
	72°C	45''	1	Pten <sup>fl/fl</sup>	328 bp		
Rev	AAG TTT TTG AAG GCA AGA TGC	72°C	5'	1			
		4°C	∞				
<b>Arid1a<sup>fl/fl</sup></b>	Fwd	GGCTCTGCCATAAAGCGA TCC	95°C	2'	1	Arid1a <sup>+/+</sup>	236 bp
			95°C	45''	35	Arid1a <sup>fl/+</sup>	236 y 291 bp
	60°C	45''					
	72°C	45''	1	Arid1a <sup>fl/fl</sup>	291 bp		
Rev	CTCACAATCTAACCGAG GCCAC	72°C	5'	1			
		4°C	∞				

**Tabla 6: Características del genotipado de los modelos murinos transgénicos empleados en esta tesis.** Se especifica la secuencia de los cebadores de la PCR (primers), las condiciones de PCR empleadas y la medida de las bandas obtenidas y el genotipo con el que se corresponden. Fwd, forward; Rev, reverse.

### 3.2.8. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

- **Tamoxifeno**

La sal de citrato de tamoxifeno (Sigma-Aldrich) es adquirido en polvos y disuelto para su uso *in vivo* en etanol absoluto hasta alcanzar una concentración de 10mg/ml, y posteriormente en aceite de maíz (*corn oil*; Sigma-Aldrich) hasta llegar a alcanzar una concentración final de stock de 5mg/ml.

Para inducir la actividad Cre y la consecuente escisión *in vivo* de los genes en cuestión (*Arid1a* o *Pten*) en las células epiteliales endometriales de los ratones con la *Cre:ER<sup>T+/-</sup>*, se realizó una inyección intraperitoneal de tamoxifeno a 5 mg/ml, en hembras de 4 a 5 semanas de edad. Para asegurar que los efectos vistos eran a causa de la inyección del tamoxifeno y

no a señales endógenas, en los experimentos se incluyeron un grupo control a los que solamente se les inyecta aceite de maíz. Además, como control de que los efectos observados no eran debidos al tamoxifeno en sí, en los experimentos se incluyeron un grupo de ratones *Cre:ER<sup>T/-</sup>*, que pese a no expresar la recombinasa recibieron de igual manera la dosis de tamoxifeno.

- **Etopósido**

El etopósido (Sigma-Aldrich, E1383) para los tratamientos *in vivo*, fue disuelto en DMSO a una concentración stock de 50mM. Para los diferentes tratamientos, el etopósido es diluido en PBS 1X hasta alcanzar la concentración de trabajo de 36 $\mu$ M y administrado tres veces por semana de manera intraperitoneal.

### 3.2.9. RECOLECCIÓN DE PLASMAS SANGUÍNEOS

Para la recolección de plasma sanguíneo de los diferentes modelos murino, primero de todo los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2% mediante vía inhalatoria. Una vez dormidos, con el empleo de una aguja de 25G se realizó una punción intracardiaca recolectándose entre 1-2ml de muestra sanguínea por animal. Estas muestras son puestas en tubos de heparina e incubados a temperatura ambiente 5min. Pasado este tiempo se realiza una centrifugación de 5min a 5.000g y el plasma separado es recolectado y almacenado a -80°C.

### 3.2.10. RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS SCID

Los ratones SCID presentan una mutación genética autosómica recesiva denominada *Prkdc<sup>scid</sup>*, localizada en el cromosoma 16 que impide la correcta recombinación VDJ. De este modo, los ratones (que presentan la mutación en homocigosis) no son capaces de generar linfocitos funcionales, desarrollando una inmunodeficiencia grave combinada que afecta tanto a los linfocitos T como a los B. Esto a nivel funcional se traduce en una incompleta maduración del sistema inmunológico que permite que los ratones no rechacen los tumores o trasplantes. Convirtiéndolos así en un modelo útil para el estudio de tumores humanos o xenógrafos o *xenografts*. Nuestro laboratorio adquirió los ratones SCID a través de la compañía The Jackson Laboratory.

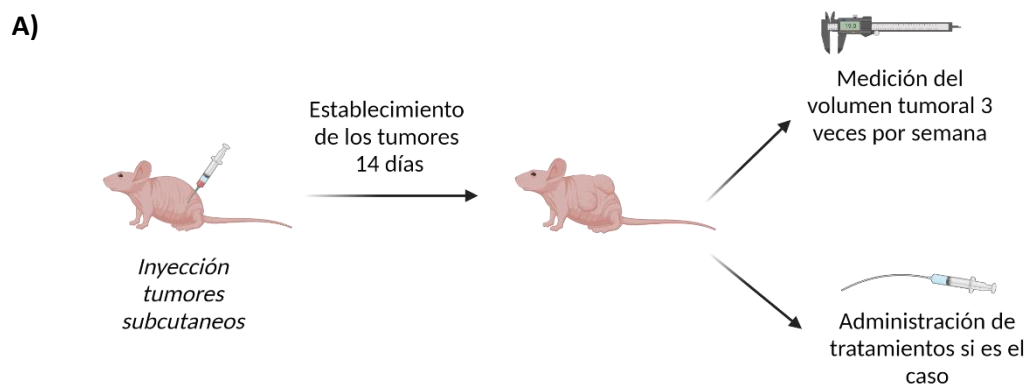
### 3.2.11. ESTABLECIMIENTO DE TUMORES SUBCUTÁNEOS EN RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS SCID

Para el establecimiento de tumores subcutáneos o xenógrafos *in vivo*, se utilizaron hembras de entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso entre 20-25 g de la colonia murina SCID. 1,5 x 10<sup>6</sup> células de CE fueron inyectadas por tumor subcutáneamente, resuspendidas en 100  $\mu$  de PBS 1X y Matrigel (1:1). Los tumores se dejaron crecer durante 14 días para su establecimiento,

transcurrido este tiempo los tumores fueron medidos 3 veces por semana con un calibre (figura 25). El volumen tumoral fue calculado en base a la siguiente fórmula:

$$TV (\textit{tumor volume}) = \frac{(D \times d)^2}{2}$$

Donde D, corresponde con el diámetro mayor del tumor y d, corresponde al diámetro pequeño. En el caso de los experimentos con tratamientos, los ratones comenzaron a ser tratados una vez los tumores alcanzaron los 100mm<sup>3</sup> de volumen. Finalizados los experimentos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sus tumores fueron recolectado para análisis macroscópico, histológico y molecular. Todos los procesos fueron llevados a cabo bajo condiciones de anestesia con isoflurano al 2% mediante vía inhalatoria.

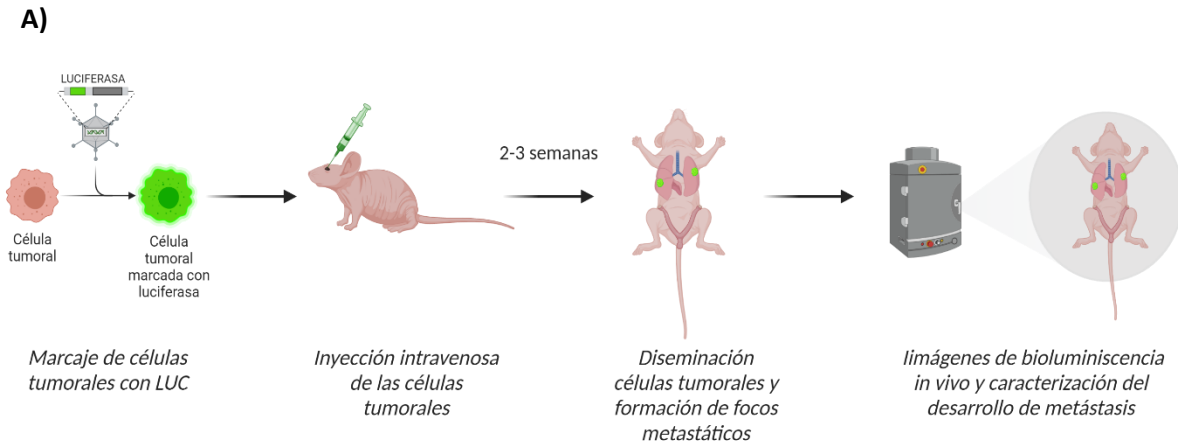


**Figura 25. Esquema representativo de la generación de los modelos murinos de tumores subcutáneos xenógrafos.** A) Diagrama representativo los pasos seguidos para la generación de los modelos murinos de tumores subcutáneos xenógrafos, donde se muestra el tiempo de formación del injerto, y los posibles pasos a seguir una vez formado. Creado con BioRender.com

### 3.2.12. GENERACIÓN DE MODELOS DE METÁSTASIS EN RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS SCID.

Para la formación de modelos murinos con focos metastáticos xenógrafos en pulmón, se utilizaron hembras de entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso entre 20-25 g de la colonia murina SCID. 5 x 10<sup>5</sup> células MFE-296 de CE marcadas con el gen reportero GFP-Luciferasa, fueron inyectadas retro orbitalmente en el seno ocular de las hembras mencionadas. La inyección retro orbital exitosa se confirmó el día 0 mediante imágenes que mostraban bioluminiscencia sistémica distribuida por todos los animales; 6–10 hembras por grupo con evidencia de una inyección satisfactoria continuaron el experimento. De 2 a 3 semanas después de la inyección, monitoreamos las lesiones tumorales con Photon Imager (Bio-space.) junto con el software de imágenes en vivo M3 Vision Viewer (figura 26). Para la bioluminiscencia y

visualización de las células tumorales fue empleada luciferina (Caliper Life Science, 119222) como sustrato de la luciferasa expresada por las células tumorales inyectadas, la cual fue inyectada intravenosamente disuelta en PBS 1X a una concentración de 150 mg/kg (figura 26).

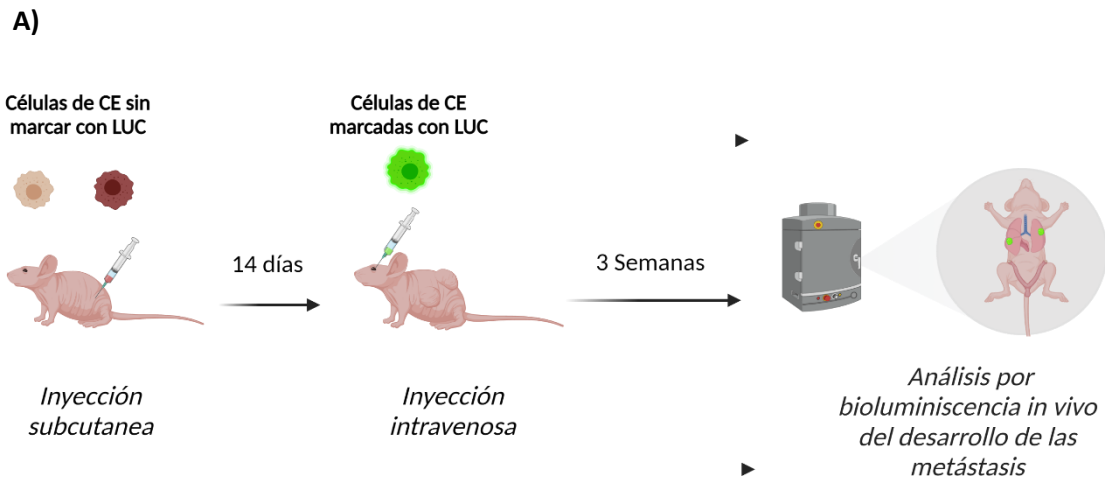


**Figura 26. Esquema representativo de la generación de los modelos murinos xenógrafos metastáticos de pulmón.** A) Diagrama representativo los pasos seguidos para la generación de los modelos metastáticos de pulmón murinos, donde se resalta la incorporación del marcador luciferasa, la inyección intravenosa, el tiempo de espera para la formación de focos metastáticos y la obtención de los resultados por medio de bioluminiscencia. LUC, gen reportero GFP-Luciferasa Creado con BioRender.com

### 3.2.13. GENERACIÓN DE LOS DOBLES MODELOS MURINOS CON TUMORES SUBCUTÁNEOS Y POSTERIOR METÁSTASIS EN RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS SCID

Para evaluar el efecto que los tumores subcutáneos xenógrafos pueden tener en la capacidad de formación de focos metastáticos en pulmón, en nuestros modelos murinos metastáticos, se decidió generar un nuevo modelo que combinara ambos modelos murinos xenógrafos. Para ello se utilizaron hembras de entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso entre 20-25 g de la colonia murina SCID. De igual manera que en el punto 3.2.10,  $1,5 \times 10^6$  células de CE (sin marcar con gen reportero GFP-Luciferasa) fueron inyectadas por tumor subcutáneamente, resuspendidas en  $100 \mu$  de PBS 1X y Matrigel (1:1), y fueron dejadas crecer durante 14 días. Transcurrido este tiempo, y ya ensamblados los tumores subcutáneos,  $5 \times 10^5$  células MFE-296 de CE marcadas con el gen reportero GFP-Luciferasa, fueron inyectadas retro orbitalmente en el seno ocular de las hembras mencionadas. La inyección retro orbital exitosa se confirmó el día 0, mediante imágenes que mostraban bioluminiscencia sistémica distribuida por todos los animales; 6–10 hembras por grupo con evidencia de una inyección satisfactoria continuaron el experimento. De igual manera que en el punto 3.2.11, transcurridas de 2 a 3 semanas post inyección intravenosa, se monitorizaron las lesiones tumorales con Photon Imager, junto con el software de imágenes en vivo M3 Vision Viewer (Figura 27). Para la bioluminiscencia y visualización de las células tumorales fue empleada luciferina como sustrato de la luciferasa expresada por las células

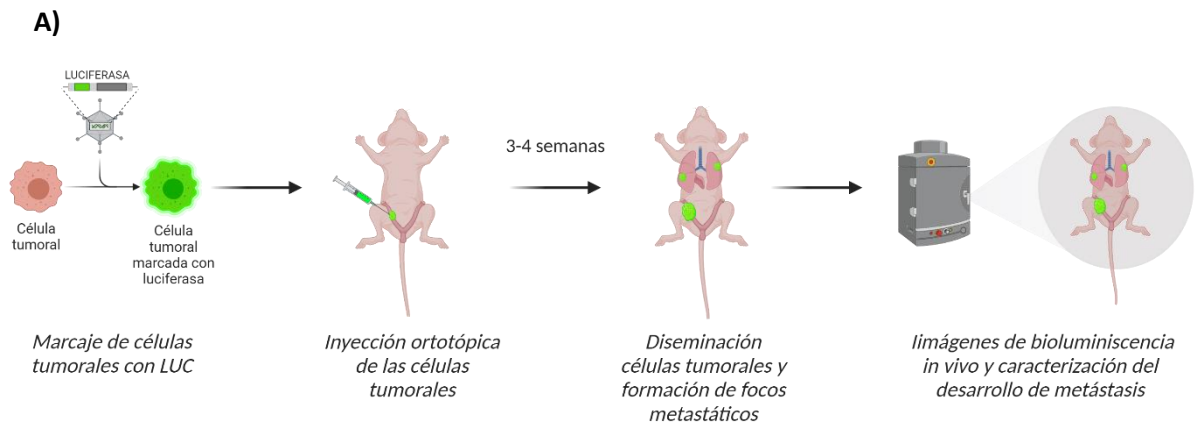
tumorales inyectadas, la cual fue inyectada intravenosamente disuelta en PBS 1X a una concentración de 150 mg/kg. Pudiéndose así observar si los diferentes tumores subcutáneos xenógrafos ejercían algún tipo de señal que afectara a la diseminación y formación de focos metastáticos en pulmón en las células tumorales inyectadas intravenosamente.



**Figura 27. Esquema representativo de la generación del doble modelo murino xenógrafo con tumores subcutáneos y metastáticos de pulmón.** A) Diagrama representativo los pasos seguidos para la generación de los modelos murinos xenógrafos dobles, en los que primero se genera el establecimiento de un tumor subcutáneo y posteriormente por medio de la inyección intravenosa de células marcadas con el gen reportero LUC (GFP-Luciferasa), se generó la formación de focos metastáticos de pulmón, positivos para bioluminiscencia, permitiendo diferenciar el análisis de la capacidad metastática únicamente de las células inyectadas por vía intravenosa. Creado con BioRender.com

### 3.2.14. GENERACIÓN DE LOS MODELOS MURINOS XENÓGRAFOS ORTOTÓPICOS ENDOMETRIALES EN RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS SCID

Para la formación de modelos murinos ortotópicos xenógrafos de endometrio, se utilizaron hembras de entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso entre 20-25 g de la colonia murina SCID. Primero de todo, se realizó la ovariectomía de estas hembras. Seguidamente, un total de  $3 \times 10^5$  células MFE-296 de CE marcadas con el gen reportero GFP-Luciferasa, resuspendidas en 25  $\mu$ l de PBS 1X y Matrigel (1:3), fueron inyectadas en una rama del endometrio de estas hembras empleando puntas de pipeta *Multiflex Round Tips* (BioScience). A continuación, se colocó en cada hembra un parche con 0,76mg de  $\beta$ -estradiol, subcutáneamente. Transcurridas de 3 a 4 semanas post inyección vaginal, se monitorizaron las lesiones tumorales con Photon Imager (Bio-space.) junto con el software de imágenes en vivo M3 Vision Viewer (figura 28). Para la bioluminiscencia y visualización de las células tumorales, fue empleada luciferina (Caliper Life Science, 119222) como sustrato de la luciferasa expresada por las células tumorales inyectadas, la cual fue inyectada intravenosamente disuelta en PBS 1X a una concentración de 150 mg/kg.



**Figura 28. Esquema representativo de la generación de los modelos murinos ortotópicos xenógrafos de endometrio con generación de focos metastáticos.** A) Diagrama representativo los pasos seguidos para la generación de los modelos ortotópicos xenógrafos de endometrio murinos, donde se resalta la incorporación del marcador luciferasa, la inyección ortotópica, el tiempo de espera para la formación de focos metastáticos y la obtención de los resultados por medio de bioluminiscencia. LUC, gen reportero GFP-Luciferasa Creado con BioRender.com



### 3.3. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

---

#### 3.3.1. PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS E HISTOLOGÍA BÁSICA

Tras el sacrificio de los modelos murinos, se realizó el análisis de la presencia y tipo de alteraciones macroscópicas. Para ello, se realizó la extracción de las biopsias de interés (órganos, tumores, etc.) y se fijaron en formol durante 16h a 4°C. Transcurrido este tiempo de fijación, los órganos fueron colocados en casets de inclusión (Simport), para ser procesados realizándoles un proceso de deshidratación e inclusión en parafina. Respecto a las muestras humanas empleadas en esta tesis, todas provienen del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, y fueron procesadas de la misma manera que las muestras murinas.

Con la finalidad del estudio histológico de las diferentes muestras, los bloques de parafina generados (denominados FEPE, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) fueron cortados en cortes de 5µm y teñidos con hematoxilina y eosina (HE). Una vez obtenidas las muestras, los patólogos evaluaron, de manera independiente y a ciegas, la histología de las muestras siguiendo los criterios preestablecidos.

#### 3.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

Para la realización de la inmunohistoquímica de las biopsias, una vez procesados los tejidos e incluidos en parafina, se realizaron cortes de 3µm de grosor de estos bloques y éstos fueron puestos en portaobjetos y secados durante 1h a 65°C. A continuación, se realizó un pretratamiento de desparafinación y rehidratación de los tejidos. El siguiente paso fue el de *antigen retrieval* o recuperación del antígeno, el cual permite desenmascarar y exponer los antígenos de la muestra que habían sido enmascarados durante el procesamiento de la muestra. Para ello, las muestras fueron incubadas en un tampón compuesto por Tris/EDTA 50X a pH9, en un módulo de pretratamiento PT-LINK (Dako) durante 20min a 95°C. A continuación, la peroxidasa endógena de la muestra fue bloqueada por medio de una incubación de las muestras en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, reduciéndose de tal manera el ruido de fondo que se obtiene con el cromógeno empleado. Seguidamente las muestras fueron lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas con el anticuerpo primario durante 30min a temperatura ambiente. Después, se volvieron a realizar tres lavados con PBS 1X y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario. Si la señal es bastante fuerte, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) y la incubación es de 30min a temperatura ambiente. Si por el contrario fue necesario ampliar la señal del anticuerpo, la muestra fue incubada con un anticuerpo secundario conjugado a biotina durante 30min a temperatura ambiente y posteriormente la muestra fue incubada durante 15min más con estreptavidina unida a peroxidasa (HRP) de nuevo a temperatura ambiente. Por último, se aplicó el cromógeno diaminobenzimida (DAB, Dako) para el revelado y se realizó una contra tinción de con hematoxilina para visualizar los núcleos de las células de la muestra. Los anticuerpos usados en esta tesis para HIC se encuentran indicados en la tabla 7.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
Anti-ARID1A	1/500	Abcam, ab182561
Anti-Ki-67	1/100	Abcam, ab16667
Anti-PTEN	1/100	Dako, M3627
Anti- $\alpha$ SMA	RTU	Dako, IR611
Anti-FAP	1/200	Merkel, AB19026
<b>Tricrómico de Mason</b>		
Anti-CXCL16	1/100	Sigma-Aldrich HPA066315
Anti-CXCR6	1/100	Abcam, ab125115
Anti-ADAM10	1/200	Merkel, AB19026

**Tabla 7: Anticuerpos primarios empleados en la IHC.** Tabla donde se detalla para cada anticuerpo empleado en los análisis de expresión de IHC, la dilución a la que se emplea y la referencia del producto.

Para el análisis de las tinciones de inmunohistoquímica se empleó el software de imagen automatizada QuPath v0. 1.2. Para ello, imágenes de diferentes zonas representativas obtenidas con el microscopio DM108 (Leica), fueron analizadas realizando la selección de células positivas y tres umbrales diferentes fueron aplicados según las puntuaciones de intensidad (0, 1, 2 y 3). Los valores mostrados, se corresponden con las puntuaciones más elevadas de la sección completa. En el caso de las muestras con pérdida focal de ARID1A el análisis se realizó de las secciones creadas en base a la expresión o no de ARID1A, presentándose los mayores valores de las secciones creadas. Las intensidades corresponden a al menos un mínimo de tres secciones representativas por muestra.

### 3.3.3. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE TEJIDOS MEDIANTE KI-67

Ki-67 es un marcador típico para el análisis de la proliferación celular en tejido, puesto que es expresado en células proliferativas. De tal modo, la cuantificación de la inmunohistoquímica de Ki-67 da una medida de la tasa de proliferación de un determinado tejido en unas determinadas condiciones. Dicha inmunohistoquímica se realizó con las técnicas explicadas en el punto 3.3.2.

Para la cuantificación, se tomaron fotografías de 5 campos representativos de cada animal y por cada muestra la proliferación celular es calculada como el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 respecto al número total de núcleos en cada campo. Se evaluaron entre 1.500-2.000

núcleos totales por muestra. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio DMD 108 y cuantificadas con el software *Image J*.

#### 3.3.4. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA (IHF)

Para la realización de la inmunofluorescencia de las biopsias, una vez procesados los tejidos e incluidos en parafina, se realizaron cortes de 3µm de grosor de estos bloques que fueron puestos en portaobjetos y secados durante 16h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un pretratamiento de desparafinación y rehidratación de los tejidos. De igual manera que en la HIC, el siguiente paso fue el de *antigen retrieval* o recuperación del antígeno, el cual permite desenmascarar y exponer los antígenos de la muestra que habían sido enmascarados durante el procesamiento de la muestra. Para ello, las muestras son incubadas en un tampón compuesto por ácido cítrico y tween a pH6, en el baño a 95°C durante 20min. Finalizado este proceso, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas en una solución de bloqueo del 1% de suero de caballo (*horse serum*, HS) en PBS 1X durante 30min a temperatura ambiente. A continuación, el anticuerpo primario fue incubado durante 16h a 4°C. Transcurrida la incubación, se realizaron tres lavados con PBS 1X se incubó el anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad, pues dicho anticuerpo secundario se encontraba marcado con un fluorocromo. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS 1X y se tiñeron las muestras con Hoechst 1/100 (REF), para conseguir la visualización de los núcleos de las células que componían el tejido. Para acabar el proceso se volvió a lavar tres veces con PBS 1X las muestras y se montó con un cubreobjetos y líquido de montaje (Sigma-Aldrich) para preservar la fluorescencia, dejándolo secar durante 16h antes de su análisis. Los anticuerpos empleados en esta técnica se encuentran detallados en la tabla 8.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
Anti-FAP	1/200	Santa Cruz, sc-100528
Anti- $\alpha$ -SMA	1/200	Santa Cruz, sc-53015
Anti-Vimentina	1/200	BD bioscience, 550513
Anti-CXCL16	1/200	Santa Cruz, sc-514363
Anti-ADAM10	1/200	Merkel, AB19026
IgG Alexa Fluor 594 Ratón	1/250	Thermofisher, A11005
IgG Alexa Fluor 588 Raton	1/250	Thermofisher, A11001
IgG Alexa Fluor 594 conejo	1/250	Thermofisher, A11002
IgG Alexa Fluor 488 conejo	1/250	Thermofisher, A11029
IgG Alexa Fluor 594 rata	1/250	Thermofisher, A21209

**Tabla 8: Anticuerpos empleados en la IHF.** Tabla donde se detalla para cada anticuerpo empleado en los análisis de expresión de IHF, la dilución a la que se emplea y la referencia del producto.

Una vez listas las muestras, las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal FV1000 (Olympus) y analizadas con el software *Image J*.

## 3.4. ANÁLISIS MOLECULAR

---

### 3.4.1. ANÁLISIS DEL RNA

#### 3.4.1.1. Extracción RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de cultivos celulares, mediante un kit comercial *SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific®), acoplado a una digestión con DNAsa I con tal de eliminar todo el posible DNA genómico restante que pueda contaminar la muestra dando lugar a señales falsas durante su análisis. Para el lisado de las muestras, se añadió directamente el buffer de extracción del kit en las muestras junto con  $\beta$ -mercaptoetanol para asegurar la integridad del RNA (3,5 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 350 $\mu$ l de buffer de extracción). Tras acabar el protocolo de extracción el RNA fue diluido en H<sub>2</sub>O y almacenado a -80°C.

#### 3.4.1.2. Síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El DNA complementario o cDNA, se trata de DNA sintetizado a partir de una cadena única de RNA mensajero (mRNA) por medio de una reacción llevada a cabo por la transcriptasa reversa. Este cDNA luego puede ser empleado para la técnica de RT-qPCR, que, mediante el empleo de una sonda, marcada con un fluorocromo y específica para cada gen a analizar, permite la cuantificación de la expresión por medio del termociclador CFX96™ (BioRad), que es capaz de leer dichas sondas. En la presente tesis, los pasos de síntesis de cDNA y RT-qPCR se hicieron simultáneamente mediante el uso del kit pPCR BIO Probe 1-Step Go (PCR Biosystems). El programa utilizado para el proceso comienza con calentar las muestras a 45°C durante 10min, seguidamente las muestras se elevan hasta los 95°C durante 2min y finalmente se repiten 40 ciclos a 95°C durante 5sec y 60°C durante 20sec. Las sondas empleadas (Thermo-Fisher) son específicas de cada gen y se encuentran detalladas en la tabla 9.

Gen	Especie	Referencia
<i>Arid1a</i>	Ratón	Mm00473838_m1
<i>HDAC6</i>	Humano	Hs_00997427_m1
<i>Vegfa</i>	Ratón	Mm00437304_m1
<i>IL6</i>	Ratón	Mm00446190_m1
<i>Tgfβ1</i>	Ratón	Mm00441724_m1
<i>Cxcl16</i>	Ratón	Mm00469712_m1
<i>CXCL16</i>	Humano	Hs00222859_m1
<i>Cxcr6</i>	Ratón	Mm02620517_s1
<i>CXCR6</i>	Humano	Hs01890898_s1
<i>Adam10</i>	Ratón	Mm00545742_m1
<i>ADAM10</i>	Humano	Hs00153853_m1
<i>GAPDH</i>	Ratón	Mm99999915_g1
<i>GAPDH</i>	Humano	Hs99999905_m1

**Tabla 9: Sondas empleadas para el análisis de expresión de RNA.** Tabla donde se detalla para cada sonda empleada en los análisis de expresión de mRNA el gen que amplifican, la especie y la referencia.

Los resultados se obtienen en forma de Ct (cycle threshold), que corresponde con el ciclo de PCR en el que comienza el crecimiento exponencial del producto de PCR y por ello la síntesis de la muestra analizada. Por lo que, cuanto mayor sea el valor del Ct obtenido menores son los niveles de expresión del gen en cuestión. Finalmente, la cantidad de mRNA relativa de cada gen es calculada analizando también la expresión de un gen de control interno o *house keeping* (en el caso de los experimentos llevados a cabo en esta tesis, el gen de control interno empleado fue el de la GAPDH) y empleando la siguiente fórmula:

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

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

A partir de estas fórmulas, el nivel relativo de mRNA relativo de la condición experimental respecto al control es  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ . Con estos valores se calcula la media de cada muestra entre los tres triplicados realizados y el error standard. Además, en todos los experimentos realizados se incluye un control negativo, para descartar la presencia de DNA genómico que pueda estar contaminando la muestra.

### 3.4.2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

#### 3.4.2.1. Western Blot (WB)

En este trabajo las muestras analizadas proceden de cultivos de líneas celulares o de cultivos primarios 3D. Para los tratamientos realizados en 2D, las células fueron plantadas a día 1 a un 70% de confluencia y transcurridas las 24h se añadieron los tratamientos correspondientes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación indicado, el medio fue retirado y se realizaron 3 lavados con PBS 1X para proceder con el lisado de las muestras. En el caso de los cultivos 3D, los tratamientos se hicieron en cuanto los cultivos en 3D habían sido generados, realizando la incubación con dichos tratamientos durante el tiempo indicado y pasado dichos tiempos, el medio fue aspirado y se realizaron tres lavados con PBS 1X.

Para la obtención de los **lisados celulares de WB**, tras los lavados con PBS1X se añadió directamente a la muestra buffer de lisado de proteína (compuesto por Tris HCl 50mM, NaCl 150mM, 1% de Tritón X-100, 0,1% de SDS, EDTA 1mM) y tras dejarlos incubar 10min a 4°C, con ayuda de un raspador, se recuperó el lisado. Este lisado fue sonicado a 20% haciendo pulsos de 8sec de sonicado y 8sec de incubación a 4°C (para asegurar la estabilidad de la proteína) durante 5 rondas. Seguidamente, para eliminar los restos no lisados, se realizó una centrifugación a 12.000rpm durante 20min a 4°C. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C.

Para determinar la **concentración proteica** se utilizó el método Lowry, empleando los reactivos comerciales de la casa BioRad y realizando una recta patrón con BSA (albúmina sérica bovina) de concentración proteica conocida. Brevemente, en una placa M96, en primer lugar, se añadieron 5µl de cada una de las muestras de la recta patrón y 3µl de cada una de las muestras de lisado. Para cada muestra fueron realizados triplicados. A continuación, a cada uno de los pocillos se le añadió 25 µl de reactivo A y seguidamente 200 µl de reactivo B, que es el sustrato fluorogénico. La reacción fue incubada durante 15min a temperatura ambiente y en agitación, protegido de la luz para que no afecte al reactivo B. Finalizado el tiempo de incubación, la absorbancia fue leída a 595 nm en el espectrofotómetro (Biotek). Estos valores de absorbancia fueron extrapolados con los de la recta patrón, obteniéndose así la concentración proteica de cada una de las muestras.

Para la **preparación de las muestras** de WB, se cogió la misma cantidad de proteína para cada muestra y los volúmenes se equilibraron a 20µl con buffer de lisado de proteína y se añadieron 5µl de buffer de carga (*loading buffer*, LB) compuesto por (10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM β-mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8 y azul de bromofenol). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 5min para acabar la desnaturalización proteica.

Para la **separación proteica por electroforesis** se emplearon geles de poliacrilamida con SDS. Estos geles son desnaturalizantes, lo que permite la separación de las diferentes proteínas de las muestras en función de sus pesos moleculares. Estos geles fueron preparados a partir de la solución ACRYL/BIS (BioRad), que contiene el 39% de poliacrilamida y un 1% de de bis-



acrilamida. La polimerización tuvo lugar mediante la adición de 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) que actúa como iniciador de la reacción y persulfato de amonio (Sigma-Aldrich) al 0,05% que actúa como catalizador. Los geles que se emplearon fueron discontinuos, formados por dos partes con diferentes porcentajes de acrilamida cada uno. En la parte superior se encontraba el gel apilador, en el cual se cargan las muestras y se utiliza para concentrar el frente de migración de las proteínas de manera que todas entren a la vez en el gel separador. Éste está constituido por un 5% de acrilamida y está preparado con tampón 125 $\mu$ M Tris-HCl a pH 6,8. Por otro lado, el gel separador es el encargado de la separación de las proteínas en función de su peso molecular y está preparado por 375 $\mu$ M Tris-HCl a pH 8,8, y el porcentaje de acrilamida que presenta dependió del peso molecular de las proteínas a detectar, pudiendo oscilar desde un 7% hasta un 15%. Una vez preparados los geles, las muestras fueron cargadas en ellos y se dejaron migrar a través de dicho gel a un voltaje de 120V en un tampón de migración (25 mM Tris 25; 1,44% de glicina y 0,1% de SDS) en el sistema MiniProtean® de BioRad. Remarca que uno de los carriles siempre se componía de un marcador de pesos moleculares pre teñido (Page Ruler, ThermoFisher Scientific), con tal de tener posteriormente la referencia del peso molecular de las proteínas detectadas.

Finalizado el proceso de separación, se procedió a la **transferencia de proteínas** de los geles a una membrana de PDVF (Immobilon-P, Millipore). Para ello, se usó el sistema de transferencia MiniProtean® de BioRad, donde se forma un sándwich con el gel, la membrana, dos papeles Watman (REF) y dos esponjas. Éste se coloca en una solución de transferencia (25 mM Tris 25 i 192 mM glicina a pH=8,3), con un bloque de hielo que mantiene frío el proceso de transferencia y se deja transferir durante 1h y 30min a voltaje constante de 90V. Al acabar la transferencia, para evitar los ruidos de fondo provocados por uniones inespecíficas, se incubó la membrana en una solución de bloqueo con leche desnatada en polvo al 5% en un tampón denominado TBS-t formado por 20 mM Tris a pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,1% de Tween 20, durante 1h a temperatura ambiente y luego es lavada tres veces durante 15min con solamente TBS

Posteriormente, la membrana es **incubada con el anticuerpo** de interés durante 16h a 4°C. Los anticuerpos empelados en la tesis y sus diluciones se encuentran en la tabla 10 detallados. La dilución de los anticuerpos primarios fue preparada en una solución de TBS-T con 3% de BSA y 0,02% de Azida sódica, que evita contaminaciones bacterianas y permite reutilizar el anticuerpo. Pasado el tiempo de incubación, la membrana fue lavada tres veces durante 15min con TBS-t e incubada con el anticuerpo secundario, acoplado a Peroxidasa de rábano picante (HRP), durante 1h a temperatura ambiente (diluciones y anticuerpos detallados en la tabla 10) y lavada con TBS-t 3 veces durante 15min.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
<b>Anti-ARID1A</b>	1/500	Cell signaling, 12354
<b>Anti-GAPDH</b>	1/10000	Abcam, ab8245
<b>Anti-p16</b>	1/500	Santa cruz, sc-1661
<b>Anti-p21</b>	1/500	Santa cruz, sc-817
<b>Anti-Ciclina D1</b>	1/500	Santa Cruz, sc-20044
<b>Anti-Ciclina E</b>	1/500	Santa Cruz, sc-247
<b>Anti-Ciclina B</b>	1/100	Santa Cruz, sc-166210
<b>Anti-CDK2</b>	1/500	Santa Cruz, sc-748
<b>Anti-CDK 4/6</b>	1/1000	Abcam, 3112
<b>Anti-CDK1</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-8395
<b>Anti-phospho-CDK1 (Tyr15)</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-136014
<b>Anti-phospho-chk2 (Thr68)</b>	1/1000	Cell signaling, 2197
<b>Anti-chk2</b>	1/500	Santa Cruz, sc-5278
<b>Anti-chk1 (Ser 345)</b>	1/1000	Cell Signaling, 2348
<b>Anti-chk1</b>	1/500	Santa Cruz, sc-8408
<b>Anti-p-53 (Ser15)</b>	1/1000	Cell Signaling, 9284
<b>Anti-Ac-p53 (Lys 373-382)</b>	1/1000	Sigma-Aldrich, 06-916
<b>Anti-p53</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-126
<b>Anti-CDC25</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-13138
<b>Anti-caspasa3 cortada</b>	1/500	Cell Signaling, 9661
<b>Anti-caspasa3</b>	1/1000	Cell Signaling, 9662
<b>Anti-PARP cortada</b>	1/1000	Cell Signaling, 5625

<b>Anti-PARP</b>	1/500	Santa Cruz, sc-8007
<b>Anti-E-cadherin</b>	1/1000	BD Biosciences, 610181
<b>Anti-β-catenina</b>	1/1000	BD Biosciences, 610153
<b>Anti-Vimentina</b>	1/1000	BD bioscience, 550513
<b>Anti-MMP2</b>	1/250	Santa Cruz, sc-13594
<b>Anti-SNAIL</b>	1/1000	Cell Signaling, 3879
<b>Anti-ZEB</b>	1/500	Santa cruz, sc- 515797
<b>Anti-phosph-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)</b>	1/1000	Biolegend, 22.675505
<b>Anti-pan-ERK1/2</b>	1/1000	BD Biosciences, 610623
<b>Anti-phospho- SAPK/JNK (Thr183/185)</b>	1/1000	Cell Signaling, 9251
<b>Anti-SAP/JNK</b>	1/1000	Cell Signaling, 9258
<b>Anti-phospho- p38α/β (Thr180/Tyr185)</b>	1/1000	Cell Signaling, 4511
<b>Anti-p38 α/β</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-7972
<b>Anti-c-Fos</b>	1/1000	Cell Signalling, 5348
<b>Anti-phospho-MNK1 (Thr197/202)</b>	1/1000	Cell Signaling, 2111
<b>Anti-HDAC6</b>	1/1000	CellSignaling, 7612
<b>Anti-Ku70</b>	1/500	Santa Cruz, sc-17789
<b>Anti-XRCC4</b>	1/500	Santa Cruz, sc-5282
<b>Anti-p-ATM (S1981)</b>	1/500	Abcam, ab208775
<b>Anti-ATM</b>	1/200	Santa Cruz, sc- 135663

<b>Anti-Phospho-ATR (Ser428)</b>	1/1000	CellSignalling, 2853
<b>Anti-ATR</b>	1/200	Santa Cruz, sc-515173
<b>Anti-N-cadherina</b>	1/500	Santa Cruz, sc-7939
<b>Anti-FAP</b>	1/500	Santa Cruz, sc-100528
<b>Anti-<math>\alpha</math>-SMA</b>	1/500	Santa Cruz, sc-53015
<b>Anti- p-PDGFR<math>\alpha</math> (Tyr754)</b>	1/200	Santa Cruz, sc-12911
<b>Anti-p-NFKb-p50 (Ser337)</b>	1/500	Santa Cruz, sc-101744
<b>Anti-p-NFKb-p65 (Ser536)</b>	1/500	Cell signaling, 3033
<b>Anti-IL6</b>	1/500	Santa Cruz, sc-57315
<b>Anti-ER<math>\alpha</math></b>	1/500	Cell signaling, 2511
<b>Anti-CD31</b>	1/1000	
<b>Anti-CD45</b>	1/1000	Abcam, ab10558
<b>Anti-CXCL16</b>	1/500	Santa Cruz, sc-514363
<b>Anti-CXCR6</b>	1/1000	Abcam, ab125115
<b>Anti-ADAM10</b>	1/1000	Merkel, AB19026
<b>Anti-MMP9</b>	1/200	Santa Cruz, sc-393859
<b>Anti-phospho-FAK (Tyr397)</b>	1/1000	Thermo Fisher,700255
<b>Anti-YAP</b>	1/1000	Santa Cruz, sc-101199
<b>Anti-phospho-paxilina (Tyr118)</b>	1/1000	Cell signaling, 2541
<b>Anti-Conejo IgG-HRP</b>	1/10000	Jackson, 111-035-003

Anti-Ratón IgG-HRP	1/10000	Jackson, 115-035-003
Anti-Cabra IgG-HRP	1/10000	Jackson, 705-035-147

**Tabla 10: Anticuerpos empleados en el western blot.** Tabla donde se detalla para cada anticuerpo empleado en los análisis de expresión por westernblot, la dilución a la que se emplea y la referencia del producto.

Finalmente, ya puede realizarse la visualización de la inmunodetección proteica, gracias a la peroxidasa del anticuerpo secundario. Para la detección las membranas fueron incubadas durante 3min a temperatura ambiente con el reactivo comercial Luminata Forte Wertern HRP substrate (Millpore). Este reactivo asocia la catálisis del agua oxigenada a la oxidación de luminol, produciendo un incremento de la quimioluminiscencia. Por último, la membrana se visualiza con el sistema de documentación ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad) y se analiza con el programa informático asociado, Image Lab.

### 3.4.2.2. Inmunocitofluorescencia (ICF)

Para la detección por fluorescencia de proteínas de células en cultivo, los cultivos 2D o 3D de interés fueron fijados con PFA 4% durante 15min a temperatura ambiente y lavados tres veces con PBS 1X. Dependiendo del anticuerpo a usar y la localización celular de la proteína a detectar la permeabilización fue o con tritón X-100 al 0,1% en PBS 1X durante 5min o con metanol 100% frío durante 5 min y se realizaron de nuevo tres lavados con PBS 1X. A continuación, se realizó una incubación durante 1h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por PBS con 2% de HS, 2% BSA y 0,2% de Tritón X-100), con el fin de evitar uniones inespecíficas. Después, los cultivos fueron incubados durante 16h a 4°C y agitación constante con los anticuerpos primarios indicados diluidos en PBS1X. Los detalles son mostrados en la tabla 11.

Anticuerpo	Dilución	Permeabilización	Referencia
Anti-phospho- $\gamma$ H2AX (Ser139)	1/200	Metanol	Sigma-Aldrich, 05-636
Anti-phospho-Histone H3 (Ser10)	1/200	Metanol	BD Biosciences, 556433

<b>Anti- caspase3 cortada</b>	1/200	Tritón X-100	Cell signaling, 9661
<b>Anti-CDH1/E-Cadherina</b>	1/200	Tritón X-100	BD Biosciences, 610181
<b>Rodamina-conjugada faloidina</b>	1/500	Tritón X-100	Sigma-Aldrich, P1951
<b>Anti-β-catenina</b>	1/200	Tritón X-100	BD Biosciences, 610153
<b>Anti-Vimentina</b>	1/200	Metanol	BD bioscience, 550513
<b>Anti- Citoqueratina de amplio espectro</b>	1/200	Metanol	Abcam, ab9377
<b>Anti-HDAC6</b>	1/200	Tritón X-100	Abcam, ab1440
<b>Anti-α-tubulina</b>	1/500	Tritón X-100	Sigma-Aldrich, T9026
<b>Anti-GFP</b>			
<b>Anti-FAP</b>	1/200	Tritón X-100	Santa Cruz, sc-100528
<b>Anti-α-SMA</b>	1/200	Tritón X-100	Santa Cruz, sc-53015
<b>Anti-COL1A</b>	1/200	Tritón X-100	Cell signaling 39952
<b>Anti-CXCL16</b>	1/200	Tritón X-100	Santa Cruz, sc-514363
<b>Anti-YAP</b>	1/200	Metanol	Santa Cruz, sc-101199
<b>Anti-phospho-paxilina (Tyr118)</b>	1/200	Tritón X-100	Cell signaling, 2541
<b>Anti-phospho-MLY2 (Ser19)</b>	1/200	Tritón X-100	Cell signaling, 3671

**Tabla 11: Anticuerpos primarios empleados en la ICF.** Tabla donde se detalla para cada anticuerpo empleado en los análisis de expresión de ICF, la dilución a la que se emplea, la permeabilización usada y la referencia del producto.

Transcurrido este periodo de incubación, se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se realizó la incubación con una solución de PBS1X que contenía los anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos (detalles indicados en la tabla 12) y Hoechst (Sigma-Aldrich) a 1/100 (para realizar la tinción nuclear). Esta incubación fue de 1h a temperatura ambiente en el caso de los cultivos 2D, y de 16 a 4°C en el caso de los 3D, ambos en agitación continua. Transcurridas las correspondientes incubaciones, se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 10min a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
IgG Alexa Fluor 594 Ratón	1/250	Thermofisher, A11005
IgG Alexa Fluor 588 Ratón	1/250	Thermofisher, A11001
IgG Alexa Fluor 594 conejo	1/250	Thermofisher, A11002
IgG Alexa Fluor 488 Conejo	1/250	Thermofisher, A11029
IgG Alexa Fluor 594 Rata	1/250	Thermofisher, A21209

**Tabla 12: Anticuerpos secundarios empleados en la inmunofluorescencia.** Tabla donde se detalla para cada anticuerpo empleado en los análisis de expresión de ICF la especie que reconoce, la dilución a la que se emplea y la referencia del producto.

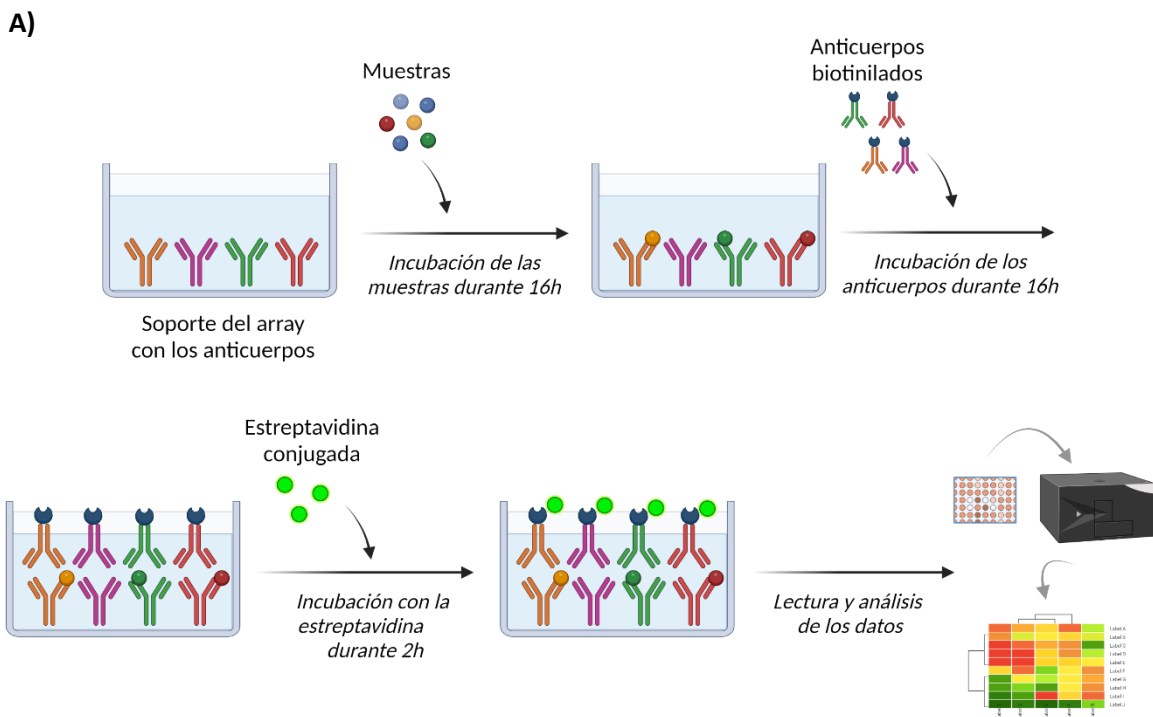
Las imágenes de los resultados fueron obtenidas mediante el empleo del microscopio confocal FV1000 (Olympus) y analizadas con el software *ImageJ* (versión 1.46r; NIH, Bethesda, MD).

### 3.4.2.3. Array de detección de quimioquinas

En este trabajo, para el estudio del perfil de secreción de quimioquinas fue empleado el *Human Chemokine Array G1* (bioNova, RayBio®; AAH-CHE-G1-4) para la detección simultánea de 38 quimioquinas en el CM de las líneas celulares humanas indicadas. El primer paso fue la colocación del chip que contiene las sondas de las quimioquinas a detectar bajo una campana de flujo laminar durante 2h para conseguir su secado completo. Posteriormente, se añadieron 100µl de buffer de bloqueo y se incubó durante 30min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se aspiró el buffer, se añadieron 100µl de las muestras indicadas a cada sub-array y se dejó incubar durante 16h a 4°C en agitación. A continuación, se realizó un proceso de consecutivos lavados con diferentes buffers de lavado (propiciados por el kit) con tal de asegurar



la eliminación de posibles señales inespecíficas. Finalmente, para la detección se añadió 70µl por pozo de una mezcla de anticuerpos primarios conjugados a biotina, la cual se dejó incubar durante 16h a 4°C y en agitación constante. Consecutivamente, tras una secuencia de lavados, se añadieron 70µl por pozo de una solución de estreptavidina marcada con un fluoróforo (por lo que a partir de aquí siempre fue protegido de la luz) y se dejó incubar durante 2h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, con tal de eliminar bien todos los retos y evitar señales inespecíficas se realizó varios lavados consecutivos con diferentes buffers de lavado y finalmente se dejó secar bajo una cabina de flujo laminar. Por último, se procedió al análisis usando un escáner láser (Innopsys 'InnoScan®) utilizando el canal cy3 o "verde" con una frecuencia de excitación de 532 nm. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de citoquina de la muestra problema. El método de detección del array se encuentra representado en la figura 29.



**Figura 29. Esquema representativo del flujo de trabajo del array.** A) Diagrama representativo del funcionamiento del array y los pasos seguidos durante la realización del protocolo desde la incubación con las muestras hasta su lectura y análisis. Creado con BioRender.com

Para el análisis, el programa de escáner de fluorescencia láser tiene una opción para medir automáticamente el ruido de fondo local en torno a cada punto/spot/citoquina. A este valor se le restó el ruido de fondo mediante el parámetro MEDIA-B532. Después, se normalizaron los datos mediante la siguiente fórmula:

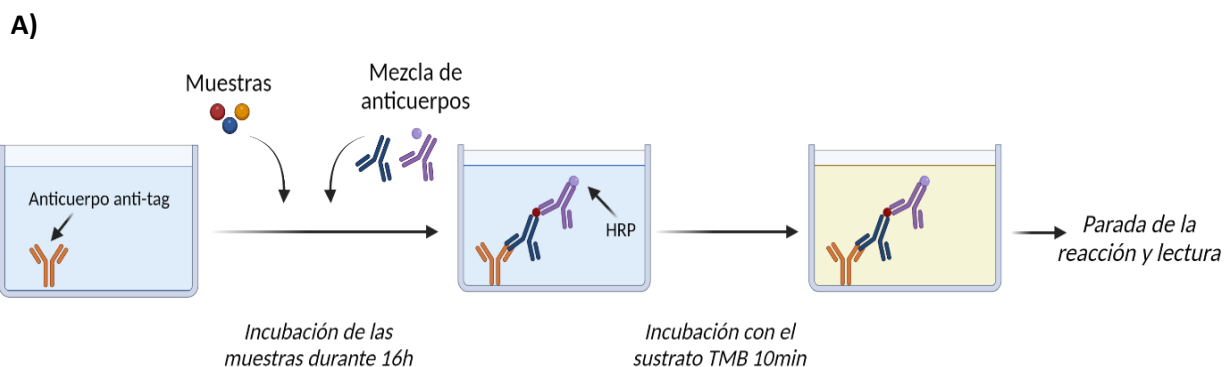
$$X(Ny) = X(y) \times \frac{P1}{P(y)}$$

Donde P1 es la intensidad de la señal media de los puntos de los controles positivos en la matriz de referencia predeterminada,  $P(y)$  es la intensidad de señal media de los puntos de los controles positivos de la matriz problema "i",  $X(y)$  es la intensidad de la señal media para el punto "X" a la matriz "i" y  $X(Ny)$  es la intensidad de la señal normalizada para el punto X a la matriz "i".

Tras haber normalizado todos los datos, los valores fueron referenciados según la cantidad de proteína existente en la placa celular, previamente cuantificada mediante el método de Lowry (explicado en el punto 3.4.2.1). Finalmente, para la realización del *Heatmap* y el análisis de componentes principales (PCA), los datos fueron analizados y representados mediante el uso del software ClustVis<sup>123</sup>. Para el clustering del *heatmap*, en el agrupamiento jerárquico se empleó la distancia euclidiana y el método de agrupación de los datos se basó en el promedio. Para el análisis de la cantidad relativa de cada citoquina en las diferentes muestras, los datos fueron analizados y representados mediante el software GraphPad Prism v8.

#### 3.4.2.4. Elisa de detección de CXCL16

Para la detección y cuantificación de la quimioquina CXCL16 en las muestras, en esta tesis se empleó el kit de Elisa ab187397 (Abcam), para las muestras de procedencia humana y el kit de Elisa ab100677 (Abcam), para las muestras de origen murino. Para su realización, en ambos casos lo primero que se hizo fue añadir a cada pozo 50µl de estándar (para calcular la recta patrón) o de la muestra de interés. A continuación, se añadió 50µl de una solución del anticuerpo y se incubó durante 16h a 4°C y en agitación constante. Al finalizar la incubación, se realizaron lavados con el buffer de lavado soportado por el kit y se añadió 100µl de la solución que poseía los sustratos TMB de la HRP a la que los anticuerpos se encontraban conjugados para así lugar a una reacción colorimétrica. Transcurridos 10min a temperatura ambiente en agitación, dicha reacción se paró añadiendo 100µl de la solución de parada y la absorbancia de la señal colorimétrica fue analizada por el espectrofotómetro (Biotek) a 450nm de longitud de onda. El método de detección del elisa se encuentra representado en la figura 30.



**Figura 30. Esquema representativo del flujo de trabajo del elisa.** A) Diagrama representativo del funcionamiento del elisa y los pasos seguidos durante la realización del protocolo, desde la incubación con las muestras hasta su lectura y análisis. Creado con BioRender.com

Para el análisis de los datos se creó una curva con los valores de los estándares y los datos obtenidos de las muestras fueron extrapolados a partir de dicha curva, obteniéndose la concentración de CXCL16 presente en cada muestra.

### 3.5. ENSAYOS BASADOS EN CÉLULAS

---

#### 3.5.1. ANÁLISIS DEL PERÍMETRO GLANDULAR

Una vez establecidos los cultivos de glándulas 3D es posible determinar sus perímetros glandulares pudiéndose evaluar su tasa de proliferación. Para la realización de dicho análisis en primer lugar se capturaron imágenes representativas de cada condición con un microscopio confocal FV1000 (Olympus). Posteriormente para realizar las medidas de los perímetros de las glándulas, se empleó el software *ImageJ* (version 1.46r; NIH, Bethesda, MD). De cada condición, el perímetro de al menos 100 glándulas fue analizado.

#### 3.5.2. ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE INVASIÓN DE LOS CULTIVOS 3D

Una vez establecidos los cultivos de glándulas 3D es posible determinar su índice de invasión en el Matrigel las diferentes condiciones. Para la realización de dicho análisis, en primer lugar se capturaron imágenes representativas de cada condición con un microscopio confocal FV1000 (Olympus). Posteriormente, empleando el software *ImageJ* (version 1.46r; NIH, Bethesda, MD), se realizaron las medidas de las áreas de todas las glándulas (tanto invasivas como no invasivas) y el área de las glándulas no invasivas y el índice de invasión se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de invasión} = 1 - \frac{\text{Área de glándulas no invasivas}}{\text{Área de todas las glándulas}}$$

#### 3.5.3. ENSAYOS DE INCORPORACIÓN DE BROMODEOXYURIDINA (BDRU)

Para el análisis de la incorporación de la Brdu al DNA tras los tratamientos indicados, tanto los cultivos 2D como los 3D fueron incubados con 3ng/ml de 5-bromodeoxyuridina (Sigma-Aldrich) durante 1h en el caso de los cultivos 2D o 16h en el caso de los cultivos 3D, a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado dicho periodo de incubación los cultivos fueron fijados con PFA al 4% durante 20min a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó la desnaturalización del

DNA con el uso de HCl a una concentración de 2 mol/L durante 30min a temperatura ambiente. Después se neutralizó con 0,1 mol/L de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O a pH8,5 durante 2min y se lavó tres veces con PBS 1X. Posteriormente, se realizó una incubación con una solución de bloqueo (HS al 5 %, FBS al 5 %, glicina al 0,2 % y Triton X-100 al 0,1 %) y finalmente se incubó con el anticuerpo primario contra BdrU siguiendo los pasos indicados en el punto 3.4.2.2.

#### 3.5.4. ANÁLISIS DEL PERFIL DEL CICLO CELULAR

Los cambios en el perfil del ciclo celular de las diferentes condiciones, fueron analizados por medio de la realización de tinción con yoduro de propidio y el análisis por citometría de flujo. 1x10<sup>6</sup> células de la condición deseada fueron fijadas con etanol frío al 70% durante al menos 1h en hielo (el etanol fue echado mientras la muestra era agitada con tal de evitar la formación de agregados). Después, las células fueron resuspendidas en 2ml de buffer de ciclo celular, compuesto por 20mg/ml de yoduro de propidio, 0,1% de Tritón X-100 y 50 mg/ml de RNAsa A en PBS 1X, e incubadas durante 1h a 37°C. Finalmente, la emisión de fluorescencia del yoduro de propidio fue analizada usando un FACS-Canto II /BD Bioscience), y la distribución del ciclo celular fue realizada con el uso del software MODFIT LT (Verity SoftwareHouse).

#### 3.5.5. ENSAYO DE DUPLICACIÓN DE POBLACIÓN ACUMULADA

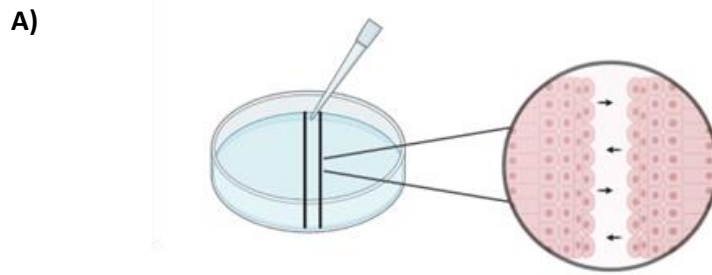
Para analizar la duplicación de población acumulada (PDs), las células de interés fueron plantadas a una densidad de 1x10<sup>4</sup> células por pozo en una placa de 6 pozos. Las células fueron contadas cada dos días durante un periodo total de 15 días. Después, se diseñó una curva de crecimiento y el PD fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$PD = (\log_2 n_2 - \log_2 n_1)$$

Donde n<sub>1</sub> es la población contada a día 1 y n<sub>2</sub> es la población contada a día 3. La PD acumulada se calcula sumando las PDs anteriores.

#### 3.5.6. ENSAYO DE MIGRACIÓN DE WOUND HEALING

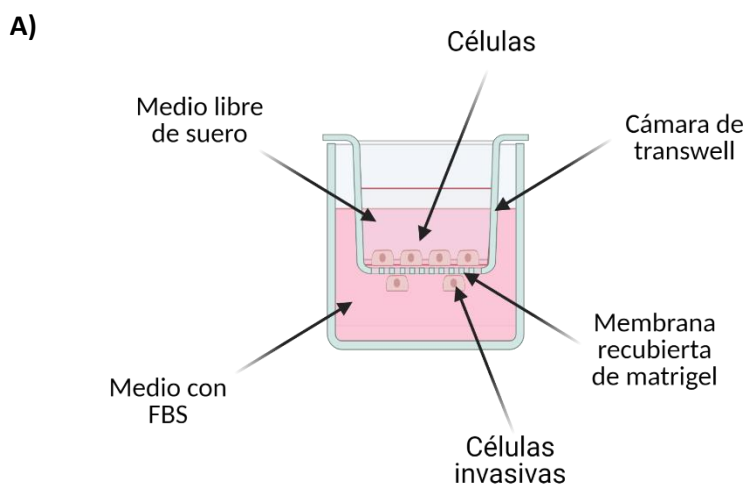
Para evaluar la migración celular mediante ensayos de wound healing, se plantaron 6x10<sup>4</sup> células de interés por pozo, en una placa de 24 pocillos y realizándose triplicados de cada condición. Cuando las células habían alcanzado el 70% de confluencia, una herida fue realizada con la parte final de una punta de 200µl y se realizó un lavado con PBS 1X para eliminar los posibles restos de células flotantes en el medio y se añadió medio nuevo fresco o el medio de interés a analizar (figura 31). Para cada pocillo, tres fotografías a diferentes alturas fueron realizadas a tiempo 0, las cuales fueron replicadas transcurridas las 48h de incubación a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, el análisis del % de herida cerrada fue calculado mediante el software *Image J*.



**Figura 31. Imagen representativa del experimento de migración de wound healing.** A) Imagen representativa donde se indica la herida formada con la pipeta y como las células migrarían para intentar cerrar dicha herida. Creado con BioRender.com

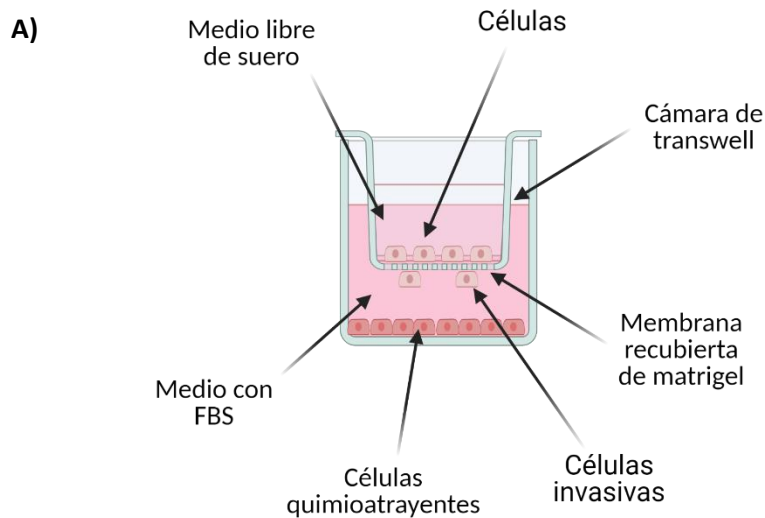
### 3.5.7. ENSAYO DE INVASIÓN DE TRANSWELL

Para evaluar la capacidad de invasión mediante ensayos de invasión de transwell clásicos, las células de interés (en el caso de querer ver el efecto de un tratamiento habían sido previamente tratadas bajo las condiciones indicadas) fueron plantadas a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pozo en 500  $\mu$ l de medio DMEM sin suero, en la parte superior de una cámara de transwell (8  $\mu$ m de poro; Falcon) previamente cubierta con una capa de Matrigel disuelto en medio DMEM (libre de suero) y puestas en pocillos de placas de M24. Al otro lado de la cámara de transwell, FBS al 10% fue usado como quimioatrayente diluido en medio DMEM (figura 32). Tras una incubación de 48h a 37°C C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>, las células fueron fijadas por ambos lados de la cámara con PFA 4% durante 15min a temperatura ambiente. Para visualizar los núcleos celulares y poder analizar la invasión, las células fueron teñidas con 5mg/ml de Hoechst durante 15min a temperatura ambiente. Finalmente, se obtuvieron imágenes de los resultados antes y después de frotar con un algodón (para eliminar así las células que no habían migrado) con un microscopio de epifluorescencia (Leica, Wet-zlar), Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el uso del software *Image J*.



**Figura 32. Imagen representativa del experimento de invasión de transwell clásico.** A) Imagen representativa donde se indica las partes que forman parte del experimento de invasión de transwell y los diferentes compartimentos donde se encuentran. Creado con BioRender.com

En el caso de los experimentos de transwell donde como quimioatrayente se empleó también células de interés plantadas en la base del pocillo, 16h antes de la realización del ensayo de transwell  $10^6$  células (de las cuales se quería evaluar su capacidad de quimioatracción) fueron plantadas en la base de un pocillo de placas de M24 a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se procedió a realizar el experimento de transwell de igual manera que en el protocolo clásico previamente explicado. Imagen representativa es mostrada en la figura 33.



**Figura 33. Imagen representativa del experimento de invasión de transwell usando células de interés como quimioatrayente.** A) Imagen representativa donde se indica las partes que forman parte del experimento de invasión de transwell y los diferentes compartimentos donde se encuentran. Creado con BioRender.com

### 3.5.8. ANÁLISIS DE CONJUNTOS DE DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CARCINOMA ENDOMETRIAL

Los datos de expresión génica (RSEM) y su información clínica relacionada de los pacientes del TCGA-UCEC<sup>124</sup> fue descargada de la plataforma bioinformática cbioportal<sup>125,126</sup> y fue usada para identificar las muestras del quinto quintil (20% alto) y las del primer quintil (20% bajo) según los valores de expresión de ARID1A. Los recuentos sin procesar de TCGA-UCEC fueron descargados desde Xena Browser<sup>127</sup>, se invirtieron a log<sub>2</sub> y se usaron para calcular el análisis de expresión diferencial entre muestras de expresión ARID1A alta y baja usando DESeq2<sup>128</sup>. Después, los transcritos fueron anotados en los genes usando el paquete org.Hs.eg.dbR, manteniendo la transcripción con el P valor más bajo por gen. Finalmente, los genes se clasificaron de acuerdo con los P valores y el GSEA preclasificado<sup>129</sup> se implementó utilizando parámetros predeterminados y conjuntos de genes de MsigDB<sup>130</sup>, en particular, conjuntos de genes KEGG, Ontology y Hallmark.

### 3.5.9. ENSAYOS DE CONTRACTIBILIDAD

Para evaluar la capacidad de contraer geles de las células estromales, ensayos de contractibilidad de geles de colágeno fueron realizados. Para ello, 250.000 células estromales de interés por gel fueron resuspendidas en 100µl de una mezcla de colágeno 2mg/ml y Matrigel en una proporción 1:1. Estos geles se pusieron en pocillos de placas de M24 y se incubaron durante 1h a 37°C con saturación de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se añadieron 500µl del medio de las células estromales y se dejó incubar entre 5-6 días. La contracción de los geles de colágeno fue monitorizada mediante el escaneo de las placas. Para el análisis de los resultados, el área relativa del pocillo y del gel fue medida usando el software *Image J*, y el porcentaje de contractibilidad fue usado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de contractibilidad} = \frac{\text{Área del pocillo} - \text{Área del gel}}{\text{Área del pocillo}} \times 100$$

### 3.6. ANÁLISIS *IN SILICO* EXPRESIÓN MRNA TCGA

---

Para el análisis *in silico* realizado en esta tesis, de la expresión de mRNA de los genes indicados de la base de datos del TCGA-UCEC<sup>124</sup>, se realizó la normalización y separación de los datos según la expresión de *ARID1A* en las muestras de CEE con la herramienta bioinformática *cBioportal*. Los datos obtenidos fueron descargados, analizados y representados mediante el empleo del software *GraphPad Prism v8*. Se analizaron le mRNA de 257 muestras de CEE con y sin alteraciones de *ARID1A*. Solamente fueron consideradas muestras con más del 70% de contenido de células tumorales.



### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

---

Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos replicados 3 veces independientes, con al menos 3 replicados técnicos.

El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo con el software GraphPad Prism v8 para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados de las diferentes muestras. Los resultados fueron presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (SD).

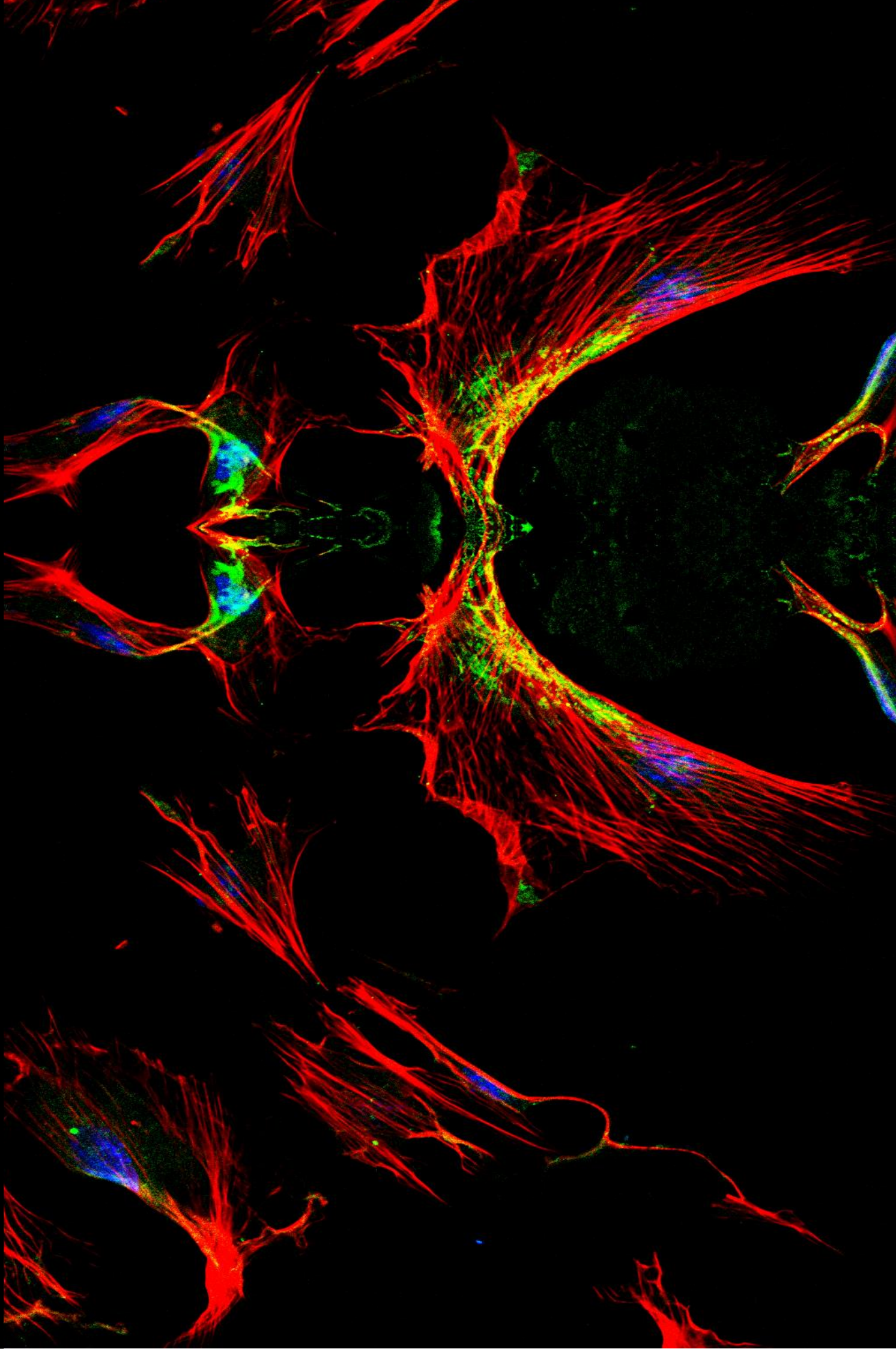
De todos los análisis estadísticos se fijaron un nivel de significancia estadística de  $p=0,05$ , corrigiendo los p-valores por el test de comparaciones múltiples cuando ha sido adecuado. Los datos fueron analizados usando el test estadístico más apropiado para cada momento y los p-valores se encuentran indicados en las figuras.

En resumen, para el **análisis de las medias**, la significación estadística fue verificada por medio de la aplicación de la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, seguida, en el caso de los datos paramétricos, de la prueba T de Student o la prueba One-way ANOVA (en función de si la comparación era entre solamente dos variables o lo era entre más de dos, respectivamente) y comparaciones múltiples mediante el test de Tukey. Para el caso de los datos no paramétricos, se empleó la prueba de Mann-Whitney para la comparación de dos variables o la de Kruskal-Wallis para más de dos. Para la evaluación de la relación de una variable principal sobre el resto de variables independientes como sobre el resto de variables principales, se realizó la prueba de Two-way ANOVA seguido de una prueba post-hoc Bonferroni.

Para todos los **análisis de columnas**, comparaciones de tablas de contingencia, fue usado el test de Fisher's F para comparar las varianzas.

Los **análisis de correlación** de la colocación en las inmunofluorescencias, se realizó un test de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95%.

El **análisis por pares de las curvas de supervivencia** de Kaplan-Meier fue llevado a cabo usando el test Mantel-Cox Log-rank.



## 4. RESULTADOS

*“Un verdadero científico resuelve problemas, no se lamenta por no poder resolverlos”*

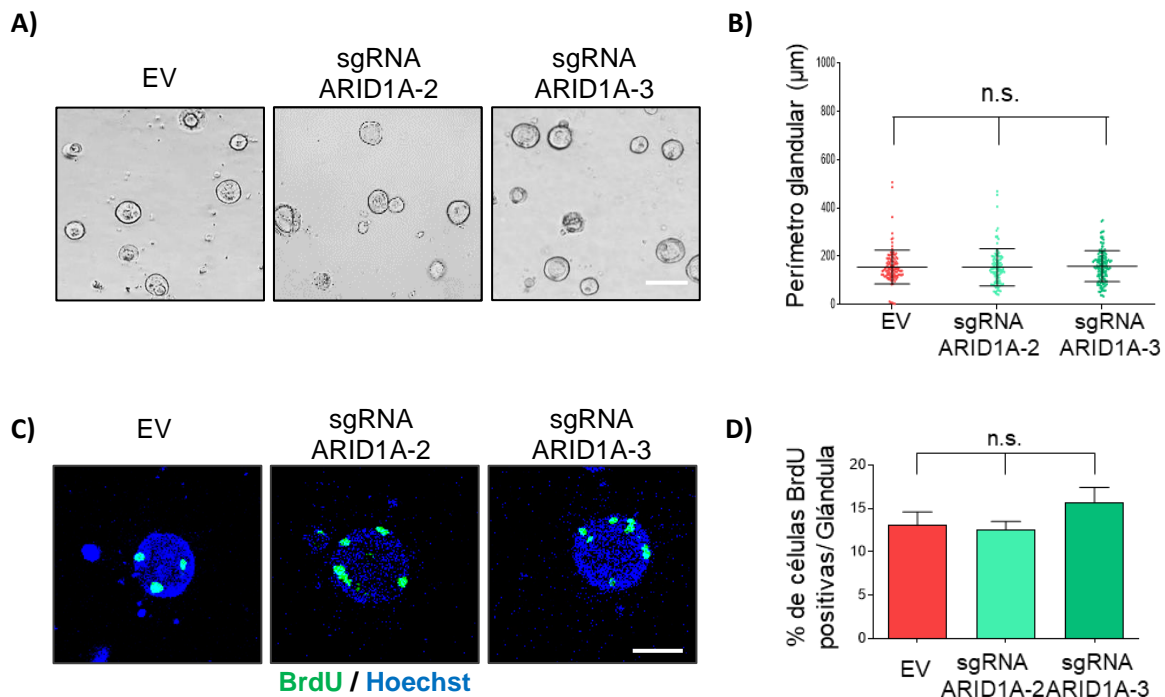
**Anne McCaffrey**



## 1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE ARID1A EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

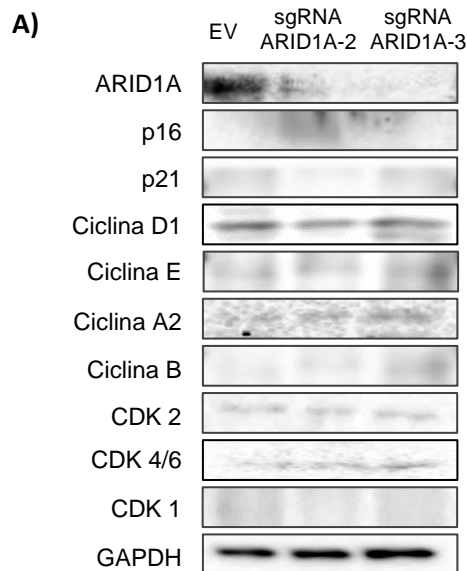
### 1.1. Estudio de la implicación de la pérdida de expresión de ARID1A en el inicio de la transformación maligna endometrial.

Con el objetivo de determinar si la alteración de la expresión de ARID1A en el endometrio se encontraba relacionada con la iniciación del CE, primero de todo se establecieron cultivos tridimensionales (3D) de células epiteliales endometriales de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA generados contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3). Entre ocho y diez días posteriores a dicha infección, las ratios de proliferación fueron analizadas mediante el análisis del perímetro glandular, complementados con ensayos de incorporación de BrdU. Como puede observarse en la figura 34, los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas entre las ratios de proliferación de las diferentes condiciones.



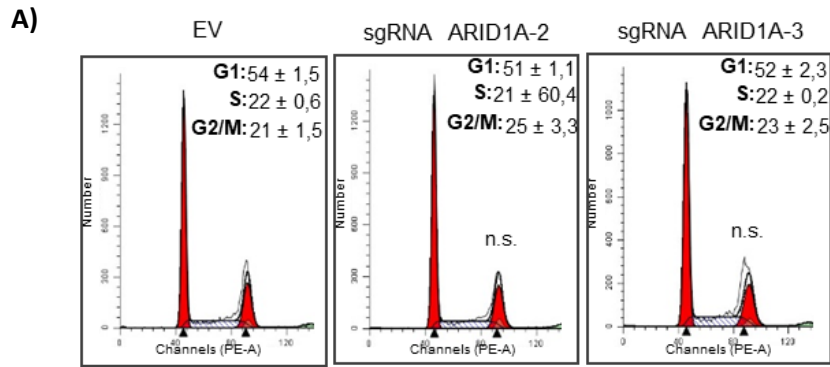
**Figura 34. La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón no afecta a las ratios de proliferación.** A) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y B) medición de los perímetros glandulares. Barra de escala: 100µm. C) Imágenes representativas de las células positivas para BrdU en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3), con núcleos evidenciados por tinción con Hoechst, y D) cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas por glándula. Barra de escala: 25 µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ). EV, vector vacío.

Para asegurar estos resultados, se decidió analizar los niveles de expresión de las proteínas clave reguladoras de la progresión del ciclo celular (Ciclina D1, Ciclina E, Ciclina A2, ciclina B, CDK2, CDK4 y CDK1), así como los de proteínas clave inhibitoras del ciclo celular (tales como p16 y p21), mediante ensayos de western blot, en los cultivos 3D de células epiteliales endometriales de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA generados contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3). No se observaron diferencias entre ninguna de las condiciones, en los niveles de expresión de ninguno de los marcadores analizados (Figura 35).



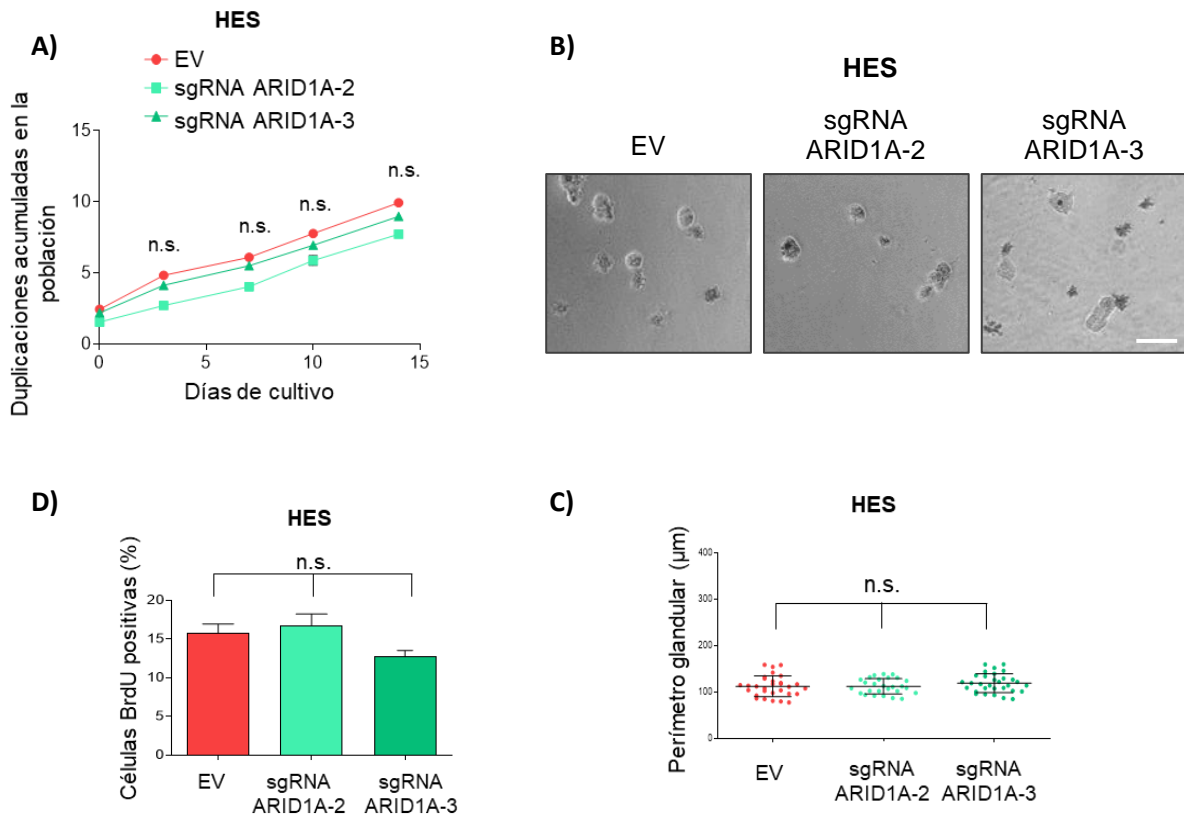
**Figura 35. La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón no afecta a los niveles de expresión claves para la progresión del ciclo celular.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de proteína de ARID1A, p16, p21, ciclina D1, ciclina E, ciclina A2, ciclina B, CDK2, CDK 4/6 y CDK1 de cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). GAPDH usada como control de carga. EV, vector vacío.

Finalmente, y con el fin de fortalecer estos resultados, mediante citometría de flujo (FACS) se realizó un análisis del perfil del ciclo celular de estos cultivos 3D. Como puede observarse en la figura 36, no se apreció ningún cambio en el perfil del ciclo celular en las células epiteliales de endometrio de ratón tras la regulación a la baja de los niveles de ARID1A.



**Figura 36. La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio de ratón no afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular.** A) Histograma representativo de la distribución del ciclo celular de por citometría de flujo (FACS) del perfil de las células epiteliales de endometrio de ratón infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *Arid1a* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ). EV, vector vacío.

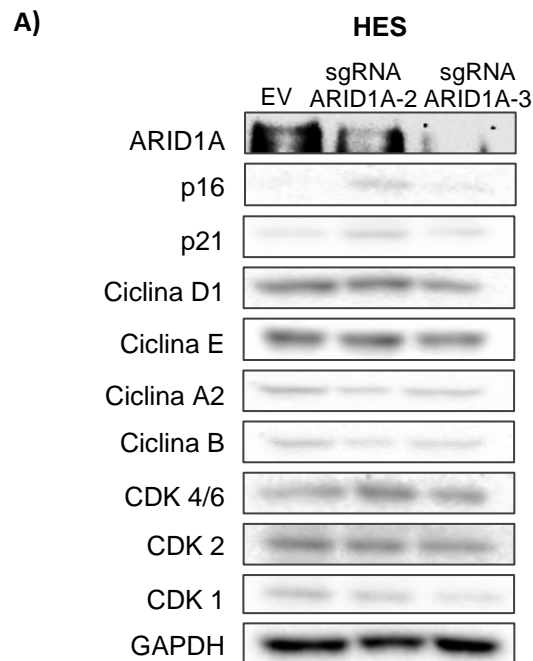
Además, con el fin de ratificar estos resultados en células humanas, se evaluó el efecto de la bajada de expresión de ARID1A, mediante el uso de sgRNA contra ARID1A en células HES (una línea celular, ampliamente usada, derivada espontáneamente de células primarias epiteliales endometriales humanas normales)<sup>131</sup>. Como puede observarse en la figura 37, los ensayos de duplicación acumulada de la población, los análisis del perímetro glandular de cultivos 3D y los ensayos de incorporación de BrdU, mostraron que la regulación a la baja de la expresión de ARID1A en estas células no suponía ninguna modificación en las ratios de proliferación.





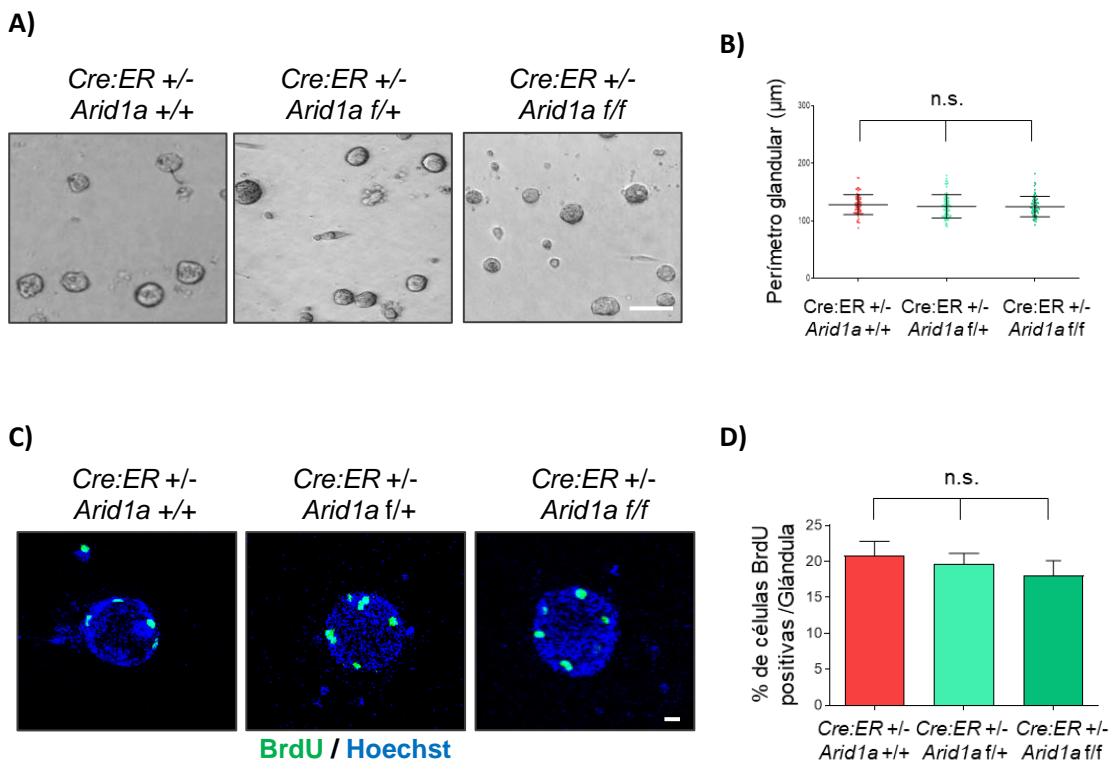
**Figura 37. La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio humanas (HES) no afecta a las ratios de proliferación.** A) Niveles de las duplicaciones acumuladas en la población de las células humanas endometriales HES infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) después de 15 días de cultivo. B) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D de células humanas endometriales HES infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y C) medición de los perímetros glandulares. Barra de escala: 100µm. D) Porcentaje de células positivas para BrdU en cultivos de células humanas endometriales HES infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ). EV, vector vacío.

Asimismo, tampoco se observaron diferencias entre dichas condiciones cuando se analizaron mediante ensayos de western blot, la expresión de las principales ciclinas, CDKs e inhibidores del ciclo celular (Figura 38).



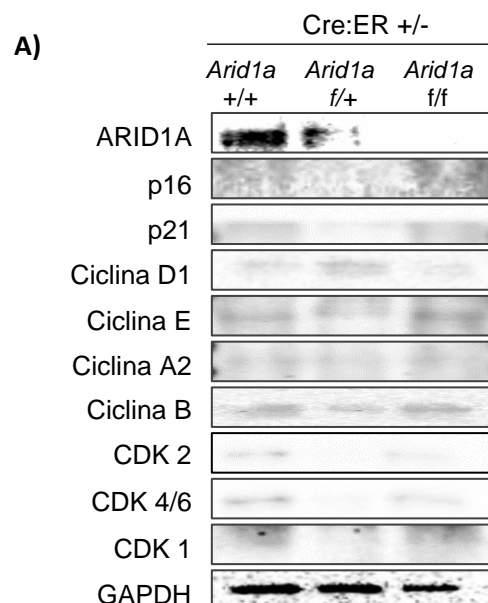
**Figura 38. La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos de células epiteliales de endometrio de humano (HES) no afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la progresión del ciclo celular.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de proteína de ARID1A, p16, p21, ciclina D1, ciclina E, ciclina A2, ciclina B, CDK2, CDK 4/6 y CDK1 de cultivos de células epiteliales de endometrio humano (HES) infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). GAPDH usada como control de carga. EV, vector vacío.

Paralelamente, con el fin de corroborar estos resultados en otro modelo, se realizaron cultivos 3D con células epiteliales de endometrios de ratones *Cre:ER<sup>T</sup>;Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ER<sup>T</sup>;Arid1a<sup>ff</sup>*. Como se esperaba, en concordancia con los resultados obtenidos, tanto el análisis del perímetro glandular como los ensayos de incorporación de BrdU, mostraron que no existían diferencias sustanciales entre las glándulas con fenotipo salvaje para *Arid1a* y las glándulas *Arid1a<sup>f/+</sup>* y *Arid1a<sup>ff</sup>* (figura 39).



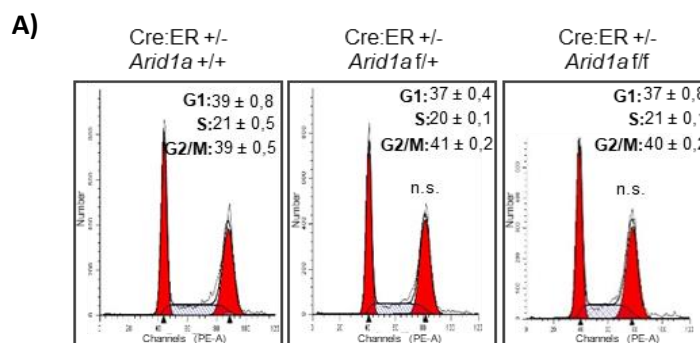
**Figura 39: La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* no afecta a las ratios de proliferación.** A) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>+/+</sup>* *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* en presencia de Tamoxifeno y B) medición de los perímetros glandulares. Barra de escala: 100µm. C) Imágenes representativas de las células positivas para BrdU en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>+/+</sup>* *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* en presencia de Tamoxifeno, con núcleos evidenciados por tinción con Hoechst, y D) cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas por glándula. Barra de escala: 25 µm. n.s. (no significativo, P≥0,05). EV, vector vacío.

Además, como se observa en la figura 40, no se apreciaron diferencias en la expresión de los niveles de proteína de las principales proteínas reguladoras del ciclo celular.



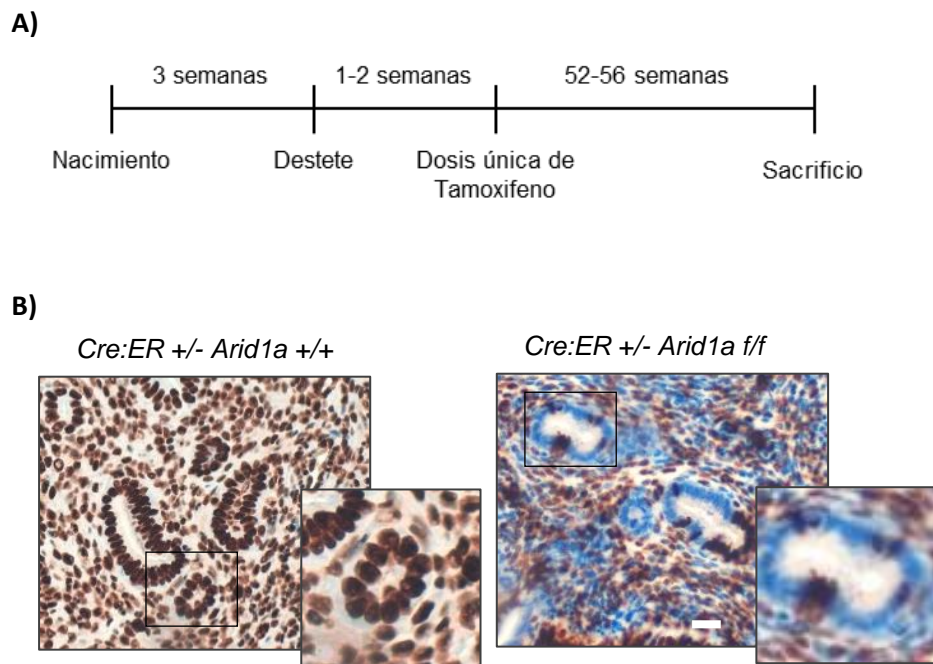
**Figura 40. La pérdida de expresión de ARID1A en cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* no afecta a los niveles de expresión claves para la progresión del ciclo celular.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de proteína de ARID1A, p16, p21, ciclina D1, ciclina E, ciclina A2, ciclina B, CDK2, CDK 4/6 y CDK1 de cultivos 3D de células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* en presencia de Tamoxifeno. GAPDH usada como control de carga. EV, vector vacío.

Finalmente, el análisis del perfil del ciclo celular de estos cultivos por medio de FACS corroboró que no existía ninguna diferencia entre los perfiles de las fases del ciclo celular de las diferentes condiciones (Figura 41).



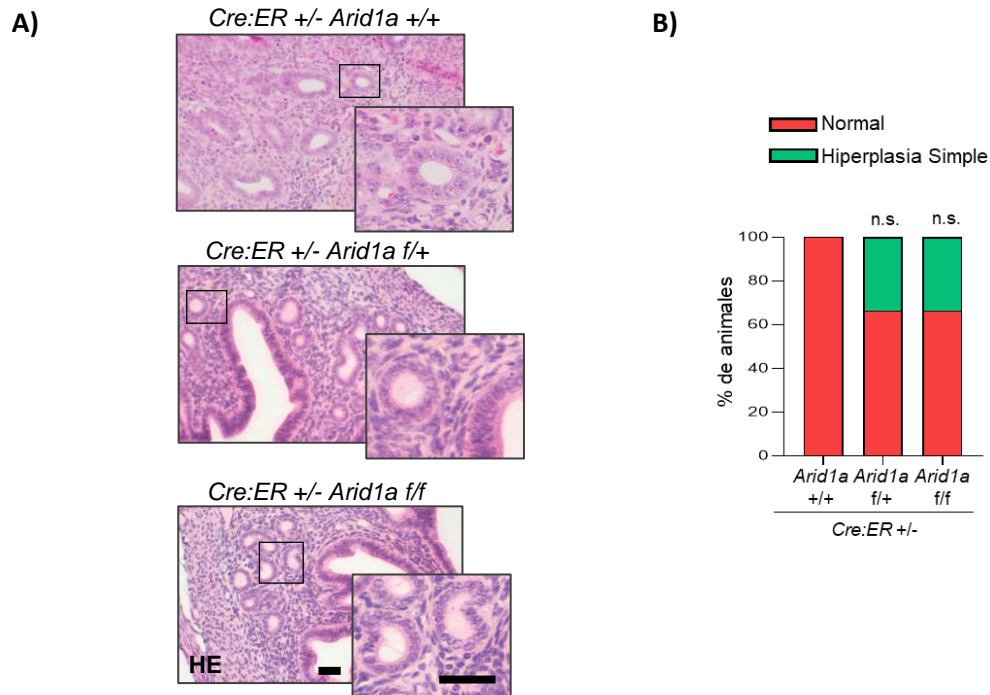
**Figura 41. La pérdida de expresión de ARID1A en células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* no afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular.** A) Histograma representativo de la distribución del ciclo celular de por citometría de flujo (FACS) del perfil de las células epiteliales de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* en presencia de Tamoxifeno. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ). EV, vector vacío.

Por último, se exploró la relevancia de ARID1A en la iniciación del cáncer de endometrio *in vivo*. Con dicho propósito, ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>*, *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>*, fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de tamoxifeno, 5 semanas post nacimiento. Transcurridas de 52 a 56 semanas (figura 42-A), los ratones fueron sacrificados y se corroboró la pérdida de expresión de ARID1A en los úteros de dichos ratones por medio de inmunohistoquímica (IHQ) (figura 42-B).



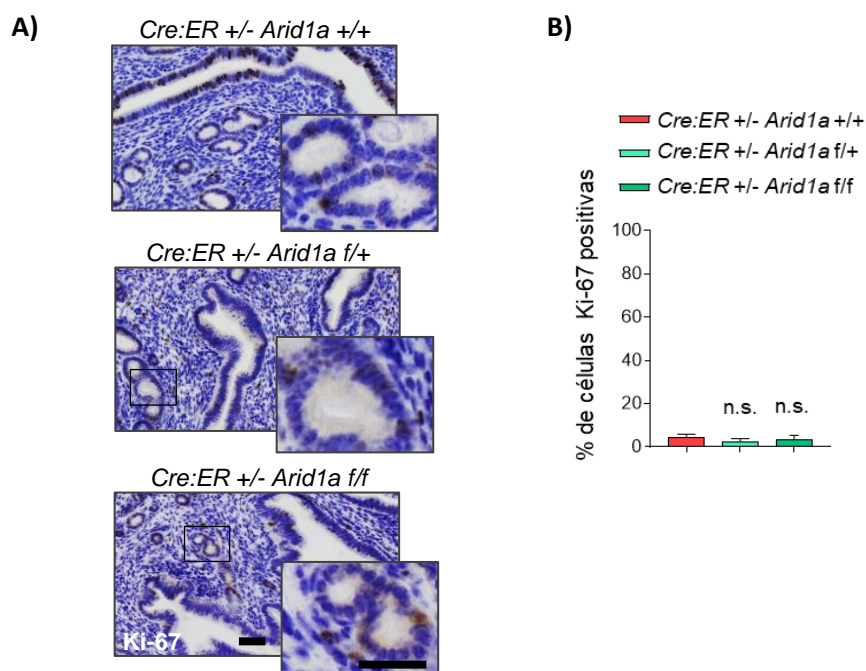
**Figura 42. Pérdida *in vivo* de la expresión de ARID1A en ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*.** A) Diseño experimental para el análisis de los ratones de la colonia *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*. En resumen, los ratones se destetaron 3 semanas después del nacimiento y, después de 5 a 7 semanas del destete, se les inyectó una dosis única de Tamoxifeno para lograr la ablación de *Arid1a*. Los ratones fueron sacrificados 52-56 semanas después. B) Imágenes representativas de Inmunohistoquímica contra ARID1A en secciones seriadas de endometrio de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*. Barra de escala= 100 $\mu$ m.

Los análisis histopatológicos basados en las Eosinas Hematoxilinas (EH) de los endometrios en cuestión, no mostraron ninguna grossa diferencia, ni la presencia de fenotipos patológicos en ninguno de los fenotipos analizados (Figura 43).



**Figura 43. La pérdida de ARID1A *in vivo* no induce cambios histológicos en los endometrios de los ratones de la colonia *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*.** A) Imágenes representativas de eosinas hematoxilinas (EH) llevada a cabo en secciones seriadas de endometrios de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>+/+</sup>* (n=10), *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* (n=10) o *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/f</sup>* (n=10) con secciones magnificadas recuadradas y B) histograma representativo de la evaluación histológica de dichos grupos tras 56 semanas post administración del Tamoxifeno. Barra de escala =100µm n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ).

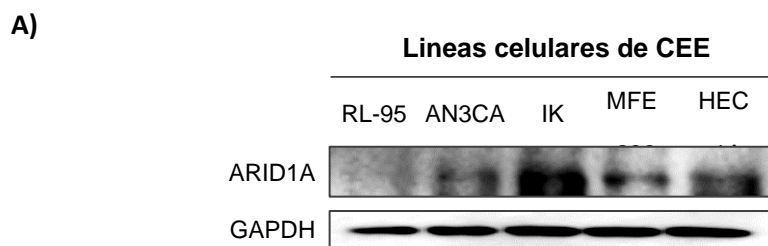
Asimismo, el análisis del marcador de proliferación epitelial Ki67, mediante la realización de ensayos de IHQ, corroboró la no existencia de cambios relevantes en las ratios de proliferación celular en ninguno de los fenotipos estudiados (Figura 44).



**Figura 44. La pérdida de ARID1A in vivo no induce cambios en los ratios de proliferación en los endometrios de los ratones de la colonia *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*.** A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra Ki67 llevada a cabo en secciones seriadas de endometrios de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>+/+</sup>* (n=10), *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff/+</sup>* (n=10) o *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff/ff</sup>* (n=10) con secciones magnificadas recuadradas y B) cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki67. Barra de escala =100µm. ±SEM; n.s. (no significativo, P≥0,05).

## 1.2. Estudio del efecto de la pérdida de ARID1A sobre el crecimiento y progresión de células tumorales de endometrio.

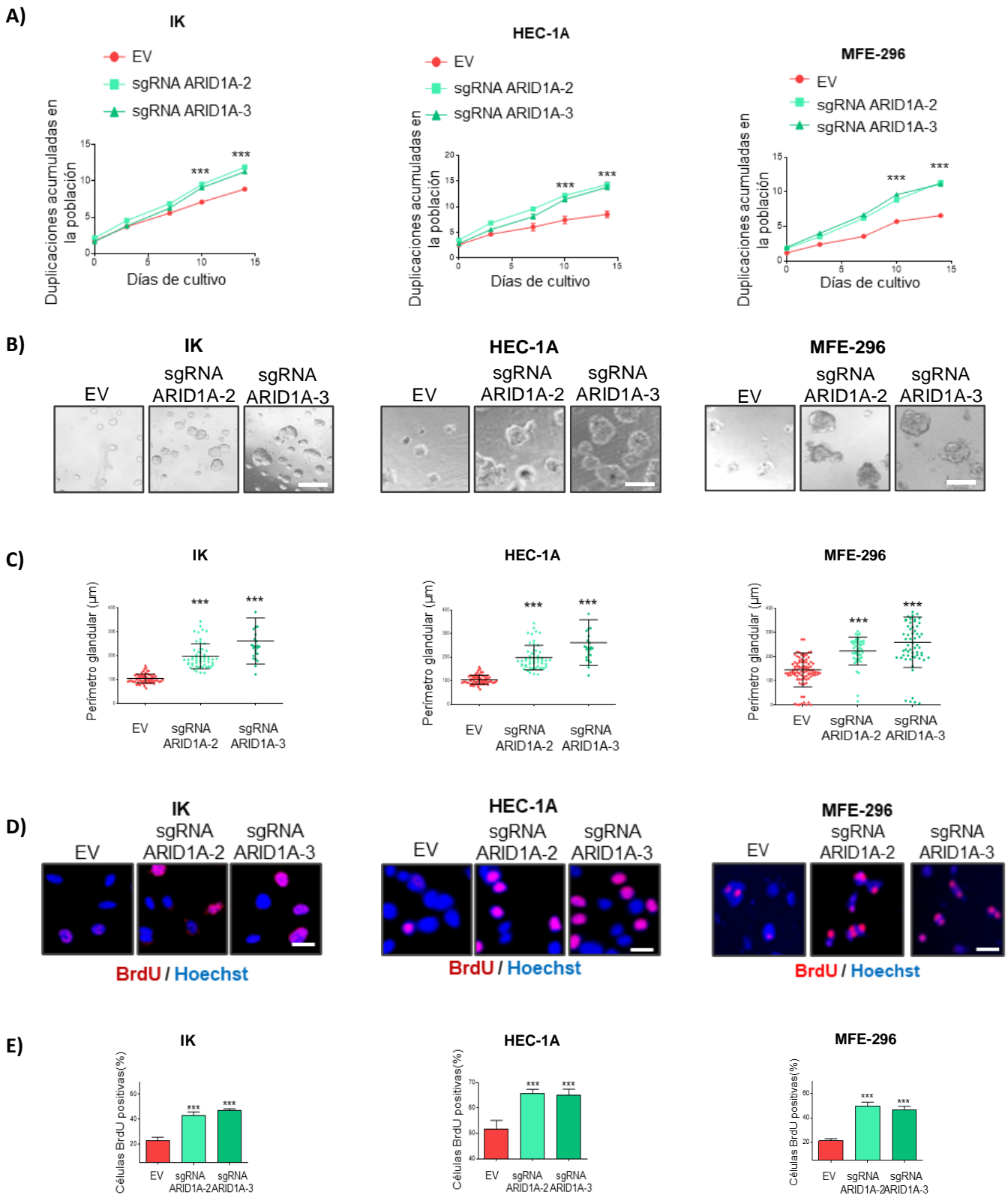
Debido a que varios estudios evidencian que la pérdida de ARID1A puede conferir ventajas adaptativas en contextos celulares oncológicos previamente establecidos<sup>98,132</sup>, se decidió regular a la baja los niveles endógenos de expresión de proteína de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE. Primero de todo, se evaluó en un panel de varias líneas celulares humanas de CEE los niveles de expresión endógenos de ARID1A (Figura 45).



**Figura 45. Análisis de los niveles endógenos de expresión de proteína de diferentes líneas celulares humanas de CEE.** A) Imágenes representativas del análisis de western blot de los niveles de ARID1A de las líneas celulares de CEE: RL-95, IK, AN3CA, HEC-1A y MFE-296. La GAPDH fue usada como control de carga.

Después, las líneas celulares IK, MFE-296 y HEC-1-A, que expresaban niveles salvajes de expresión de ARID1A, fueron infectadas con lentivirus previamente generados, que contenían sgRNAs contra *ARID1A*. Posteriormente, con tal de evaluar las ratios de proliferación de estas células se realizaron ensayos de duplicación acumulada de la población, ensayos de perímetro glandular de cultivos 3D y ensayos de incorporación de BrdU. Como se muestra en la figura 46, los resultados de estos ensayos revelaron que la pérdida de expresión de ARID1A incrementaba las ratios de proliferación en las tres líneas celulares humanas de CEE.



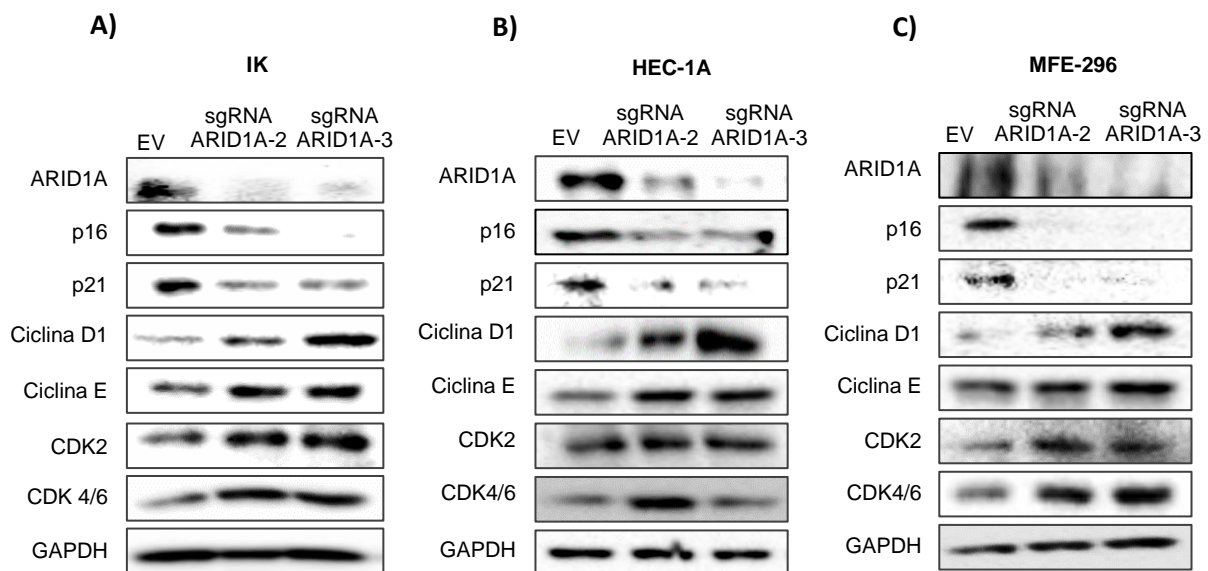


**Figura 46. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE incrementa los ratios de proliferación.** A) Niveles de duplicación acumulada de la población de las células IK, HEC-1A y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) tras 15 días de cultivo. B) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D de las células humanas endometriales de CEE IK, HEC-1A y MFE-296, infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3).



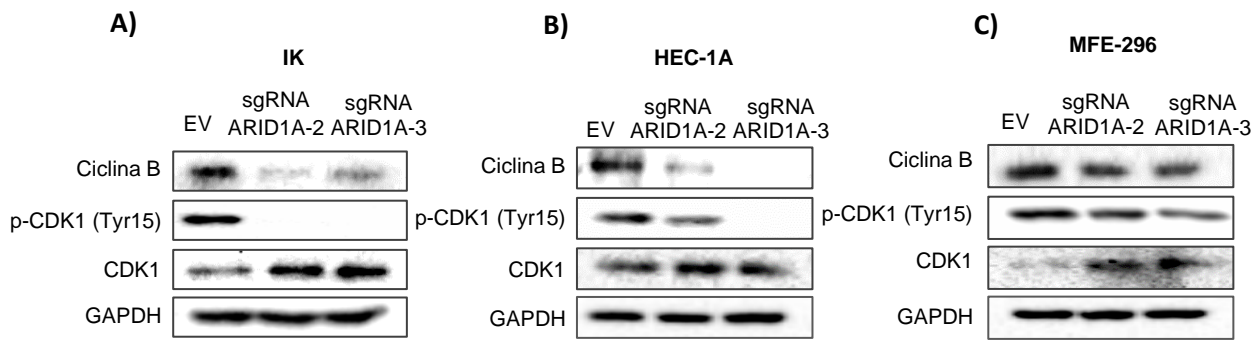
ARID1A-3) y C) medición de los perímetros glandulares. Barra de escala: 100 $\mu$ m. D) Imágenes representativas de las células positivas para BrdU en cultivos de células humanas endometriales de CEE IK, HEC-1A y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y E) cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas. \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ). EV, vector vacío.

Consistente con estos resultados, cuando se analizó mediante ensayos de westernblot la expresión de proteína de los principales reguladores del ciclo celular, se observó que en todas las líneas celulares de CEE, infectadas con los lentivirus portadores del sgRNA contra ARID1A, se producía un incremento de los promotores del ciclo celular ciclina D1, ciclina E, CDK2 y DCK 4/6 y una disminución de los niveles de expresión de los inhibidores del ciclo p21 y p16, en comparación con sus correspondientes células parentales, con expresión salvaje para ARID1A (Figura 47).



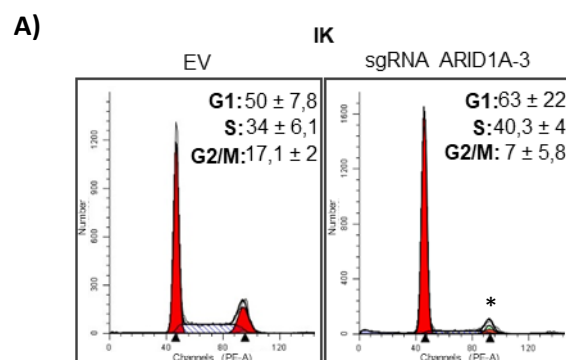
**Figura 47. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la progresión del ciclo celular.** Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de proteína de ARID1A, p16, p21, ciclina D1, ciclina E, CDK2 y CDK 4/6 de las células A) IK, B) HEC-1A y C) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Al contrario que en el resto de ciclinas, cuando se analizaron los niveles de expresión de la ciclina B, se observó una menor expresión de ésta en las células que tenían expresión reducida de ARID1A, en comparación con sus células parentales. No obstante, al analizar la activación del complejo CDK1-ciclina B, se observó un incremento de los niveles de expresión de CDK1 total y un descenso de los niveles de la fosforilación inhibitoria de CDK1 en la Tyr15, en las líneas celulares tras la regulación a la baja de ARID1A (Figura 48).



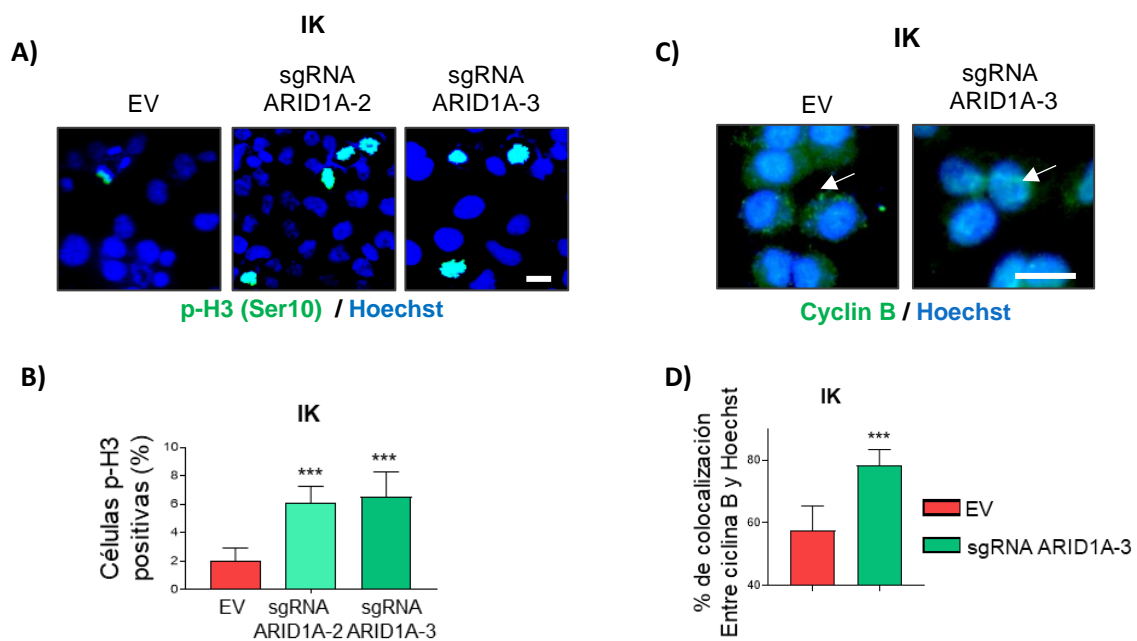
**Figura 48.** La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE induce un descenso de los niveles de expresión de la ciclina B y un incremento de la forma activa de la CDK1. Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de proteína de ciclina B, p-CDK 1 (Tyr15) y CDK 1 total de las células A) IK, B) HEC-1A y C) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

En el ciclo celular, durante la transición de la fase G2 a la M se puede observar una acumulación de los niveles de ciclina B, que se traducen en una gran actividad del complejo CDK1/ciclina B. Una vez iniciada la fase M en las células, esta ciclina B acumulada es degradada con tal de promover la salida de la fase M<sup>133</sup>. Este hecho junto con los resultados observados, incitó a analizar por citometría, el perfil del ciclo celular de las células IK con regulación a la baja de ARID1A, así como el de sus respectivas células parentales. Como se puede apreciar en la Figura 49, los resultados mostraron que las células IK con menor expresión de ARID1A no solo no se encontraban arrestadas en el punto de control G2/M, sino que, por el contrario, presentaban significativamente un menor porcentaje de células en G2/M en comparación con sus células parentales.



**Figura 49.** La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta al perfil de distribución de las fases del ciclo celular. A) Histograma representativo de la distribución del ciclo celular de por citometría de flujo (FACS) del perfil de las células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3). \*  $P \leq 0,05$ . EV, vector vacío.

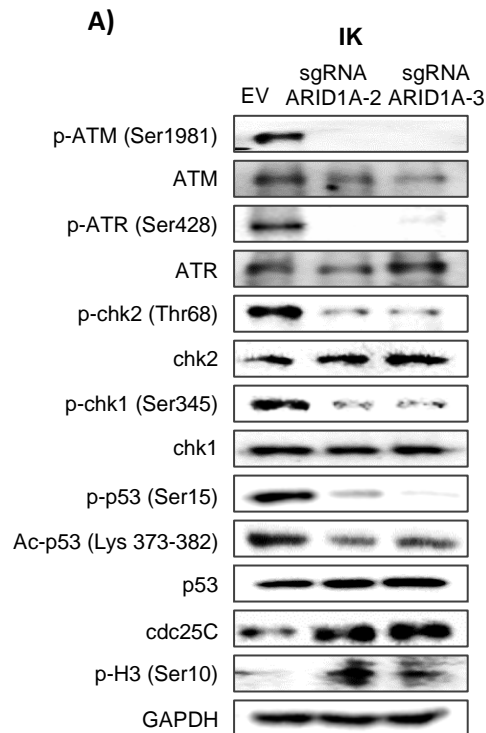
Para corroborar estos resultados, se realizó una inmunofluorescencia contra la serina 10 de la histona H3 (marcador de mitosis<sup>133</sup>) observándose que las células IK con expresión de ARID1A reducida expresaban una mayor cantidad de dicho marcador mitótico (Figura 50). Además, para acabar de descartar un arresto del ciclo celular en el punto de control de la mitosis, se analizó por inmunofluorescencia la localización de la ciclina B, puesto que la traslocación celular de la ciclina B al núcleo es típica de la profase mitótica<sup>134,135</sup>. Los resultados revelaron una mayor colocalización de la ciclina B con el marcador nuclear Hoechst, en las células IK con expresión a la baja de ARID1A, en comparación con sus células control, indicando una mayor localización nuclear de éstas. Ambos resultados sugieren que las células con alteraciones en la expresión de ARID1A estaban progresando a través del proceso mitótico.



**Figura 50. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la progresión de la fase mitótica del ciclo celular.** A) Imágenes representativas de células positivas para p-H3 (Ser10) en cultivos de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y B) cuantificación del porcentaje de células p-H3 (Ser10) positivas. Tinción con Hoechst para evidenciar los núcleos. Barra de escala =25µm. Los análisis estadísticos se realizaron usando un análisis ANOVA seguido de un test de múltiple comparación Tukey. C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de la ciclina B en cultivos de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y D) cuantificación de porcentaje de colocalización entre ciclina B y Hoechst. Tinción con Hoechst empleada para evidenciar los núcleos. Barra de escala =25µm. \*\*\* P≤0,001. EV, vector vacío.

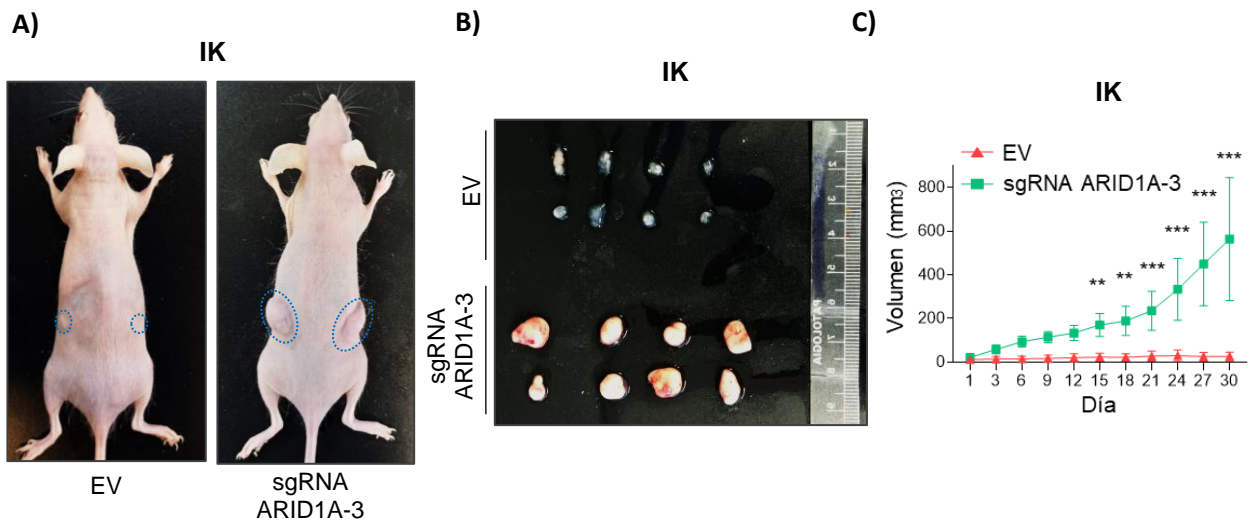
Considerando los resultados obtenidos y teniendo en cuenta el importante papel que juega el complejo CDK1/ciclina B en la transición del ciclo celular de la fase G2 a la M<sup>133</sup>, se decidió analizar los niveles de expresión de los principales reguladores del punto de control del ciclo celular G2/M por western blot (figura 51). Los resultados revelaron que la bajada de expresión de ARID1A en las células IK estaba acompañada de un descenso en la forma activa de

promotores de dicho punto de control tales como ATM, ATR, chk2, chk1 o p53, y un concomitante aumento de los niveles de proteína del regulador negativo del punto de control G2/M, Cdc25C.



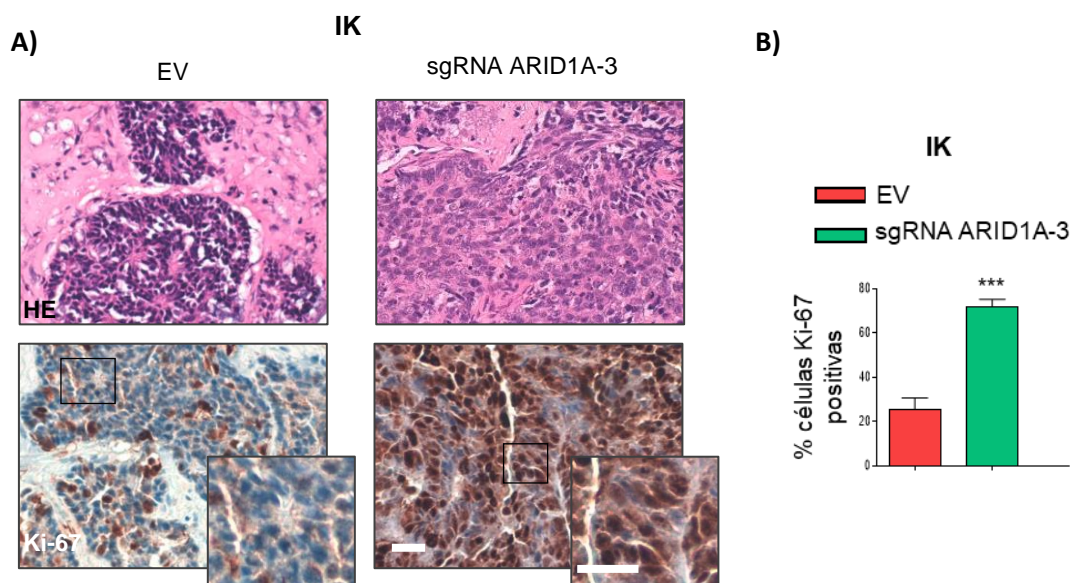
**Figura 51. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a los niveles de expresión de proteínas claves para la activación del punto de control del ciclo celular G2/M.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de p-ATM (se1981), pATR (Ser428), p-chk2 (Thr68), p-chk1 (Ser345), p-p53 (Ser15) y Ac-p53 (Lys 373-382), sus niveles totales y los de cdc25C en células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Por último, con el objetivo de evaluar *in vivo* los efectos de la pérdida de ARID1A en la proliferación de las células de CE, se inyectaron subcutáneamente células IK con expresión alterada a la baja o con expresión salvaje de ARID1A en ratones inmunocomprometidos, con tal de generar tumores subcutáneos. Como puede observarse en la figura 52, los resultados mostraron que los tumores subcutáneos que expresaban bajos niveles de expresión de ARID1A, presentaban mayores volúmenes respecto a los tumores control.



**Figura 52. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta al crecimiento tumoral *in vivo*.** Tumores xenoinjertados subcutáneos de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (n=8) y sus células IK control (n=8). Tras la generación del injerto, se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral durante 30 días. A) Imágenes representativas de los ratones con los tumores xenoinjertados. B) Imágenes representativas de los tumores subcutáneos xenoinjertados. C) Gráfico que muestra la cinética del crecimiento tumoral, indicada con el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>). \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001. EV, vector vacío.

Para corroborar a nivel molecular los resultados obtenidos *in vivo*, se realizó una inmunohistoquímica contra el marcador de proliferación celular Ki67 (figura 53). Los resultados mostraron un incremento substancial de los niveles de expresión de Ki67 en los tumores subcutáneos xenoinjertados de las células IK con expresión alterada de ARID1A, en comparación con los que tenían expresión salvaje de ARID1A.

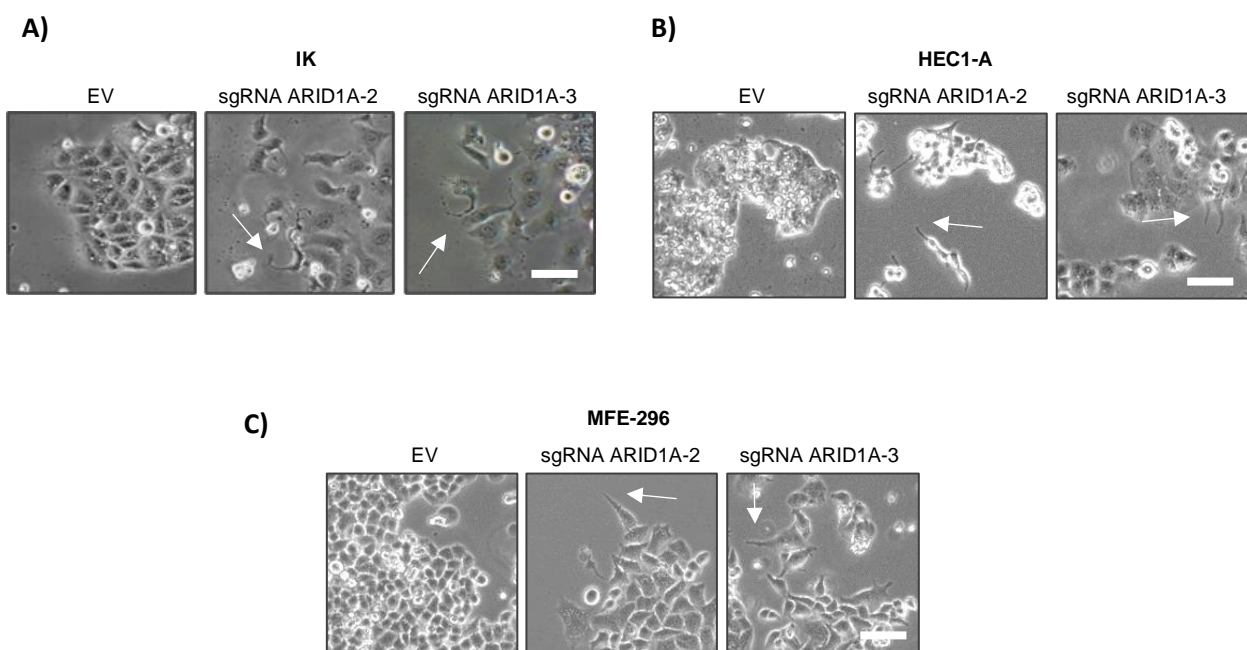


**Figura 53. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a los ratios de proliferación de los tumores *in vivo*.** Tumores xenoingreftados subcutáneos de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (n=8) y sus células IK control (n=8). Tras la generación del injerto, se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral durante 30 días. A) Imágenes representativas mostrando la tinción de Eosina Hematoxilina (HE) y la inmunohistoquímica contra Ki67 en los tumores subcutáneos xenoengraftados con células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) o sus controles, con secciones magnificadas recuadradas y B) cuantificación del número de células Ki67 positivas. Barra de escala =25µm. \*\*\* P≤0,001. EV, vector vacío.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que, en un contexto endometrial oncogénico previamente establecido, la pérdida de ARID1A incrementa los ratios de proliferación celular por medio de la omisión del arresto del punto de control del ciclo celular G2/M impuestos por el estrés replicativo oncogénico<sup>133</sup>.

### 1.3. Estudio del efecto de la pérdida de ARID1A sobre la adquisición de capacidades migratorias e invasivas y la modulación de fenotipos EMT en células tumorales de endometrio.

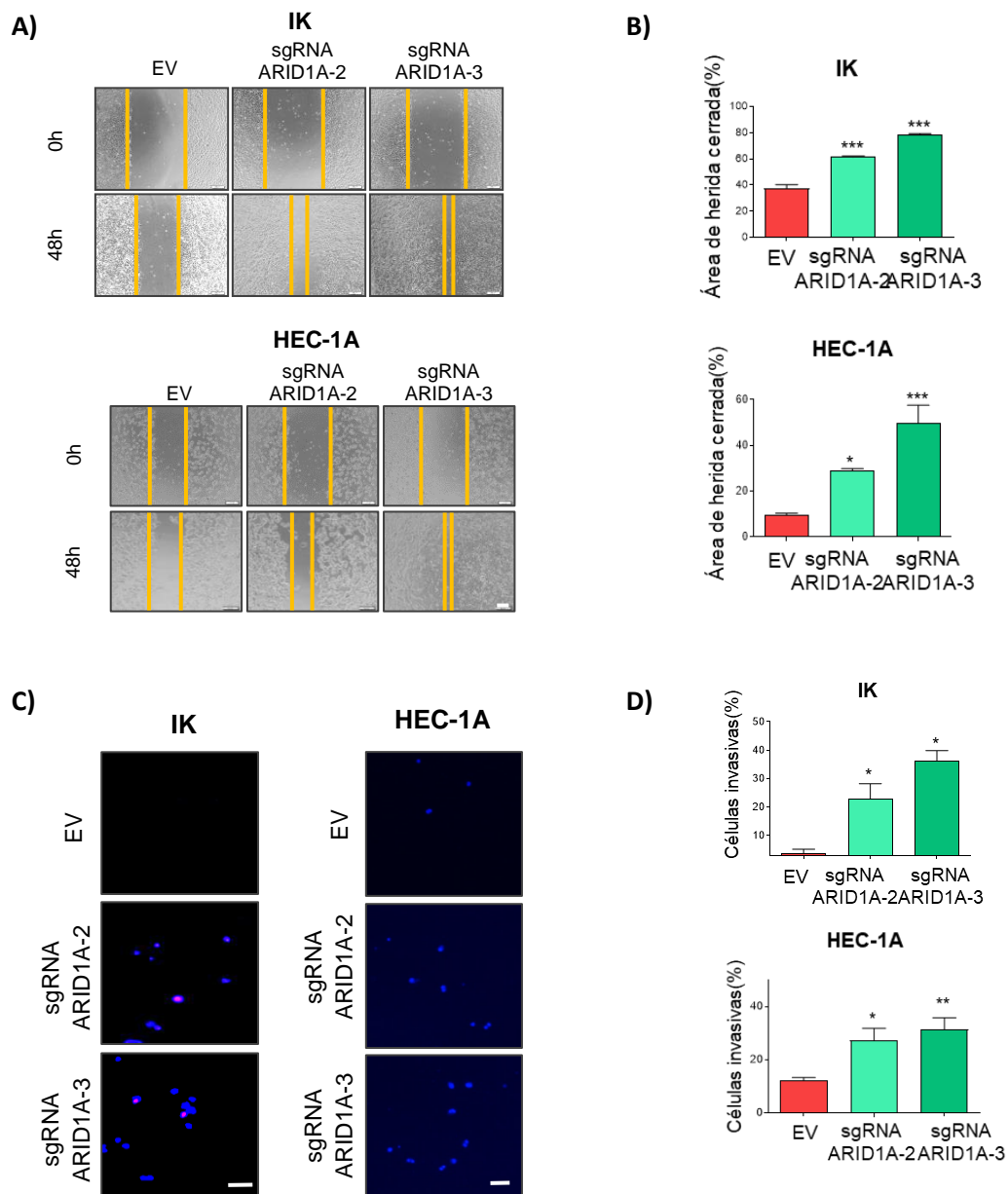
Estudios recientes evidencian que las mutaciones en ARID1A son predominantemente subclonales y heterogéneas, pudiendo llegar a alterar el paisaje epigenético y fortaleciendo así la diseminación de las células cancerosas de tumores primarios previamente establecidos<sup>11</sup>. Interesantemente, al observar por contraste de fase las líneas celulares infectadas con los lentivirus portadores de sgRNA contra ARID1A, se apreció que dichas células presentaban alteraciones morfológicas en la apariencia celular (figura 54). Concretamente, se observó que mientras que las células parenterales crecían en clústeres de colonias con altas adhesiones celulares, las células a las cuales se le habían alterado la expresión de ARID1A crecían más esparcidas, con morfologías con forma de huso y presentando filopodios.





**Figura 54. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE afecta a la morfología celular.** A) Imágenes representativas de contraste de fases de las células A) IK, B) HEC-1A y C) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). Barra de escala =10  $\mu$ m.

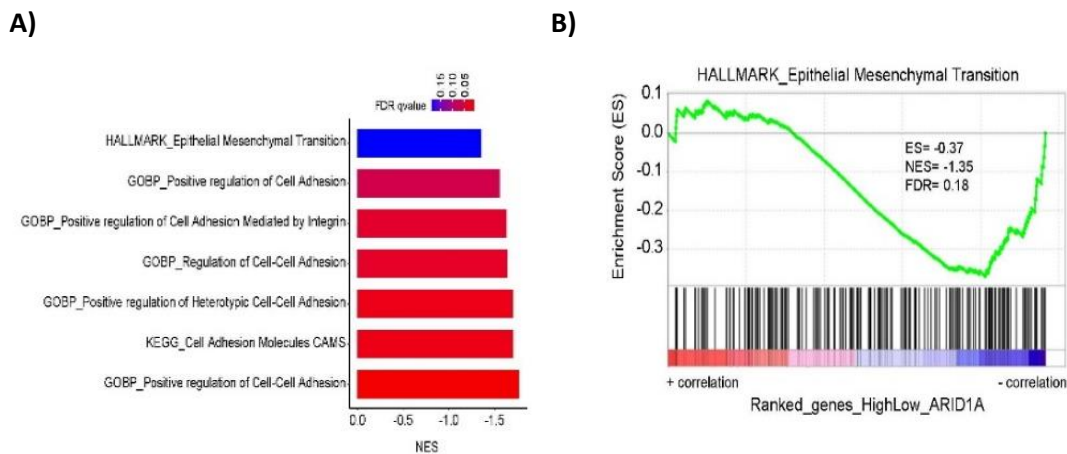
En base a estas evidencias, se decidió evaluar el efecto de la pérdida de expresión de ARID1A en la migración e invasión celular de nuestras células (figura 55). Como se sospechaba, ensayos de migración de wound healing y de invasión de transwell mostraron que la pérdida de expresión de ARID1A desencadenaba en un incremento de las capacidades migratorias e invasivas de las líneas celulares humanas de CEE.





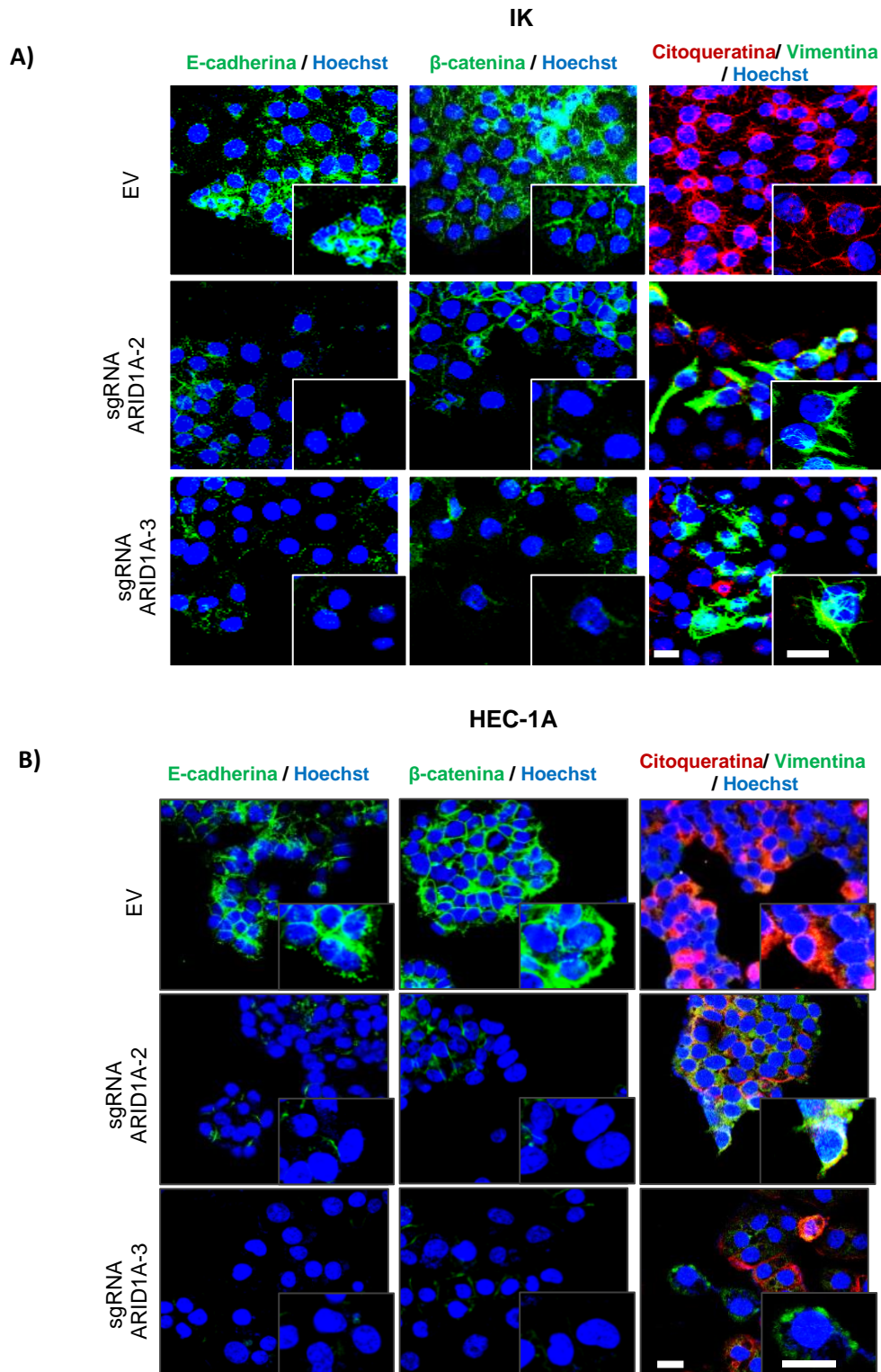
**Figura 55. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la migración e invasión celular.** Experimentos llevados a cabo en células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3) A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing y B) su cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células invasoras y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25 $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Con el fin de identificar un potencial mecanismo para explicar los efectos observados, se decidió explorar programas genéticos asociados a la pérdida de expresión de ARID1A. Para ello, se realizó un GSEA de datos de secuenciación de RNA obtenidos de la base de datos TCGA\_UCEC, procedente de muestras de pacientes con carcinoma endometrial<sup>129</sup>. Concretamente, y en base a que las mutaciones de ARID1A se encuentran enriquecidas en tumores de CEE, el análisis de GSEA se focalizó en las muestras de tumores de esta base de datos que presentaban histología endometriode. Al comparar el 20% de muestras con elevada expresión de ARID1A con el 20% de muestras que presentaban los niveles más bajos de expresión de ARID1A, destacablemente se encontró que la expresión de ARID1A se encontraba directamente correlacionada con firmas asociadas de la adhesión celular e inversamente correlacionada con firmas asociadas a la transición epitelio mesenquimal (EMT) (figura 56).



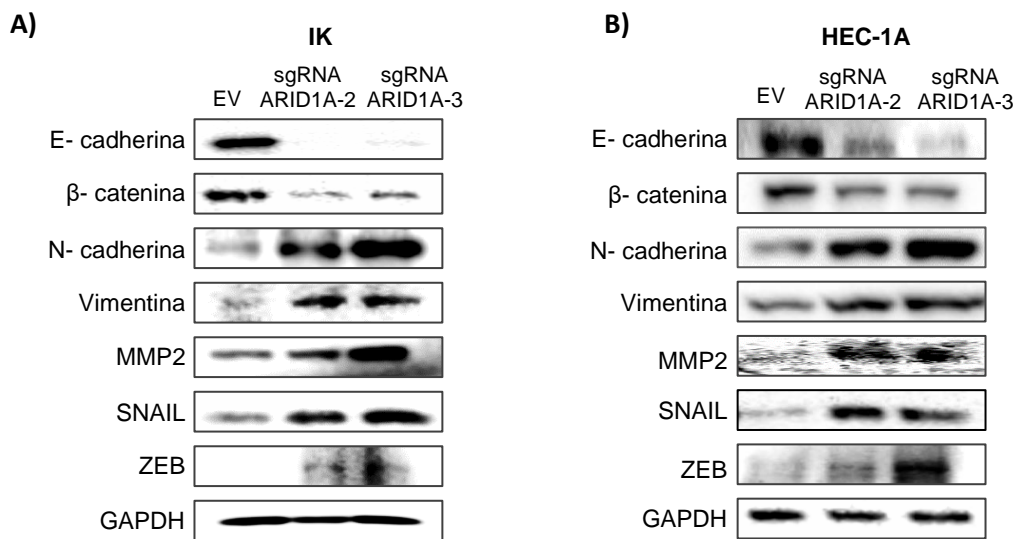
**Figura 56. La expresión de ARID1A se encuentra directamente relacionada con firmas asociadas a la adhesión celular e inversamente relacionada con firmas asociadas a EMT.** A) Análisis de enriquecimiento de sets de genes (GSEA) en muestras de pacientes con tumores de CEE con elevada o baja expresión de ARID1A, de la base de datos TCGA\_UCEC, usado para analizar firmas asociadas a la adhesión celular y a la transición epitelio mesénquima (EMT). B) Gráfico del GSEA del EMT en muestras de pacientes con tumores de CEE con elevada o baja expresión de ARID1A, de la base de datos TCGA\_UCEC.

Está descrito que los cambios en el EMT son el mecanismo central en los procesos de migración e invasión celular de células endometriales neoplásicas<sup>136,137</sup>. Así, con tal de evaluar el papel de ARID1A en la regulación del fenotipo de EMT, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la expresión y localización de varios marcadores epiteliales y mesenquimales. Como puede observarse en la figura 57, estos ensayos revelaron que las líneas celulares humanas de CEE, IK y HEC1-A, con regulación a la baja de la expresión de ARID1A presentaban una disminución de la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina,  $\beta$ -catenina o citoqueratina y un incremento de la expresión del marcador mesenquimal vimentina.



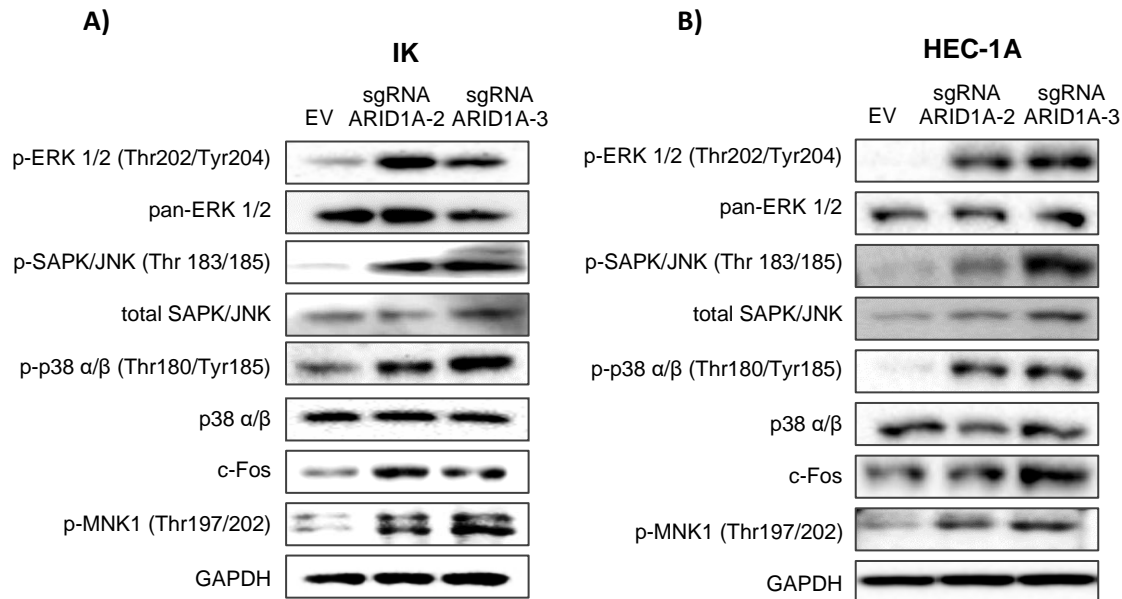
**Figura 57. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce alteraciones en el fenotipo de EMT.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias contra los marcadores epiteliales E-cadherina,  $\beta$ -catenina y citoqueratina, y contra el marcador mesenquimal vimentina, realizadas en células A) IK y B) HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). Tinción con Hoechst empleada para evidenciar los núcleos. Secciones magnificadas recuadradas. Barra de escala =25  $\mu$ m. EV, vector vacío.

Como era de esperar, resultados similares fueron obtenidos cuando se analizaron por western blot los niveles de expresión de varios marcadores epiteliales (E-cadherina y  $\beta$ -catenina) y mesenquimales (N-cadherina, vimentina, y MMP2). Además, en estos ensayos también se observó una sobreexpresión de los marcadores transcripcionales reguladores del proceso de EMT SNAIL y ZEB<sup>138</sup>, en las células con alteración de la expresión de ARID1A (figura 58).



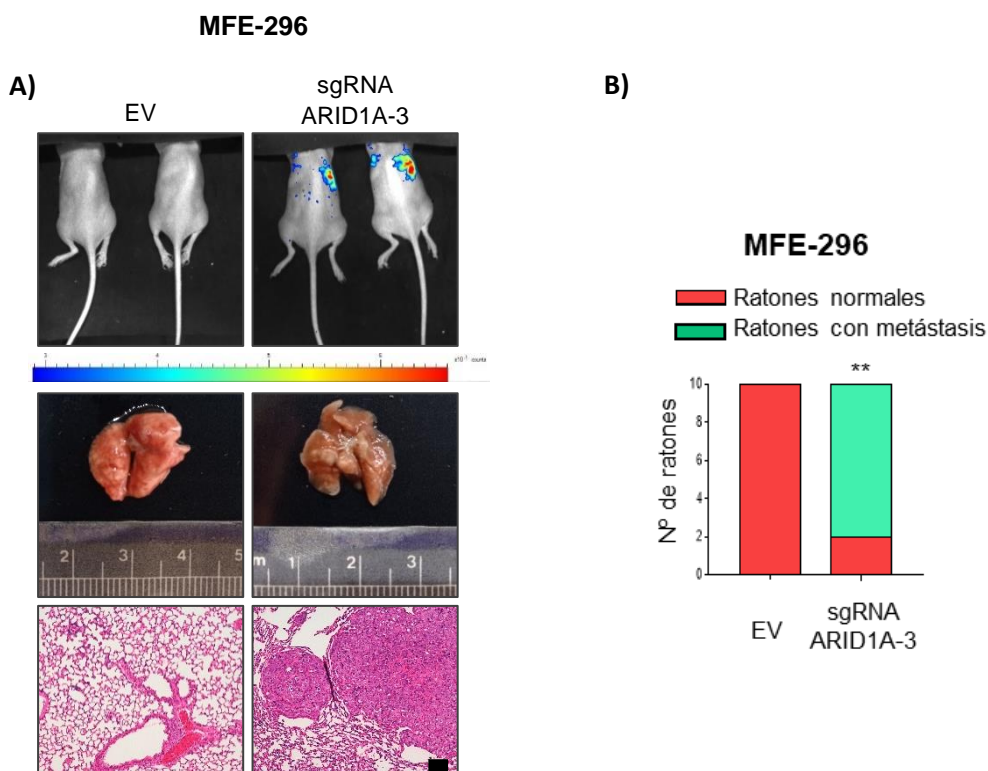
**Figura 58. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT.** Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de E-cadherina,  $\beta$ -catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB en células A) IK y B) HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 and lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Puesto que es ampliamente aceptado que la vía de señalización de las MAPK/ERK juega un papel importante en la regulación de la migración y la invasión celular de las líneas celulares de cáncer de endometrio<sup>139,140</sup>, se decidió estudiar el estado de activación de esta vía de señalización en estas células con regulación a la baja de ARID1A (figura 59). Para ello se evaluaron mediante western blot los niveles de expresión de las formas fosforiladas como de las totales de los principales efectores de la vía de las MAPK/ERK (ERK1/2, SAPK/JNK, p38  $\alpha/\beta$ , c-fos y MNK-1). Los resultados desvelaron que la vía de las MAPK/ERK estaba sustancialmente hiperactivada en las células de CEE con ARID1A regulado a la baja.



**Figura 59. La pérdida de expresión de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE produce la activación de la vía de las MAPK/ERK.** Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de p-ERK (Thr202/Tyr204), p-SAPK/JNK (Thr 183/185), p-p38 α/β (Thr180/185) y sus totales, c-fos y p-MNK (Thr197/202) en células A) IK y B) HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Finalmente, con el fin de explorar el papel de ARID1A en la migración, invasión y diseminación celular *in vivo*, se estudió la capacidad de las células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra ARID1A a la hora de promover la colonización metastática en pulmón. Para ello se inyectaron intravenosamente células MFE-296 sgRNA ARID1A-3 o MFE-296 EV marcadas con el gen reportero de la luciferasa, en ratones inmunocomprometidos<sup>141</sup>. Como puede observarse en la figura 60, la pérdida de ARID1A en las células MFE-296 fomentaba dramáticamente la diseminación y colonización metastática en pulmón, en comparación con sus células parenterales con expresión salvaje de ARID1A, las cuales no habían sido capaces de presentar colonización metastática 10 días post inyección intravenosa.



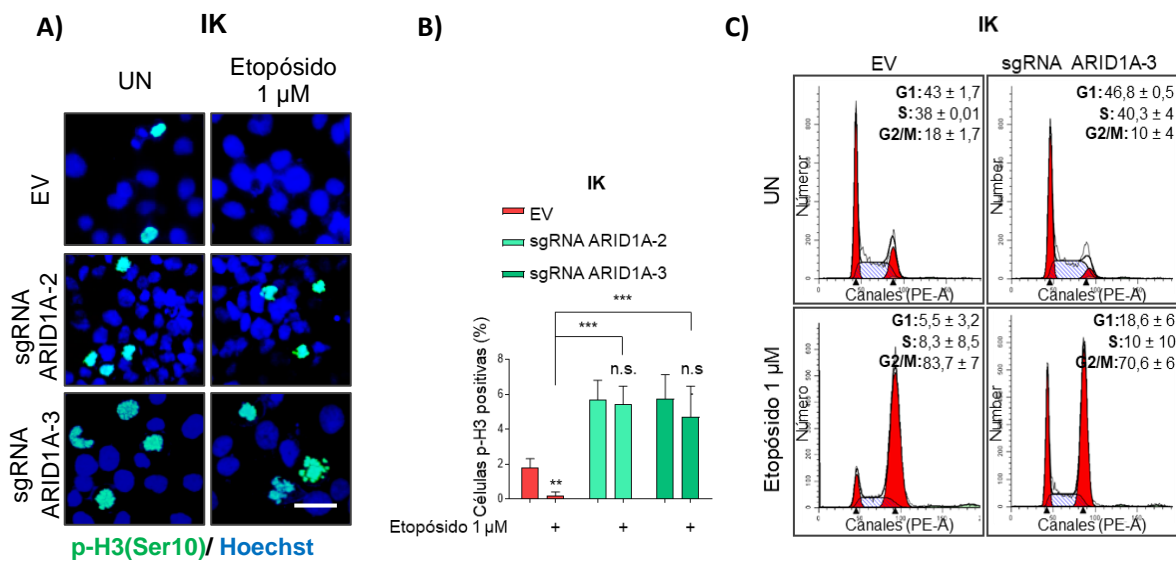
**Figura 60. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la diseminación y colonización metastásica en pulmón *in vivo*.** Crecimiento metastático de células GFP-luciferasa MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (n=10) o sus células control (lentiCRISPRv2) (n=10).  $50 \times 10^4$  células fueron inyectadas intravenosamente y se dejaron crecer durante 10 días (ir a materiales y métodos para mayor detalle). A) Imágenes representativas de la señal de bioluminiscencia, imágenes representativas macroscópicas de los pulmones e imágenes representativas microscópicas de las tinciones de Eosina Hematoxilina (EH) comparando las metástasis generadas en los pulmones de los ratones inyectados con MFE-296 con expresión deficiente de ARID1A o con sus células parentales, 10 días post inyección. Barra de escala =100  $\mu$ m. B) Gráfico representativo mostrando el número de ratones con focos metastáticos presentes en los grupos de animales indicados. \*\*  $P \leq 0,01$ . EV, vector vacío.

#### 1.4. Análisis del papel de ARID1A en la evasión de la respuesta apoptótica inducida por el daño de rotura de doble cadena del DNA.

En las células, la proteína Ataxia-telangiectasia mutada (ATM) y la proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ATR) participan en la vía de respuesta de daño al DNA activando los puntos de control del ciclo celular o desencadenando la apoptosis, ante la presencia de estímulos endógenos o exógenos de daño al DNA<sup>142</sup>. Dado la inefectiva activación del punto de control del ciclo celular G2/M observada en resultados anteriores en las células con baja expresión de ARID1A, y teniendo en cuenta el papel central que tiene dicho punto de control en el daño por rotura de doble cadena del DNA<sup>143</sup>, se decidió evaluar si la pérdida de expresión de ARID1A podría estar promoviendo la evasión a la respuesta apoptótica desencadenada por daño DBS del DNA en células de CE. Para ello, se trataron las líneas celulares infectadas con sgRNA

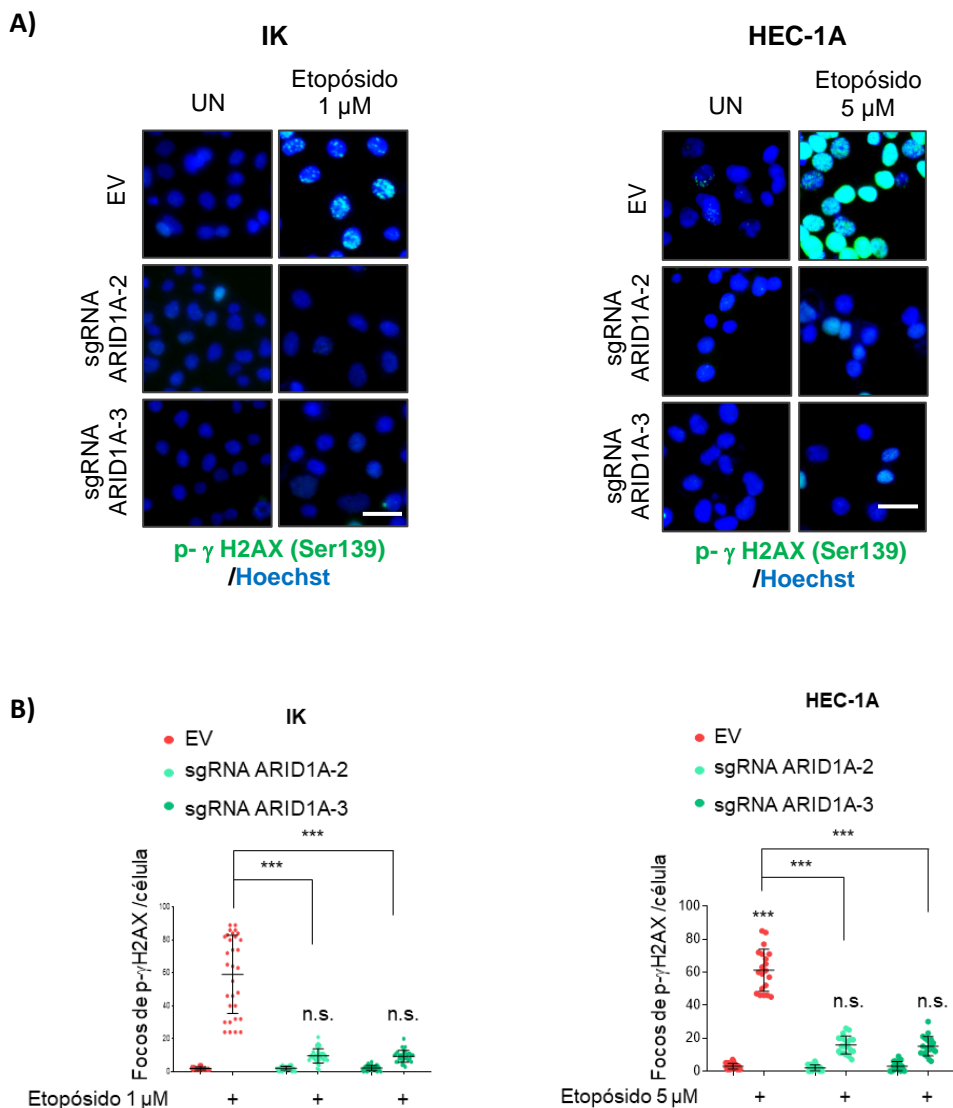


contra ARID1A con etopósido, puesto que se trata de un inductor de DSBs que conduce al arresto del ciclo celular y la detonación de la cascada apoptótica, a través de la activación de p53<sup>144</sup>. Posteriormente, se analizó el estado de la transición de G2 a M, realizando una inmunofluorescencia contra p-histona H3 (figura 61 A-B). Los resultados mostraron que después del tratamiento con etopósido, mientras que las células con expresión salvaje de ARID1A presentaban una reducción significativa en el porcentaje de células mitóticas (células positivas para p-histona H3), las células con niveles reducidos de expresión de ARID1A no presentaban diferencias significativas en los porcentajes de células mitóticas tras el tratamiento. Los resultados de los tratamientos con etopósido sugerían que las células con alteraciones de ARID1A, mostraban una deficiente activación del punto de control G2/M. Con tal de corroborar estos efectos, se decidió analizar mediante citometría de flujo, cómo se encontraba distribuido el perfil del ciclo celular en las células IK con expresión de ARID1A regulada a la baja o salvaje, tras el tratamiento con etopósido. Como se evidencia en la figura 61 C , y en concordancia con los resultados anteriores, tras el tratamiento con etopósido, se observó un menor número de células arrestadas en G2/M en las células que tenían alterada la expresión de ARID1A, en comparación con aquellas con expresión salvaje de ARID1A. Resultados que refuerzan la hipótesis de que niveles decrecientes de expresión de ARID1A promueven la evasión de la activación del punto de control G2/M en respuesta a tratamientos con etopósido, y descartan una posible activación del arresto del ciclo celular en el punto de control M.



**Figura 61. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión del punto de control G2/M del ciclo celular inducida por el tratamiento con Etopósido.** Células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 μM durante 36h. A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra p-H3 (Ser10) y Hoechst como marcador nuclear. B) Cuantificación de las células positivas para p-H3 (Ser10) tras el tratamiento con Etopósido. Barra de escala =25 μm. n.s. (no significativo, P≥0,05); \*\*\* P≤0,001. C) Histogramas representativos de la distribución del ciclo celular analizado por FACS tras el tratamiento. EV, vector vacío.

A continuación, con el fin de caracterizar mejor esta respuesta celular al etopósido, se realizó por medio de inmunofluorescencia un análisis de los niveles de los niveles de p- $\gamma$ H2AX, un marcador canónico de respuesta al daño de DNA, tras el tratamiento con etopósido en las células IK y HEC-1A infectadas con los lentivirus portadores del sgRNA contra ARID1A y en sus respectivos controles (figura 62). Los resultados desvelaron que, mientras que en las células control el número de focos de p- $\gamma$ H2AX por célula aumentaba tras el tratamiento con etopósido, las células con niveles de expresión bajos de ARID1A no mostraban diferencias tras el tratamiento.

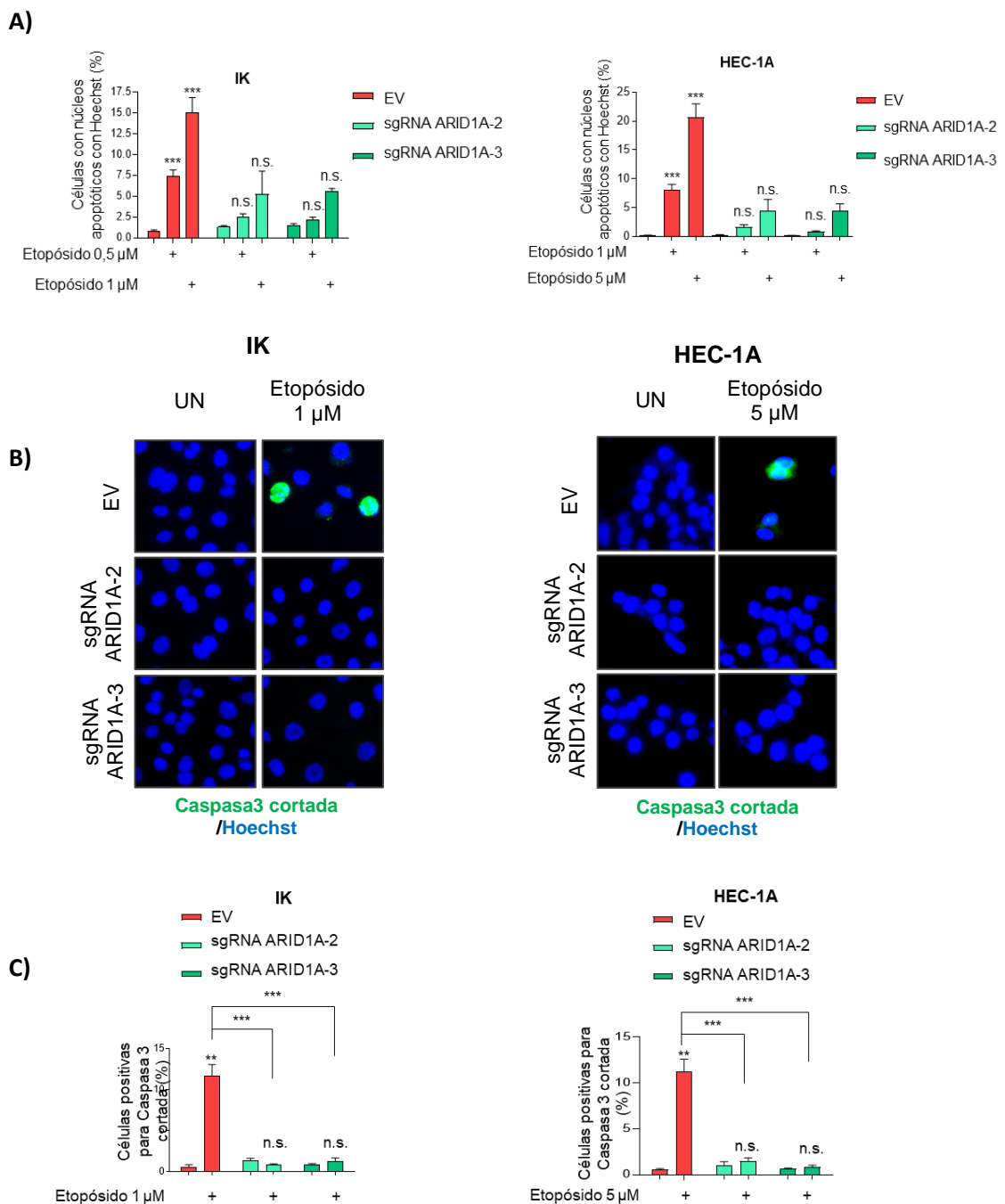


**Figura 62. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión al daño al DNA generado por el etopósido.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 $\mu$ M o 5 $\mu$ M respectivamente, durante 36h. A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia del marcador de daño a DNA, p- $\gamma$ H2AX (Ser139) y Hoechst como marcador



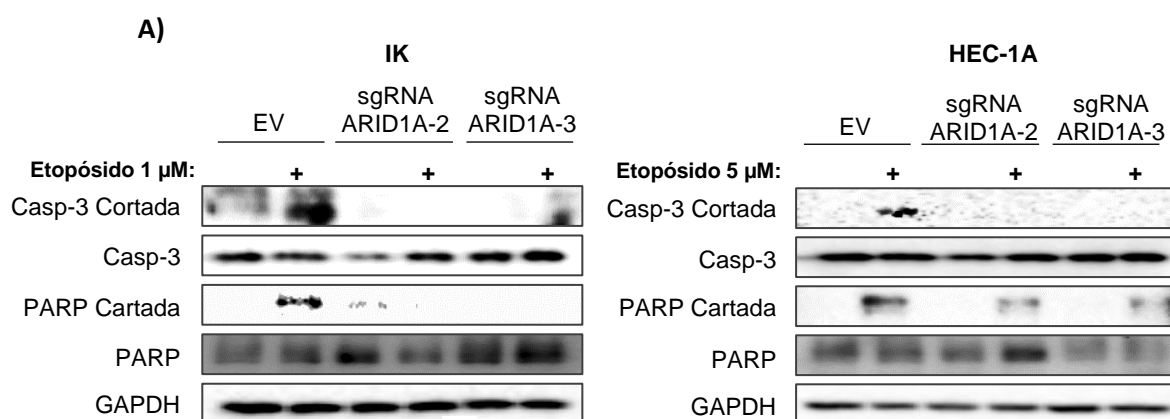
nuclear en las células y condiciones indicadas. B) gráficos representativos de la cuantificación de focos de p-γH2AX por célula en los tratamientos descritos. Barra de escala =25µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Además, como se observa en la figura 63, tanto el porcentaje de núcleos apoptóticos por Hoechst como la inmunofluorescencia contra la Caspasa 3 cortada, desvelaron que los tratamientos con etopósido inducían una respuesta apoptótica en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A, pero no en aquellas con alteración en la expresión de ARID1A.



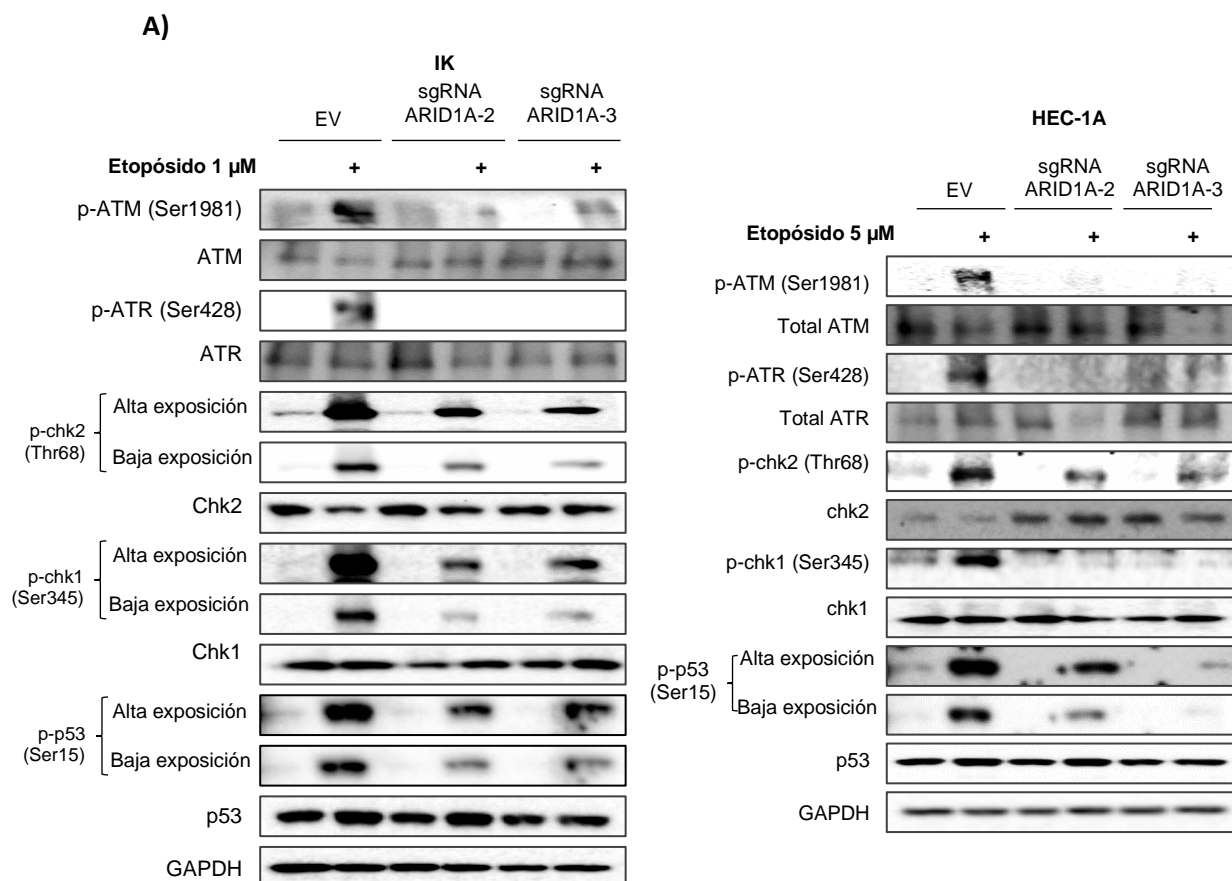
**Figura 63. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión a la respuesta apoptótica generada por el tratamiento con etopósido.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1µM o 5µM respectivamente, durante 36h. A) Cuantificación de núcleos con morfología apoptótica expuestos por la tinción nuclear con Hoechst bajo las condiciones indicadas. B) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra la caspasa 3 cortada y núcleos evidenciados por Hoechst en las condiciones indicadas y C) cuantificación de número de células positivas para la caspasa 3 cortada. Barra de escala =25µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

En concordancia con estos resultados, el análisis de los niveles de expresión de Caspasa3 y PARP cortadas, analizados por western blot, evidenció que los tratamientos con etopósido no eran capaces de desencadenar una cascada apoptótica en las células con expresión disminuida de ARID1A (figura 64).



**Figura 64. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la evasión de la expresión de los desencadenantes de la cascada apoptótica expresados tras el tratamiento con etopósido.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1µM o 5µM respectivamente, durante 36h. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de la caspasa 3 y PARP cortadas y totales en las condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Finalmente, debido a que una de las mayores respuestas celulares al DSB se encuentra regulada por la cascada ATM/ATR, promoviendo la reparación del DNA por recombinación homóloga (HR) o la inducción de apoptosis<sup>34</sup>, se analizó por medio de ensayos de western blot los niveles de proteína de los principales efectores de esta vía (figura 65). Los resultados indicaron que, al igual que en los resultados anteriores, en las células IK y HEC-1A con expresión alterada de ARID1A no se apreciaba un incremento sustancial en los niveles de fosforilación de ATM, ATR, Chk1, Chk2 y p53 tras la inducción de DSB con etopósido, al contrario de lo que ocurría en las células control.

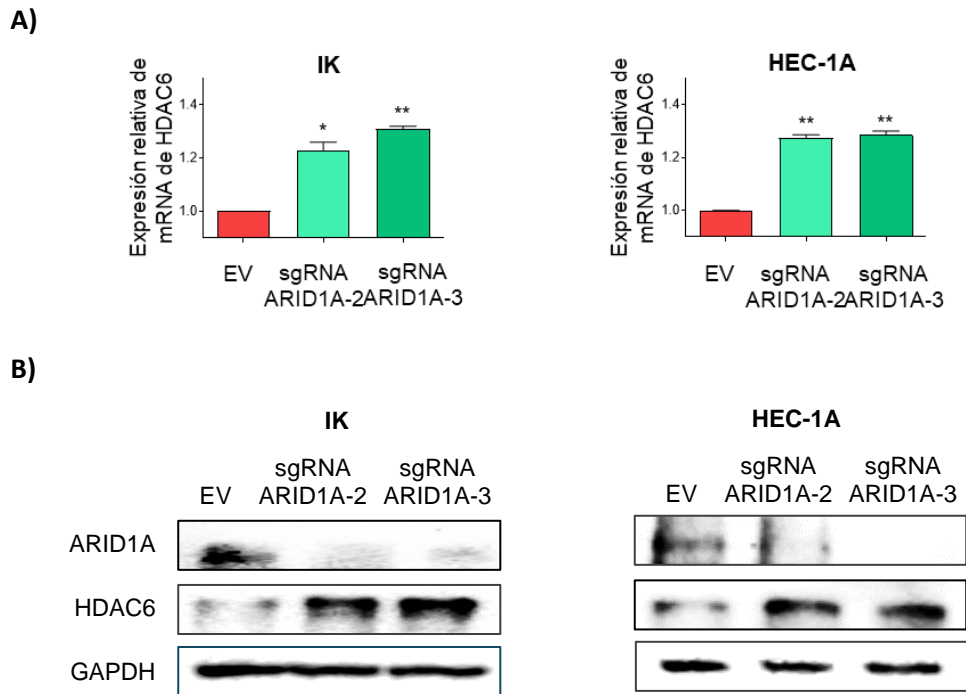


**Figura 65. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE evade la activación de la vía ATM/ATR de respuesta a daño por DSB tras el tratamiento con etopósido.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 $\mu$ M o 5 $\mu$ M respectivamente, durante 36h. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de los niveles de expresión de las formas activadas fosforiladas y totales de ATM, ATR, chk2, chk1, p53 en las condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

### 1.5. Análisis del papel de ARID1A en la regulación de la expresión de HDAC6 y su implicación en el fenotipo de EMT.

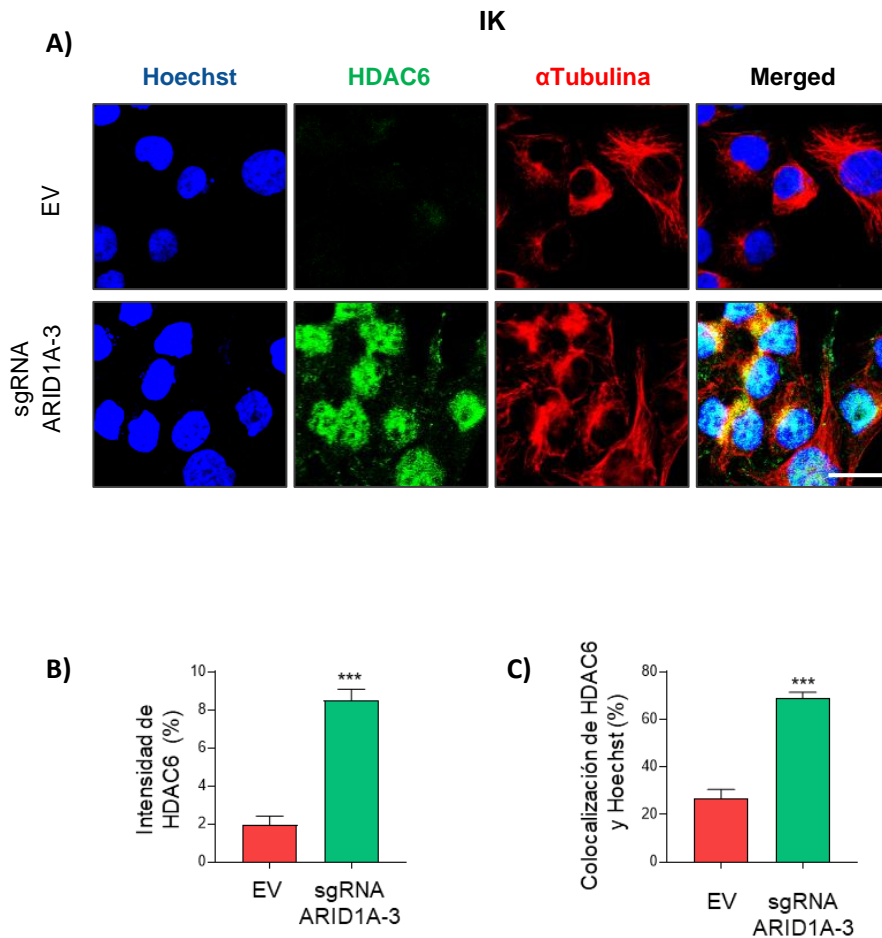
Recientemente, ha sido descrito que ARID1A es capaz de reprimir transcripcionalmente la expresión de HDAC6 en el carcinoma de células claras de ovario (OCCC) y que la pérdida de expresión de ARID1A desencadena la liberación de dicha supresión, desencadenando en una sobreexpresión de los niveles de HDAC6<sup>111</sup>. Además, se ha visto en diversos tipos de carcinomas que los niveles incrementados de HDAC6 se encuentran asociados a peores pronósticos<sup>106</sup>. De tal manera, se decidió evaluar la relación existente entre los niveles de ARID1A y HDAC6 en el CE. Primero, se corroboraron los niveles de expresión de HDAC6 en las células con expresión deficiente de ARID1A. Como puede observarse en la figura 66, los ensayos de qRT-PCR y western blot revelaron que los niveles de expresión de HDAC6 se encontraban significativamente

incrementados (tanto a nivel de DNA como de proteína) en las células infectadas con los sgRNA contra ARID1A, en comparación con sus células control.



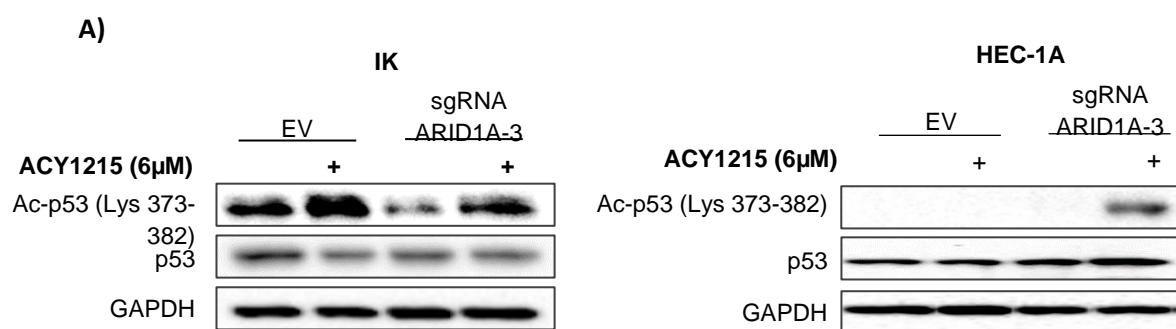
**Figura 66. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve la sobreexpresión de HDAC6.** A) RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de HDAC6 en células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3). \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ . B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de ARID1A y HDAC6 en células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Después, ensayos de inmunofluorescencia contra HDAC6 en células IK con y sin alteración de los niveles de expresión de ARID1A, además de corroborar este incremento en los niveles de expresión de proteína en las células con alteración de ARID1A (figura 67 A-B), revelaron que la localización de HDAC6 en estas células era predominantemente nuclear, hecho que previamente ha sido descrito ser promotor del proceso de EMT<sup>145</sup> (figura 67 C).



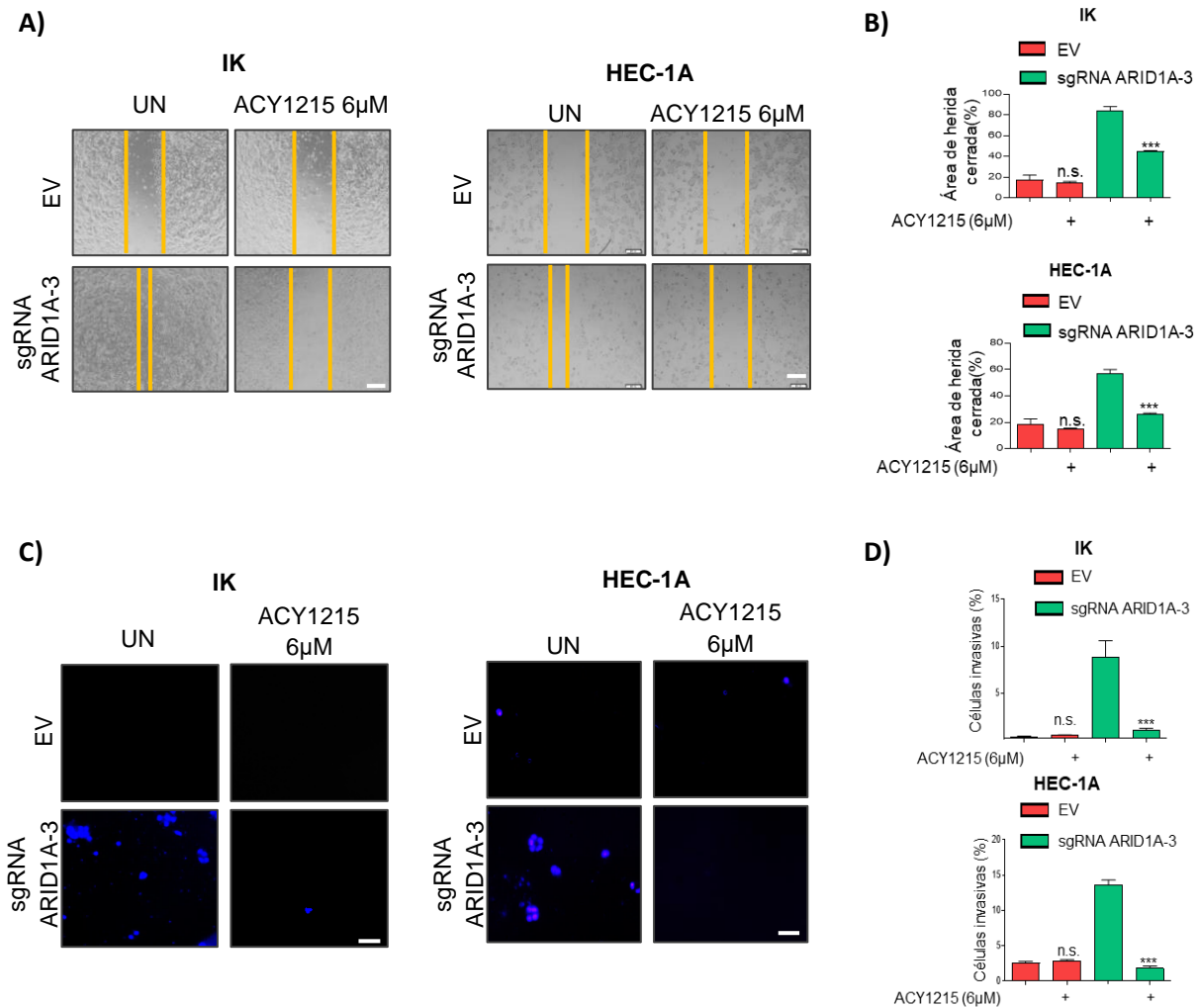
**Figura 67. La pérdida de ARID1A en líneas celulares humanas de CEE promueve un incremento de los niveles de HDAC6 nuclear.** A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra HDAC6 en células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3). B) Gráfico de la cuantificación de la intensidad de HDAC6. C) Gráfico que muestra el porcentaje de colocalización de HDAC6 con el marcador nuclear Hoechst. La tubulina y el Hoechst fueron usadas como marcadores de citoesqueleto y núcleo respectivamente. Barra de escala =25 $\mu$ m. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Después, con el fin de evaluar el rol de HDAC6 en las células de CE con expresión alterada de ARID1A, se empleó el inhibidor farmacológico específico de HDAC6, ACY1215 (Ricolinostat), en estas células. Primero, para corroborar que el tratamiento con ACY1215 estaba inhibiendo el funcionamiento de HDAC6, se evaluaron los niveles de acetilación de p53 en la lisina 373/382, un sustrato directo de HDAC6<sup>146</sup>, tanto en células IK como HEC-1A infectadas con sgRNA ARID1A-3 o con el vector vacío. Los resultados mostraron que el tratamiento con ACY1215 restauraba los niveles de acetilación de p53 en las células con alteración en la expresión de ARID1A, indicando una correcta inhibición funcional de HDAC6 tras el tratamiento con ACY1215 (figura 68).



**Figura 68. La inhibición farmacológica con ACY1215 restaura los niveles de Ac-p53 (Lys 373-382) en líneas celulares humanas de CEE con niveles alterados de ARID1A.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de acetilación de p53 (Lys 373-382) y p53 total en células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3), tratadas o no con ACY1215 6µM durante 48h. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

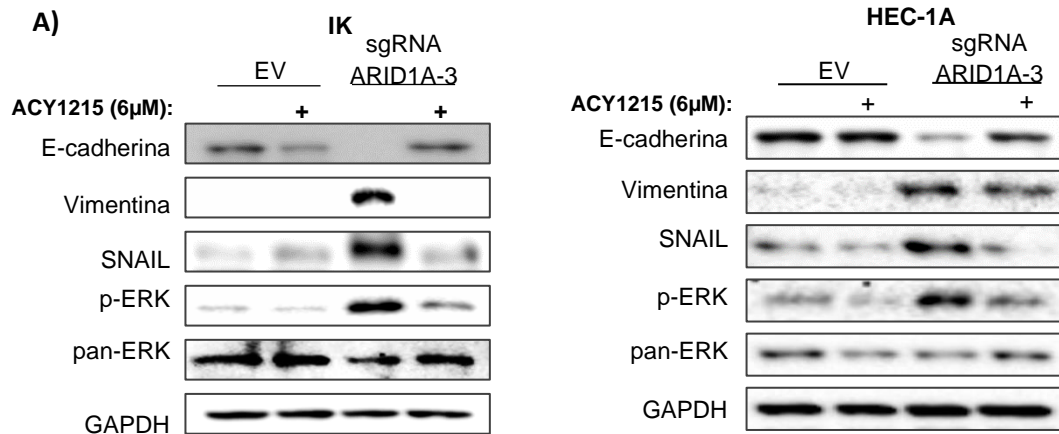
Como anteriormente se ha mencionado, recientes estudios han descrito un nuevo rol epigenético nuclear para HDAC6 en el proceso de EMT<sup>145</sup>. Por ello y debido a los resultados observados en la figura 57, se procedió a estudiar si la inhibición de HDAC6 podría revertir los fenotipos migratorios e invasivos observados con la bajada de expresión de ARID1A. Para ello, se realizaron ensayos de migración de wound healing y de invasión de transwell en las células IK y HEC-1A con alteración en la expresión de ARID1A y en sus células parentales en presencia o no de ACY1215. Como puede observarse en la figura 69, la inhibición farmacológica de la actividad de HDAC6 suprime las capacidades migratorias e invasivas promovidas por la pérdida de expresión de ARID1A.



**Figura 69. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con ACY1215 6µM durante 48h. A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en las células células y condiciones indicadas y B) cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100 µm. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células con invasoras en llevado a cabo en las células y tratamientos indicados y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

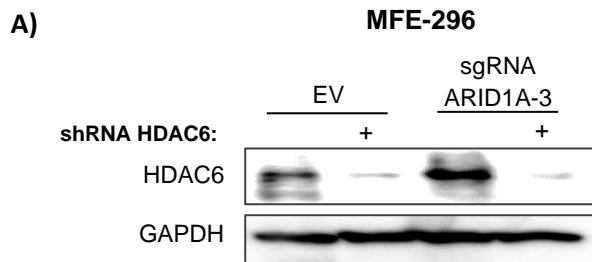
Además, se observó que tras el tratamiento con ACY1215 se restauraban los niveles de expresión del marcador epitelial E-cadherina y decrecían los niveles de los marcadores mesenquimales vimentina y SNAIL. Interesantemente, estos cambios fueron también acompañados de la restauración de los niveles basales de la fosforilación de ERK1/2 (figura 70).





**Figura 70. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la alteración en la expresión de marcadores EMT inducida tras la pérdida de expresión de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con ACY1215 6 $\mu$ M durante 48h. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de E-cadherina, vimentina, SNAIL, p-ERK (Thr202/Tyr204) y total en las células y condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

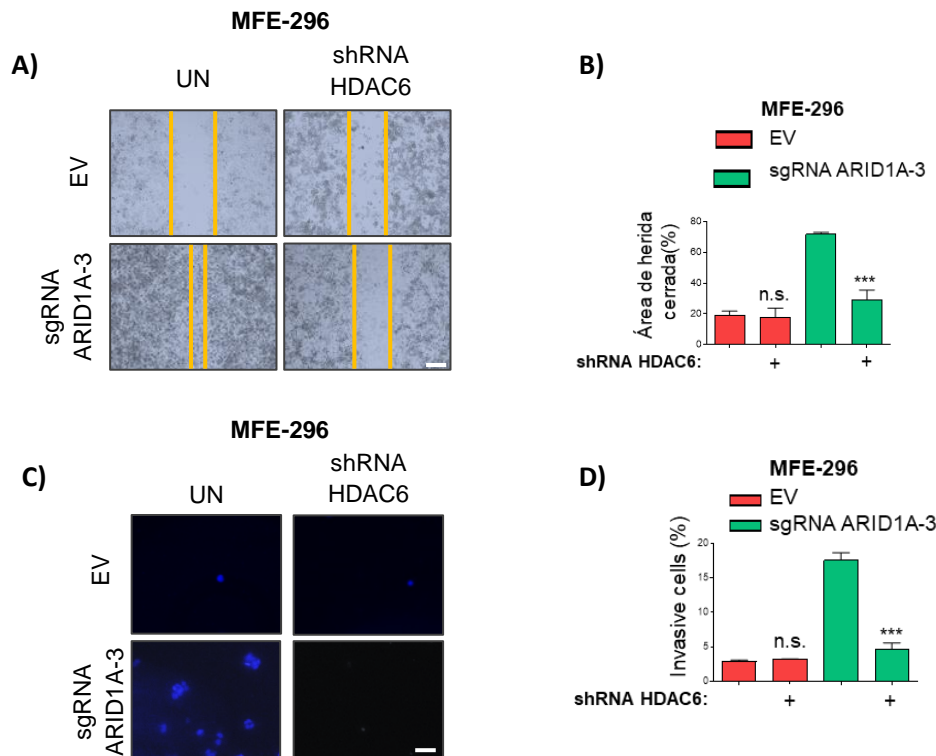
Posteriormente se decidió ratificar estos resultados mediante el silenciamiento genético de HDAC6. Para ello, células sgRNA-ARID1A MFE-296 y sus controles fueron infectadas con partículas lentivirales que contenían shRNA control o shRNA contra HDAC6. La bajada de expresión de HDAC6 en estas células fue corroborada mediante western bolt (figura 71).



**Figura 71. La infección de las células MFE-296 con el shRNA contra HDAC6 disminuye los niveles de expresión de HDAC6.** A) Imágenes representativa del análisis por western blot de los niveles de expresión de HDAC6 en células MFE-296 ARID1A deficientes (o no), infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6 o control. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Posteriormente la capacidad migración e invasión de estas células, fue evaluada mediante la realización de ensayos de migración de wound healing y de invasión de transwell, confirmando que la transducción con el shRNA contra HDAC6 recapitulaba los efectos vistos tras los tratamientos con ACY1215. Como puede verse en la figura 72, los resultados mostraron que la

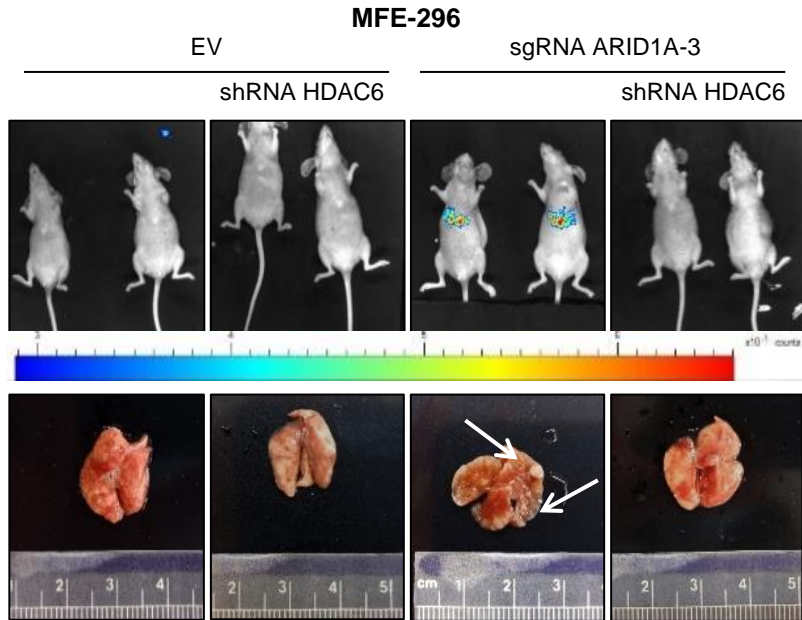
regulación a la baja de HDAC6 revertía las capacidades de migración e invasión promovidas con la pérdida de expresión de ARID1A.



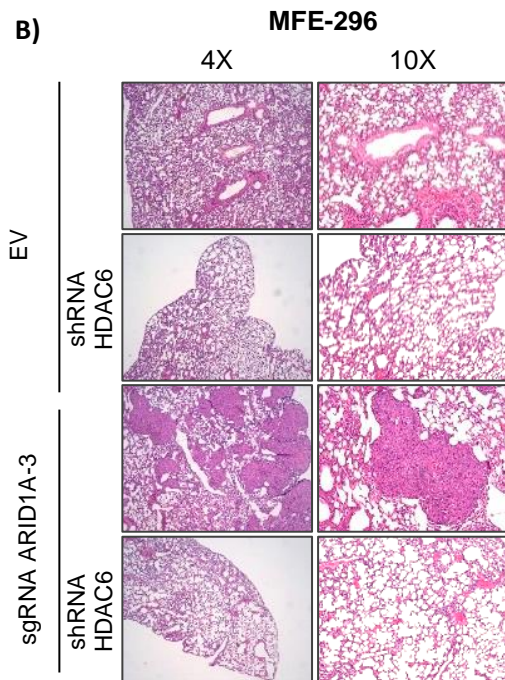
**Figura 72. La disminución de los niveles de expresión de HDAC6 revertía las capacidades migratorias e invasivas promovidas por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en las células MFE-296 ARID1A deficientes (o no) infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6 o control y B) cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células con invasoras en llevado a cabo en las células MFE-296 ARID1A deficientes (o no) infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6 o control y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25 $\mu$ m. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Finalmente, se quiso corroborar si estos resultados se reproducían *in vivo*. Para ello, se inyectaron intravenosamente células GFP/luciferasa-MFE-296 con expresión deficiente de ARID1A y sus células parentales, ambas transducidas con el shRNA-vacío o con el shRNA-HDAC6, en ratones inmunocomprometidos. Transcurridos 10 días se examinó si la bajada de expresión de HDAC6 afectaba a la capacidad de diseminación y a la colonización metastática en pulmón de estas células. Los resultados mostraron que la disminución de la expresión de HDAC6 en las células con alteraciones en la expresión de ARID1A, inducía una disminución de sus capacidades de diseminación y formación de focos metastáticos (figura 73).

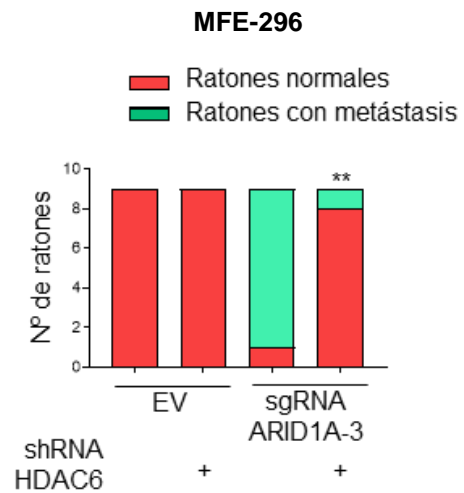
A)



B)



C)



**Figura 73.** La disminución de los niveles de expresión de HDAC6 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastásica adquirida en las líneas celulares humanas de CEE tras la pérdida de ARID1A *in vivo*. Crecimiento metastático de células GFP-luciferasa MFE-296 células ARID1A deficientes (o no) infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6 o control.  $50 \times 10^4$  células fueron inyectadas intravenosamente y se dejaron crecer durante 10 días (ir a materiales y métodos para mayor detalle)  $n = 10$  animales por grupo. A) Imágenes representativas

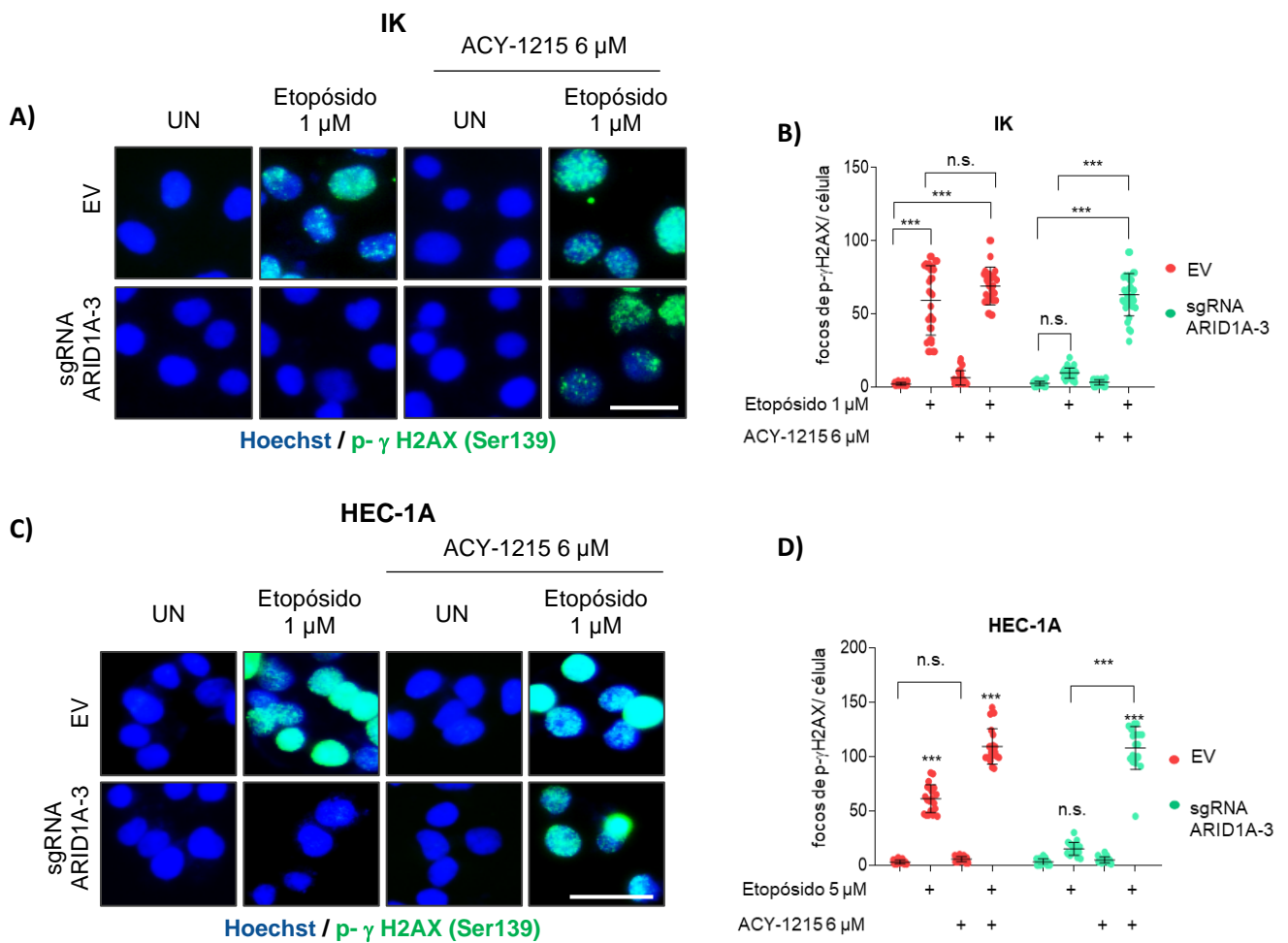
de la señal de bioluminiscencia, imágenes representativas macroscópicas de los pulmones, comparando las metástasis generadas en los pulmones de los ratones inyectados con las células indicadas y B) imágenes representativas microscópicas de las tinciones de Eosina Hematoxilina (EH), 10 días post inyección. Barra de escala =100  $\mu$ m. C) Gráfico representativo mostrando el número de ratones con focos metastáticos presentes en los grupos de animales indicados. El análisis estadístico se realizó usando el test exacto de Fisher. Las barras de error representan la media  $\pm$ SEM. \*\*  $P \leq 0,01$ . EV, vector vacío.

### **1.6. Análisis de la implicación de HDAC6 en la resistencia a la apoptosis inducida por DSB en células con expresión alterada de ARID1A.**

En las células mamíferas, las roturas DSB del DNA son reparadas predominantemente por la vía de HR o por la vía de NHEJ. El balance entre ambas vías es esencial para la estabilidad genómica, y la perturbación de alguna de ellas, a menudo, se traduce en transformaciones oncológicas o en la adquisición de fenotipos malignos<sup>146</sup>. Como se ha mostrado en resultados previos, la inactivación de ARID1A induce una regulación negativa de la vía de reparación de HR. Sin embargo, no está claro que vía de reparación de DNA o molecular es la empleada por las células deficientes de expresión de ARID1A para el mantenimiento de la integridad del DNA en presencia de daño por DSB del DNA.

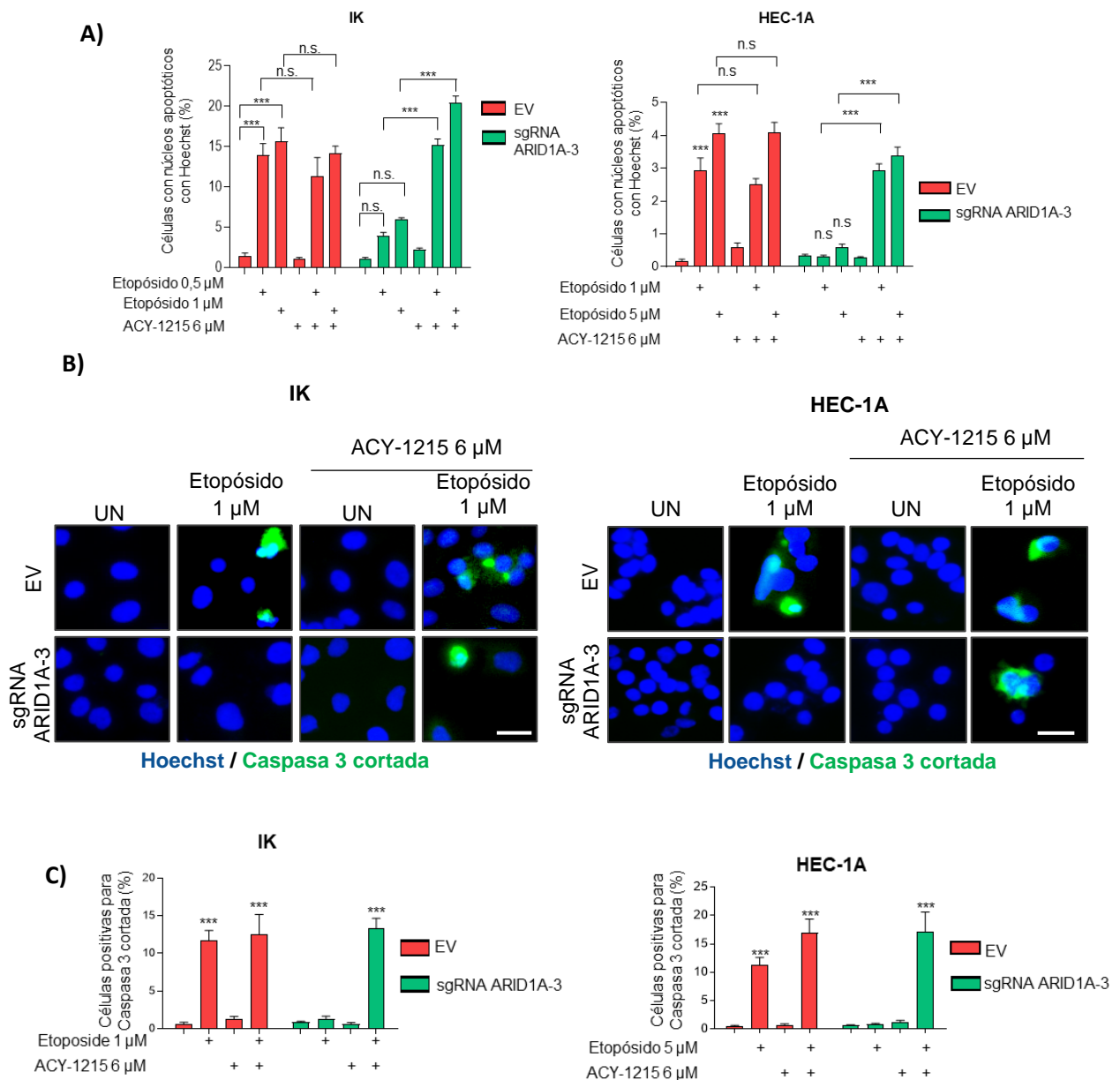
Algunos estudios han desvelado un importante rol para HDAC6 en la vía de reparación del daño DSB del DNA por medio de la deacetilación de la proteína Ku70, una proteína clave en la vía de reparación NHEJ del DNA<sup>107</sup>. En base a estas observaciones, y teniendo en cuenta los resultados previos que revelaron una sobreexpresión de HDAC6 en las células con expresión deficiente de ARID1A, se hipotetizó que la inhibición de HDAC6 podría revertir la resistencia a la apoptosis inducida por etopósido, presentada por las células con alteración de ARID1A.

Con el fin de corroborar esta hipótesis, se realizó una inmunofluorescencia contra el marcador canónico de daño a DNA, p- $\gamma$ H2AX, en células IK y HEC-1A con expresión alterada de ARID1A o normal, tratadas o no con etopósido y el inhibidor de HDAC6, ACY1215. Los resultados obtenidos, mostraron que la combinación de ambos tratamientos incrementaba significativamente el número de focos positivos para p- $\gamma$ H2AX por célula en las células con expresión deficiente de ARID1A, al contrario que en lo observado en estas células cuando solo eran tratadas solamente con etopósido (figura 74).



**Figura 74. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión al daño al DNA por el etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 µM o 5 µM respectivamente y/o ACY1215 6 µM, durante 36h. A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia del marcador de daño a DNA, p-γH2AX (Ser139) y Hoechst como marcador nuclear en las células y condiciones indicadas. B) gráficos representativos de la cuantificación de focos de p-γH2AX por célula en los tratamientos descritos. Barra de escala =25µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Posteriormente, se evaluó por inmunofluorescencia los niveles de apoptosis después del tratamiento combinatorio de Etopósido y ACY-1215. Los resultados obtenidos desvelaron que el tratamiento combinatorio inducía un aumento del número de núcleos apoptóticos, así como del número de células positivas para la caspasa 3 cortada, en las células con alteraciones de ARID1A (figura 75).

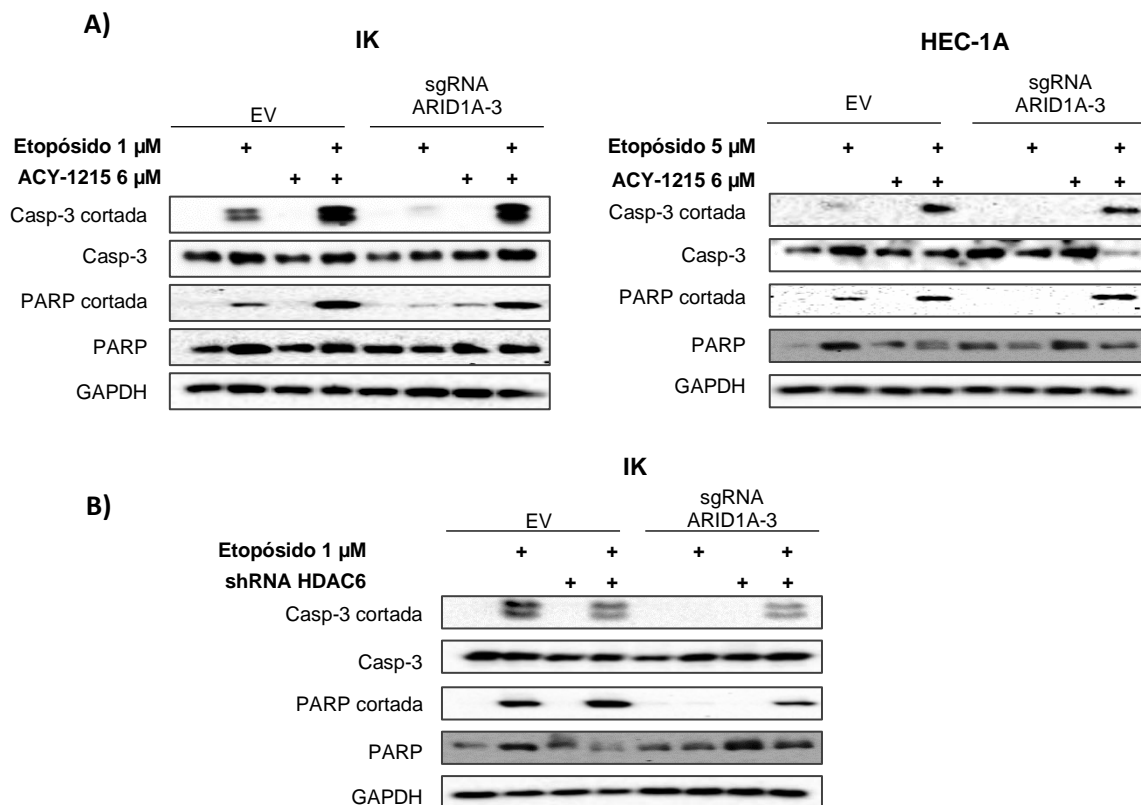


**Figura 75. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión a la respuesta apoptótica generada por el tratamiento con etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 μM o 5 μM respectivamente y/o ACY1215 6 μM, durante 36h. A) Cuantificación de núcleos con morfología apoptótica expuestos por la tinción nuclear con Hoechst bajo las condiciones indicadas. B) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra la caspasa 3 cortada y núcleos evidenciados por Hoechst en las condiciones indicadas y C) cuantificación de número de células positivas para la caspasa 3 cortada. Barra de escala =25 μm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Además, y en concordancia con estos resultados, al analizar por western blot los niveles de expresión de proteína se la Caspasa3 y PARP cortadas, se apreció un aumento de estas proteínas



pro-apoptóticas en las células con niveles deficientes de expresión de ARID1A que habían sido expuestas a la doble combinatoria de etopósido y ACY1215. Estos resultados indican que la inhibición de HDAC6 induce la reversión de la resistencia a la apoptosis generada por etopósido, que había sido observada en estas células con niveles alterados de ARID1A (figura 76 A). Esta vulnerabilidad al etopósido también se vio replicada en las células deficientes para ARID1A que habían sido infectadas con el shRNA HDAC6 (figura 76 B).

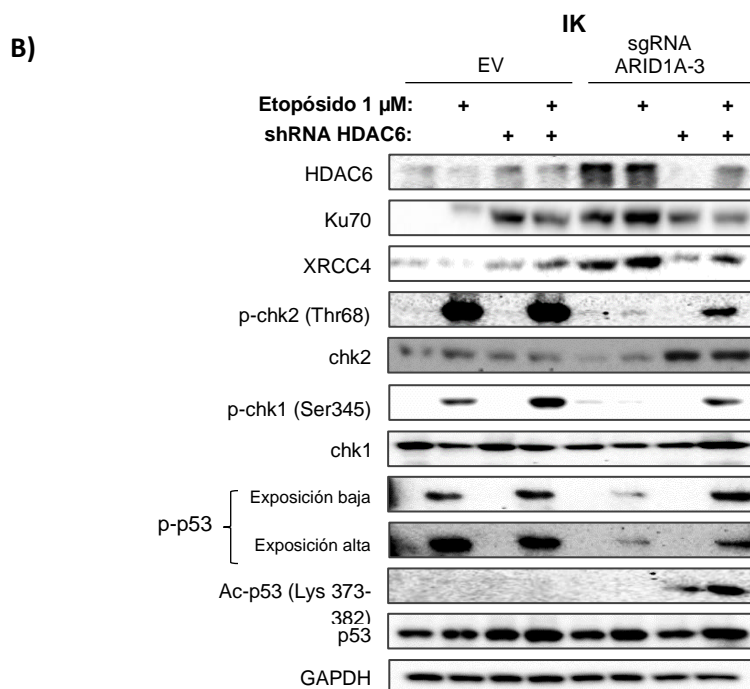
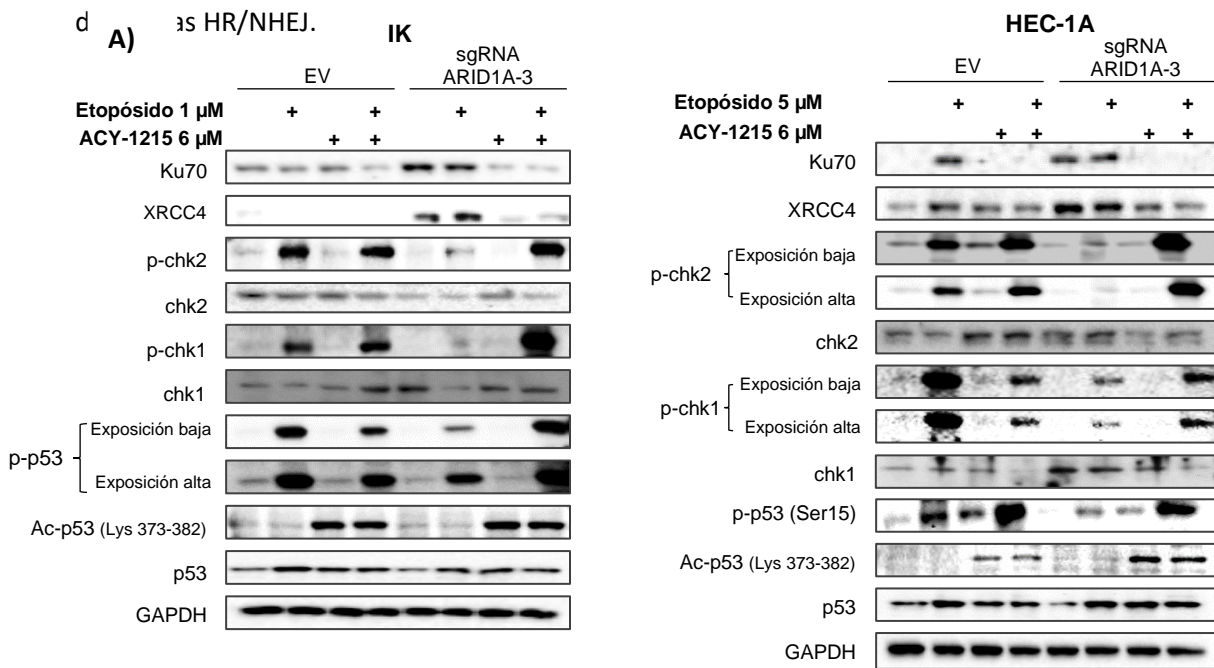


**Figura 76. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 revierte la evasión de la expresión de los desencadenantes de la cascada apoptótica expresados tras el tratamiento con etopósido promovida por la pérdida de ARID1A en las líneas celulares humanas de CEE.** A) Células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 $\mu$ M o 5 $\mu$ M respectivamente y/o ACY1215 6 $\mu$ M, durante 36h y B) células IK infectadas con el vector vacío o con el sgRNA ARID1A-3 fueron infectadas o no con el shRNA HDAC6 y tratadas o no con Etopósido 1 $\mu$ M. Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de la caspasa 3 y PARP cortadas y totales en las condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Posteriormente, se decidió evaluar que mecanismo molecular podría estar implicado en la adquisición de esta vulnerabilidad al daño por DSB en las células deficientes para la expresión de ARID1A bajo la combinación de los tratamientos de etopósido y ACY1215. Dado lo mencionado previamente sobre el rol de HDAC6 en la vía de reparación del DNA por daño DSB, se hipotetizó que la inhibición de HDAC6 podría estar alterando el equilibrio del balance entre las vías de reparación de DNA HR/NHEJ. Con el propósito de dismantelar esta hipótesis, se



analizó el estado de expresión de los principales efectores de la vía de HR: p-chk2, p-chk1 y p-p53 (y sus totales) y el de los principales efectores de la vía de NHEJ: Ku70 y XRCC4, bajo las condiciones indicadas. Además, para corroborar el efecto en la inhibición del funcionamiento de HDAC6, se analizaron los niveles de acetilación de p53 en la lisina 373-382. Como puede observarse en la figura 77, aunque las células con regulación a la baja de ARID1A presentaban un constante estado de activación de la vía de reparación del DNA NHEJ (representado por un incremento en los niveles de expresión de Ku70 y XRCC4) incluso en condiciones basales, cuando éstas eran tratadas con ACY1215, se observaba una disminución en los niveles de expresión de Ku70 y XRCC4, así como un aumento de los niveles de las fosforilaciones activadoras de chk2, chk1 y p53, liderando a la activación apoptótica. Asimismo, estos resultados se replicaban en las células infectadas con el shRNA contra HDAC6, corroborando así dicha alteración en el balance



**Figura 77. La inhibición farmacológica de HDAC6 con ACY1215 altera el equilibrio en el balance de las vías de reparación del daño DSB de DNA HR/NHEJ.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de HDAC6, Ku70, XRCC4, p-chk2 (Thr68), p-chk1 (Ser345), p-p53 (Ser15), Ac-p53 (Lys 373-382) así como de sus totales en células IK y HEC-1A infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-2 y lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y sus células parenterales fueron tratadas con Etopósido 1 $\mu$ M o 5 $\mu$ M respectivamente y/o ACY1215 6 $\mu$ M, durante 36h. B) ) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de HDAC6, Ku70, XRCC4, p-chk2 (Thr68), p-chk1 (Ser345), p-p53 (Ser15), Ac-p53 (Lys 373-382) así como de sus totales en células IK *ARID1A* deficientes (o no) infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6 o control. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Finalmente, con el fin de corroborar los efectos observados *in vivo*, se inyectaron subcutáneamente células IK sgRNA *ARID1A-3* infectadas o no con shRNA HDAC6, en ratones inmunocomprometidos y éstos fueron tratados o no con etopósido. Como se evidencia en la figura 78, los tumores con expresión de HDAC6 disminuida eran menores respecto a los que presentaban expresión salvaje de los niveles de HDAC6 tras el tratamiento con Etopósido.

Todos estos resultados en conjunto, sugieren que la inhibición de HDAC6 causa vulnerabilidad a la apoptosis inducida por los tratamientos con etopósido en las células con pérdida de expresión de *ARID1A*.

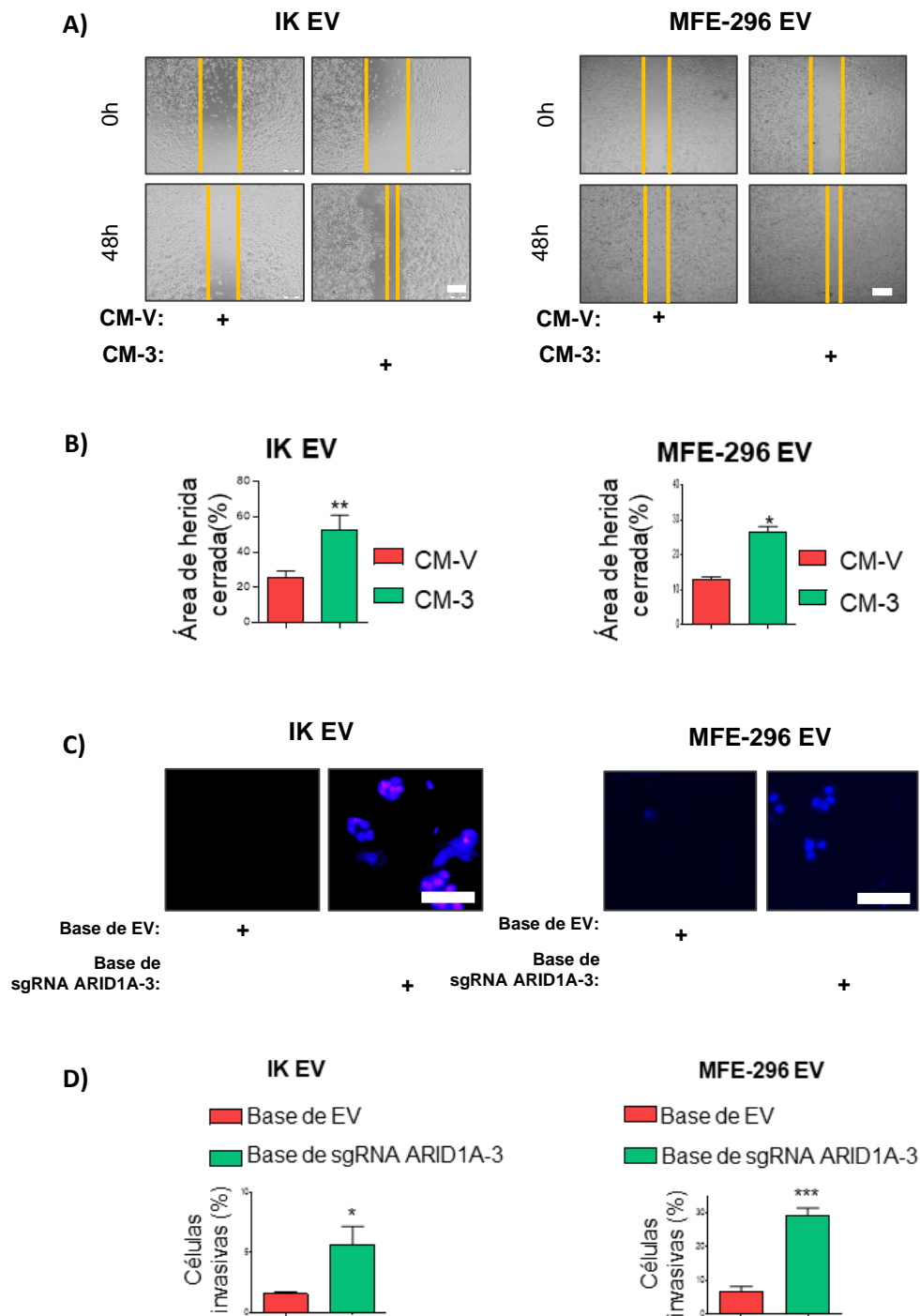


## 2. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE ARID1A EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Debido a que, en el primer capítulo de la presente tesis, se describió que la alteración de la expresión de ARID1A en células tumorales de endometrio previamente establecidas, promovía la adquisición de fenotipos de EMT fomentando un incremento de las capacidades migratorias e invasivas de estas células, confiriéndoles fenotipos de mayor agresividad. Y teniendo en cuenta el hecho de que los tumores se componen de un complejo microambiente, compuesto por células tanto residentes como infiltradas, factores solubles secretados y matriz extracelular<sup>65,67,147</sup>. En este segundo capítulo se decidió evaluar la influencia e implicación de las células endometriales tumorales con expresión alterada de ARID1A en el microambiente tumoral del CE.

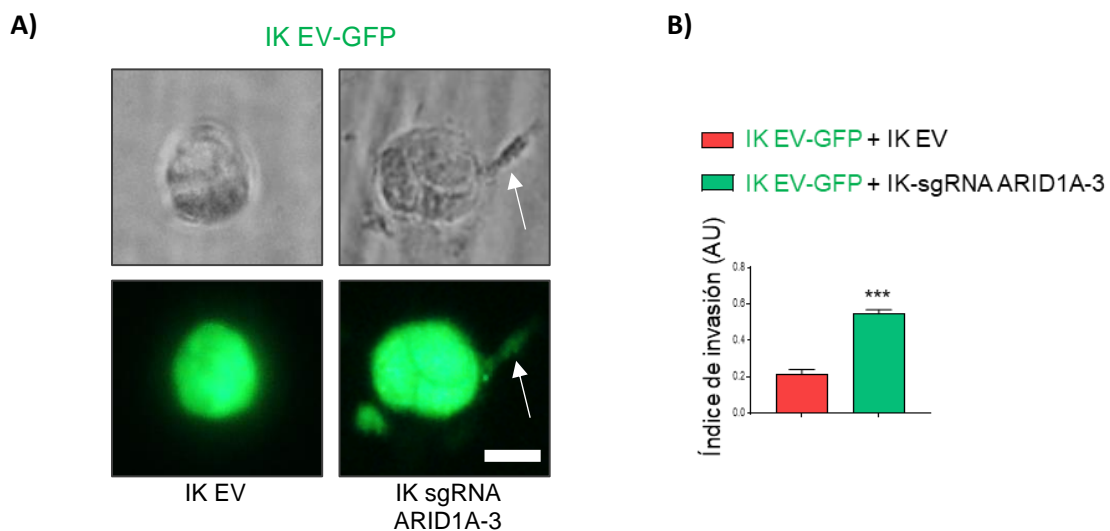
### 2.1. Análisis del efecto de las células tumorales de endometrio con expresiones alteradas de ARID1A en la promoción de fenotipos tumorales más agresivos en las células endometriales tumorales circundantes con expresión salvaje de ARID1A.

Dado el importante papel que juegan los factores solubles del microambiente tumoral promoviendo la agresividad tumoral, entre otras cosas, mediante la fomentación de la migración e invasión celular<sup>148</sup>, se hipotetizó que las células de CE con regulación a la baja de la expresión de ARID1A podrían estar induciendo señales que condujesen a la alteración fenotípica de las células tumorales vecinas con expresión salvaje de ARID1A. Con el fin de testar esta hipótesis, se recolectaron medios condicionados (CM) procedentes de líneas celulares humanas de CEE, tanto de células IK como de MFE-296, infectadas o no con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3). En primer lugar, se trataron las células parentales con expresión salvaje de ARID1A con los medios condicionados recogidos de células con expresión salvaje para ARID1A (CM-V) o con los CM recogidos de células con la expresión de ARID1A regulada a la baja (CM-3), y se realizaron ensayos de migración de wound healing (Figura 79 A-B). Los resultados mostraron que los tratamientos con CM-3 incrementaban significativamente las capacidades migratorias de las células salvajes en comparación con los tratamientos con CM-V, tanto en células IK como en las MFE-296. A continuación, con tal de evaluar el efecto en la invasión se realizaron ensayos de invasión de transwell en los que como quimioatrayentes se usaron células IK o MFE-296, infectadas o no con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3), y se analizó la capacidad que ambas tenían en atraer y promover la invasión de sus correspondientes células parentales (metodología explicada con más detalle en el apartado de materiales y métodos, figura 33). Los resultados mostraron que tanto las células IK como MFE-296 infectadas con el sgRNA contra ARID1A tenían una mayor capacidad para promover la invasión células de sus células parentales, respecto a las infectadas con el EV (figura 79 C-D).



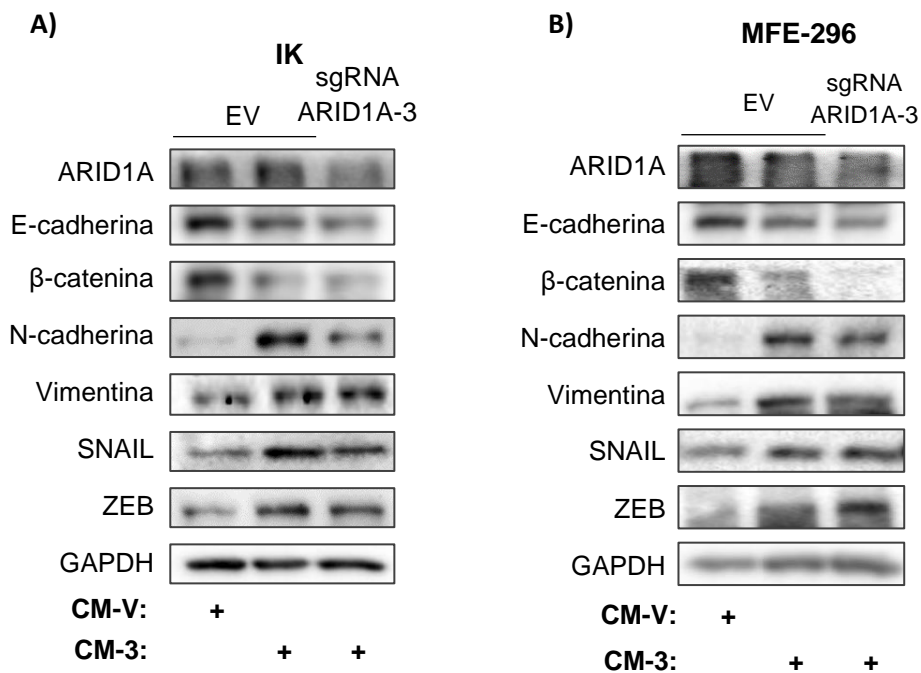
**Figura 79. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK y MFE-296 infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A*-3) (CM-3) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío quimioatraídas por células IK o MFE-296 infectadas con sgRNA *ARID1A*-3 o EV y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25  $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  EV, vector vacío.

Para corroborar estos resultados, se realizaron ensayos de co-cultivos 3D en los que células IK con expresión salvaje de ARID1A marcadas con GFP, fueron cultivadas en presencia de células IK infectadas con sgRNA contra ARID1A o con el vector vacío, pero sin marcar con GFP (metodología explicada con más detalle en el apartado de materiales y métodos, figura 22). Cuando se analizó el porcentaje de invasión de las glándulas formadas por células IK con expresión salvaje de ARID1A positivas para GFP, se observó que éstas incrementaban su capacidad de formación de filopodios e invasión del Matrigel, cuando se encontraban en co-cultivo con las células que expresaban niveles disminuidos de ARID1A, en comparación con las que lo estaban con las células control (Figura 80).



**Figura 80. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la invasión de las glándulas 3D formadas por células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con células IK infectadas o no con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) y B) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25  $\mu$ m. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío. AU, unidad arbitraria.

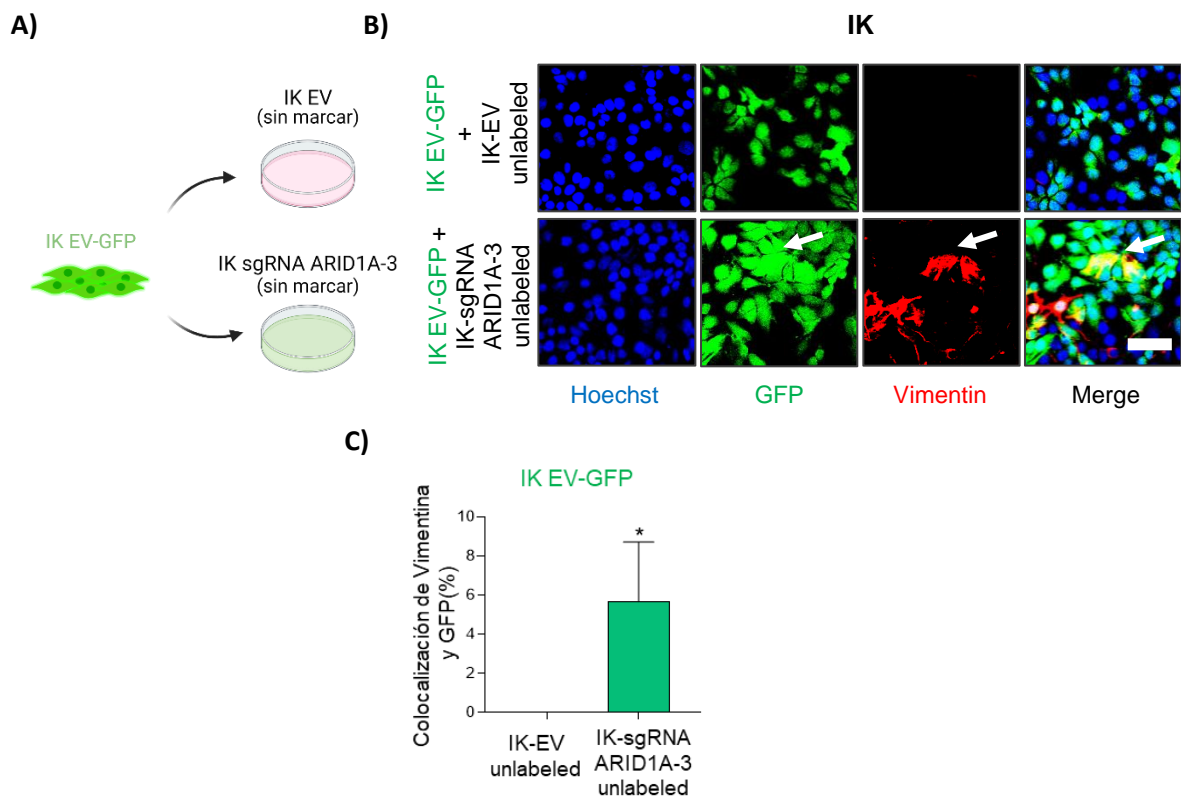
Como ya se ha mencionado, algunos estudios sitúan los cambios en el fenotipo de EMT como mecanismo central de los procesos de migración e invasión celular en la neoplasia endometrial<sup>136,137</sup>. Por ello, se decidió evaluar el estado de expresión de los marcadores de EMT en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A que previamente habían sido tratadas con CM-V o CM-3, mediante la realización de ensayos de western blot. Los resultados mostraron que las células de CE con expresión salvaje de ARID1A (tanto IK como MFE-296), disminuían la expresión de marcadores epiteliales (tales como E-cadherina y  $\beta$ -catenina), y aumentaban la expresión de marcadores mesenquimales (tales como N-cadherina y vimentina) y la de factores de transcripción pro-EMT (como SNAIL y ZEB), cuando éstas eran tratadas con los CM procedentes de las células con alteraciones en la expresión de ARID1A (CM-3) en comparación con cuando eran tratadas con los CM control (CM-V), llegando incluso a ser similares a los niveles de expresión de las células infectadas con el sgRNA contra ARID1A (Figura 81).



**Figura 81. Los CM recolectados de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de ARID1A, E-cadherina, β-catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB en células A) IK y B) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) o del vector vacío tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK y MFE-296 infectadas con el EV (CM-V) o con sgRNA ARID1A-3 (CM-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

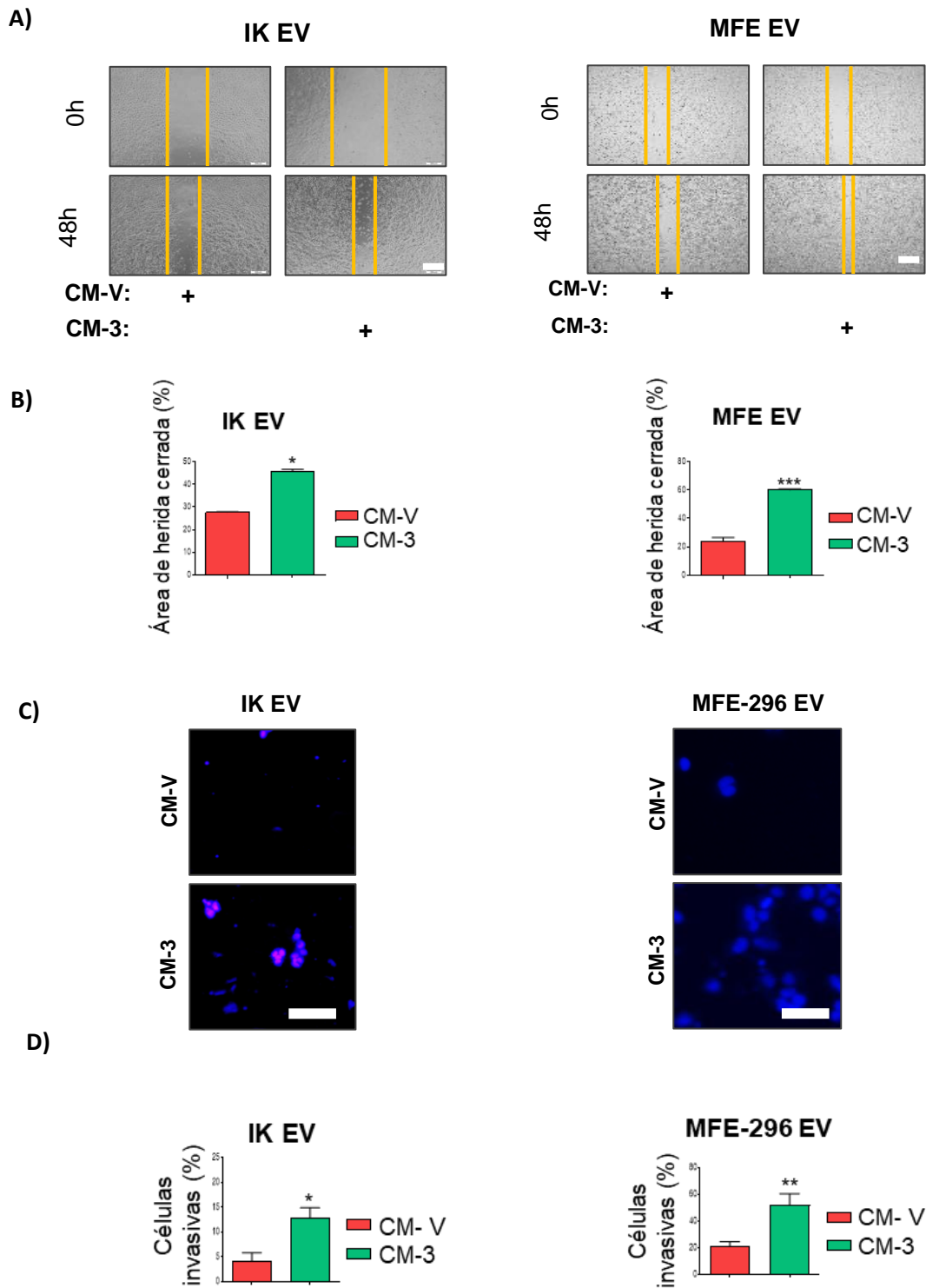
Con tal de consolidar estos resultados, se realizaron co-cultivos durante 72h de células IK con expresión salvaje de ARID1A marcadas con GFP, junto con células IK infectadas con el sgRNA ARID1A-3 o el EV, pero sin marcar con GFP (figura 82-A), y se evaluó por ICF la expresión del marcador mesenquimal vimentina. Los resultados mostraron un incremento significativo de la expresión de vimentina en las células IK salvajes (GFP-positivas) que habían crecido en presencia de las células con expresión alterada de ARID1A en comparación con las que habían crecido junto con las células control (figura 82 B-C).





**Figura 82. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la expresión de vimentina en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Representación esquemática del flujo de trabajo, brevemente células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) fueron co-cultivadas con células IK infectadas o no con lentivirus portadores del sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A-3*) sin marcar con GFP, durante 72 horas. B) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra GFP y el marcador mesenquimal vimentina, realizadas en dichos cultivos y C) cuantificación del porcentaje de células positivas para GFP y Vimentina. Tinción con Hoechst empleada para evidenciar los núcleos. Barra de escala =25  $\mu$ m. EV, vector vacío.

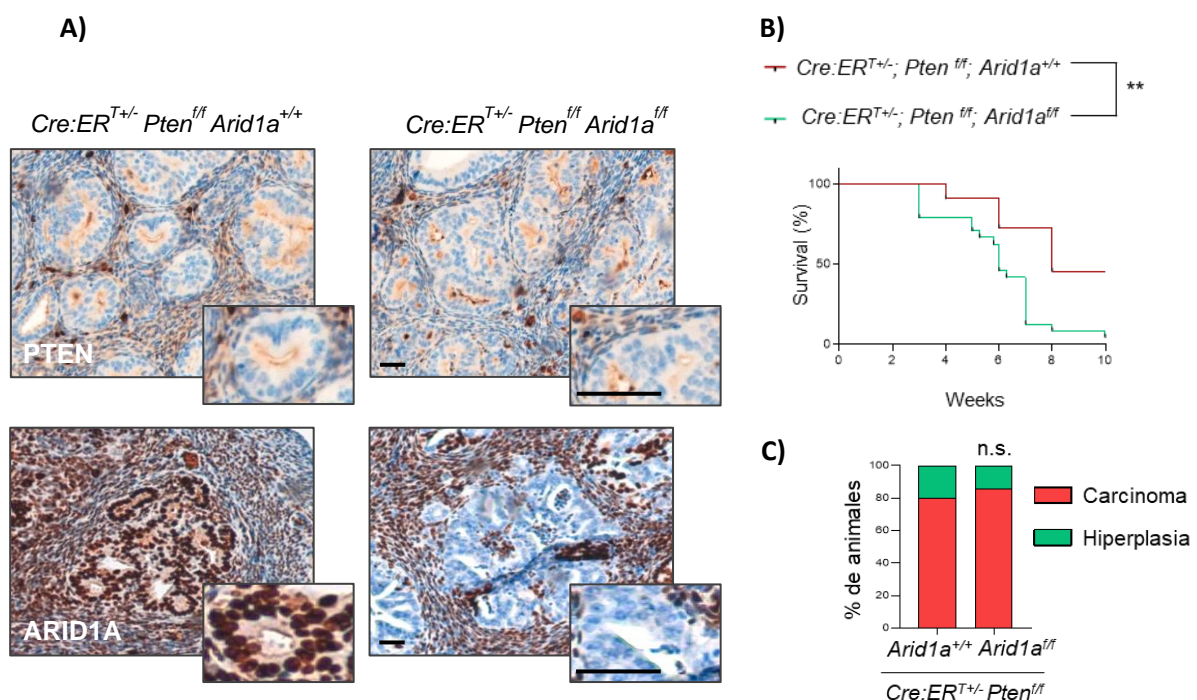
Con tal de investigar más a fondo las señales inducidas por las células con alteraciones en ARID1A, sobre aquellas que presentaban expresión salvaje, primero se trataron células IK y MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A con CM-3 o CM-V durante 72. Transcurrido dicho tiempo se les cambió el medio, a medio fresco normal y se realizaron con estas células ensayos de migración de wound healing o de invasión de transwell. Se observó, que aquellas células de CE que previamente habían sido tratadas con CM-3 presentaban significativamente mayores habilidades migratorias e invasivas respecto a las células que habían sido tratadas con CM-V, demostrándose así que estos efectos pro-tumorales observados causados por el CM-3, eran capaz de mantenerse en ausencia de los estímulos inducidos por le CM-3 de manera sostenida (figura 83).



**Figura 83.** Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A, de manera sostenida. A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío

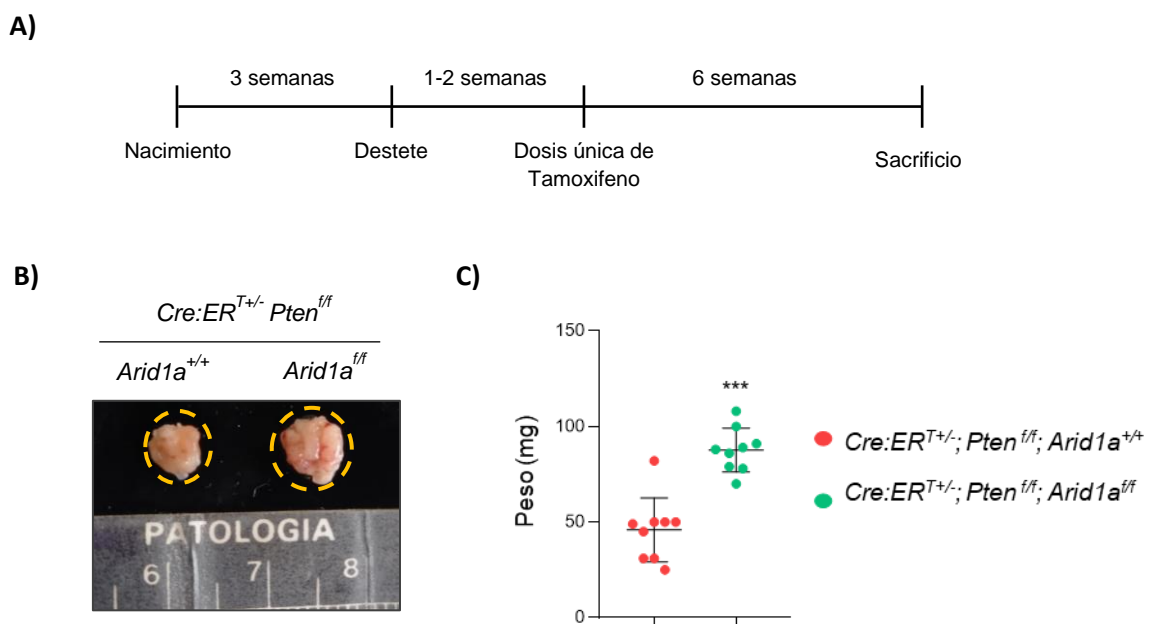
previamente tratadas durante 72 horas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK y MFE-296 infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, previamente tratadas durante 72 horas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK y MFE-296 infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3) y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25  $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; EV, vector vacío.

A continuación, y con tal de explorar la relevancia de ARID1A en la señalización tumoral *in vivo*, se generó la colonia *Cre:ERT*; *Pten*<sup>ff</sup>; *Arid1a*<sup>ff</sup>. Para ello, se cruzó el modelo condicional knock-out de *Pten* inducible por Tamoxifeno, *Cre:ERT*; *Pten*<sup>ff</sup>, en el cual tras una dosis única de Tamoxifeno se produce la pérdida condicional de *Pten* en varios tipos de células epiteliales dando lugar a la generación de adenocarcinomas de endometrio<sup>24</sup>, con el modelo knock-out inducible *Arid1a*<sup>ff</sup>, caracterizado en resultados previos. Transcurridas 5 semanas post nacimiento, ratones *Cre:ER*<sup>T+/-</sup>; *Pten*<sup>ff</sup>; *Arid1a*<sup>+/+</sup> o *Cre:ER*<sup>T+/-</sup>; *Pten*<sup>ff</sup>; *Arid1a*<sup>ff</sup> fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de Tamoxifeno. Estos animales fueron monitorizados exhaustivamente hasta que tuvieron que recibir la eutanasia a causa de su estado, siguiendo los criterios de punto final. Una vez sacrificados, se realizó una evaluación macroscópica y microscópica de sus úteros. En primer lugar, se corroboró por medio de inmunohistoquímica que efectivamente se había producido la pérdida de expresión tanto de PTEN como de ARID1A en el tejido endometrial (figura 84-A). A pesar de que los animales *Cre:ER*<sup>T+/-</sup>; *Pten*<sup>ff</sup>; *Arid1a*<sup>ff</sup> presentaban porcentajes de supervivencia significativamente más cortos que los animales *Cre:ER*<sup>T+/-</sup>; *Pten*<sup>ff</sup>; *Arid1a*<sup>+/+</sup> (Figura 84-B), la valoración macroscópica de los úteros de dichos ratones por medio de tinciones de HE determinó que no existían diferencias histológicas significativas entre los animales de los distintos grupos, presentando casi todos los animales de ambos grupos CE. (Figura 84-C).



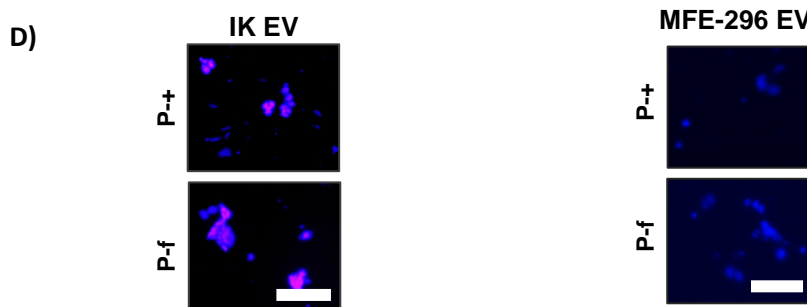
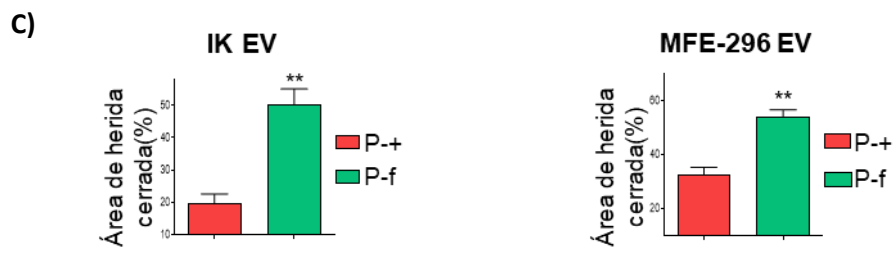
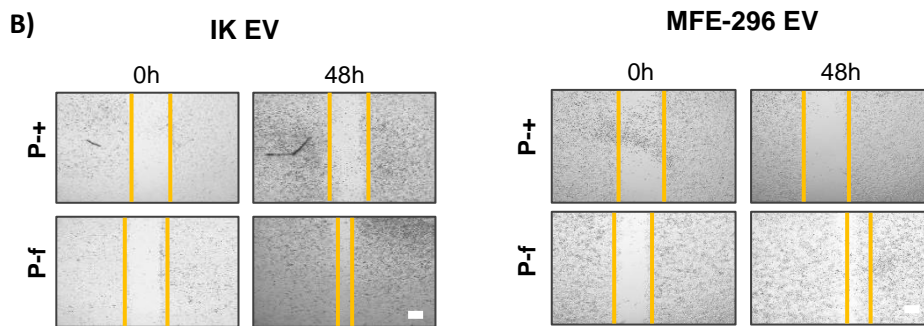
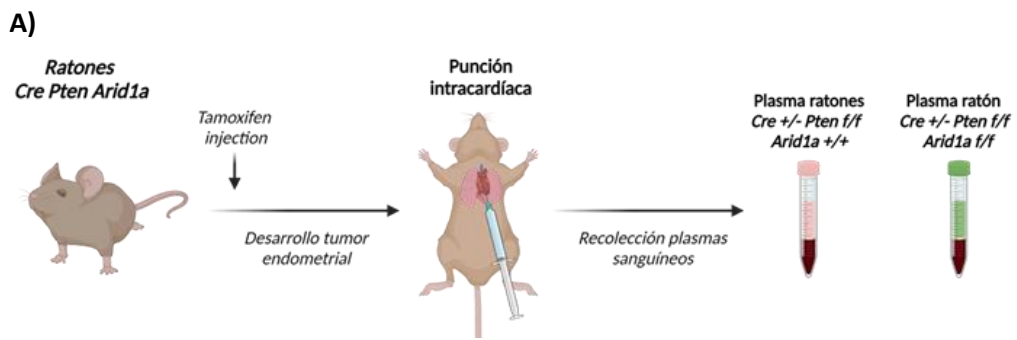
**Figura 84. Análisis de la supervivencia e histología endometrial en el modelo murino *Cre:ERT; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*.** A) Imágenes representativas de Inmunohistoquímica contra PTEN y ARID1A en secciones seriadas de endometrio de ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* para corroborar la pérdida de expresión in vivo tras la administración de Tamoxifeno, con secciones magnificadas recuadradas. Barra de escala =100µm. B) Gráfica representativa de la curva de Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*. C) Imágenes representativas de eosinas hematoxilinas (EH) llevada a cabo en secciones seriadas de endometrios de ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* con secciones magnificadas recuadradas. Barra de escala =100µm. D) histograma representativo de la evaluación histológica de los endometrios de los ratones de dichos grupos a la hora de tener que recibir la eutanasia. n=10 para cada grupo; \*\*P≤0,01; n.s. (no significativo, P≥0,05).

Con el objetivo de clarificar la causa de la diferencia entre las ratios de supervivencia observadas entre los diferentes grupos de ratones, se decidió realizar una necropsia exhaustiva de estos ratones. Para ello, se inyectó intraperitonealmente una dosis única de Tamoxifeno en ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* y se sacrificaron una vez transcurridas 6 semanas post inyección (Figura 85-A). Tras la evaluación macroscópica de los diferentes órganos que podían verse afectados, se observó que las tiroides de los ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* mostraban volúmenes significativamente más elevados que los del grupo control, hecho que les producía la obstrucción de la tráquea antes que a los animales del grupo control (Figura 85 B-C), reduciendo así la vida media de dichos ratones sin que lleguen a apreciarse diferencias histológicas a nivel de CE. Este hecho también ocurre en los ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>* del modelo murino *Cre:ERT<sup>T</sup>; Pten<sup>ff</sup>*, los cuales también han de ser sacrificados debido al tamaño de sus tiroides. Por lo que estos resultados demuestran que la pérdida de ARID1A acelera este proceso.



**Figura 85. La pérdida de expresión de ARID1A en las células epiteliales del modelo murino *Cre:ERT; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* acelera el incremento del volumen de las tiroides.** A) Diseño experimental para el análisis de los ratones de la colonia *Cre:ERT; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>*. En resumen, los ratones se destetaron 3 semanas después del nacimiento y, después de 6 semanas del destete, se les inyectó una dosis única de Tamoxifeno para lograr la doble ablación de *Pten* y *Arid1a*. Los ratones fueron sacrificados 6 semanas post inyección. B) Imágenes representativas de las tiroides de ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* y C) gráfico representativo de su peso. n=10 para cada grupo; \*\*\*P≤0,001

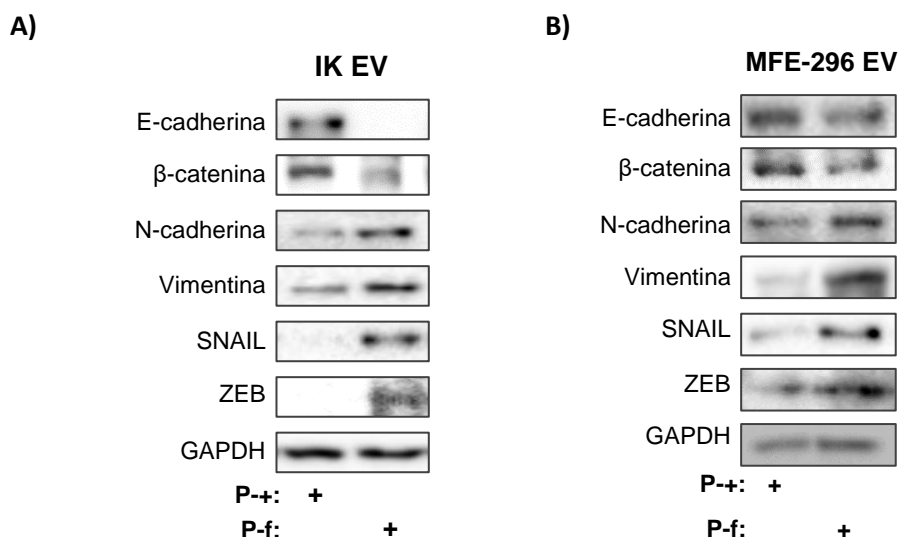
Pese a no haber denotado diferencias en la histología de los tumores endometriales entre los ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>*, dado el claro efecto observado de las células de CE con pérdida de expresión de ARID1A sobre la señalización tumoral, nos alentamos a ver si estos resultados se reproducían *in vivo*. Con el fin de elucidar esta hipótesis, ratones *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de Tamoxifeno y monitorizados exhaustivamente hasta que tuvieron que recibir la eutanasia. En dicho punto se realizó la recolección del plasma de dichos ratones. A continuación, células IK o MFE con expresión salvaje de ARID1A fueron tratadas con los plasmas recolectados de los ratones con CE *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P+) o los plasmas de los ratones con CE *Cre:ERT<sup>+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* (P-f) (Figura 86 A). Para analizar si los tratamientos con estos plasmas inducía cambios en capacidades migratorias e invasivas de las células de CE tratadas, se realizaron ensayos de migración de wound healing (figura 86 B-C) y de invasión de transwell (figura 86 D-E). Los resultados revelaron que los tratamientos con los plasmas P-f eran capaces de promover un aumento de las capacidades migratorias e invasivas de las células IK y MFE con expresión salvaje de ARID1A, en comparación con los tratamientos con los plasmas P+.





**Figura 86. Los plasmas recolectados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* con CE promueven la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Representación esquemática del diseño experimental. En resumen, ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* fueron destetados 3 semanas después del nacimiento y, después de 5 semanas del destete, se les inyectó una dosis única de Tamoxifeno para lograr la doble ablación de *Pten* y *Arid1a*. Los ratones fueron monitorizados hasta el punto donde tuvieron que recibir eutanasia, en el cual se realizó la recolección de sus plasmas. Dichos plasmas fueron empleados para el tratamiento de líneas celulares de CEE con expresión salvaje de ARID1A. B) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas con plasmas recolectados de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P+) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (P-f) con CE y C) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. D) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK y MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío previamente tratadas con plasmas P+ o P-f y E) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25  $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; EV, vector vacío.

Finalmente, debido a lo observado, se decidió evaluar cómo se encontraban los niveles de expresión de los principales marcadores de EMT, tras los tratamientos con los plasmas recolectados P+ o P-f. Como puede apreciarse en la figura 87, los resultados de los ensayos de western blot revelaron que los tratamientos con los plasmas P-f, promovían en las células IK y MFE controles la disminución de los niveles de los marcadores epiteliales (E-cadherina y  $\beta$ -catenina,) y la sobreexpresión de los marcadores mesenquimales (N-cadherina y vimentina) y la de factores de transcripción pro-EMT (SNAIL y ZEB), en comparación con los tratamientos con los plasmas P+.

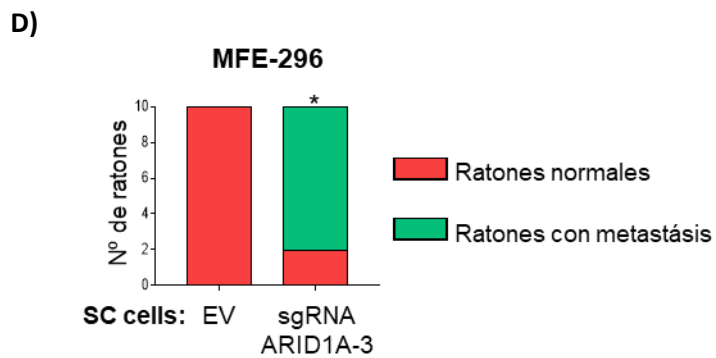
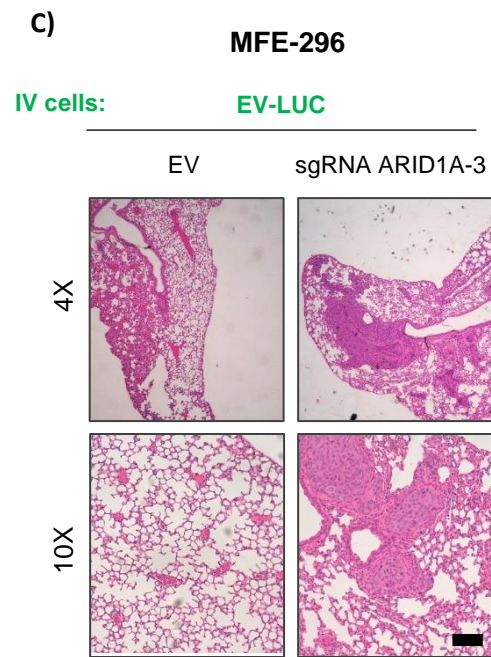
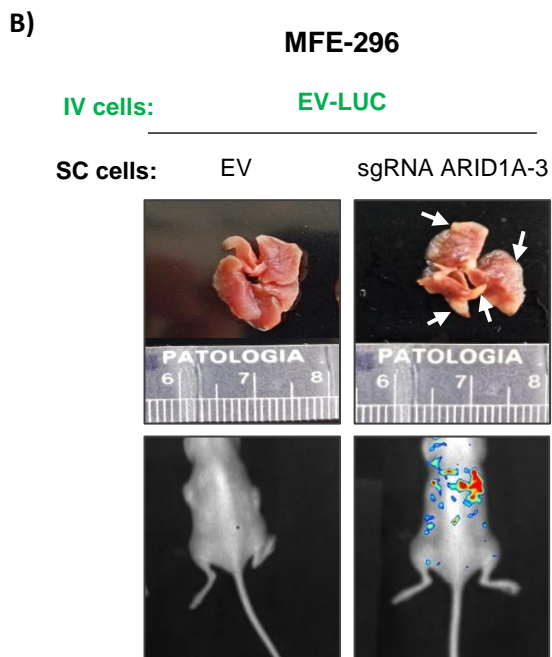
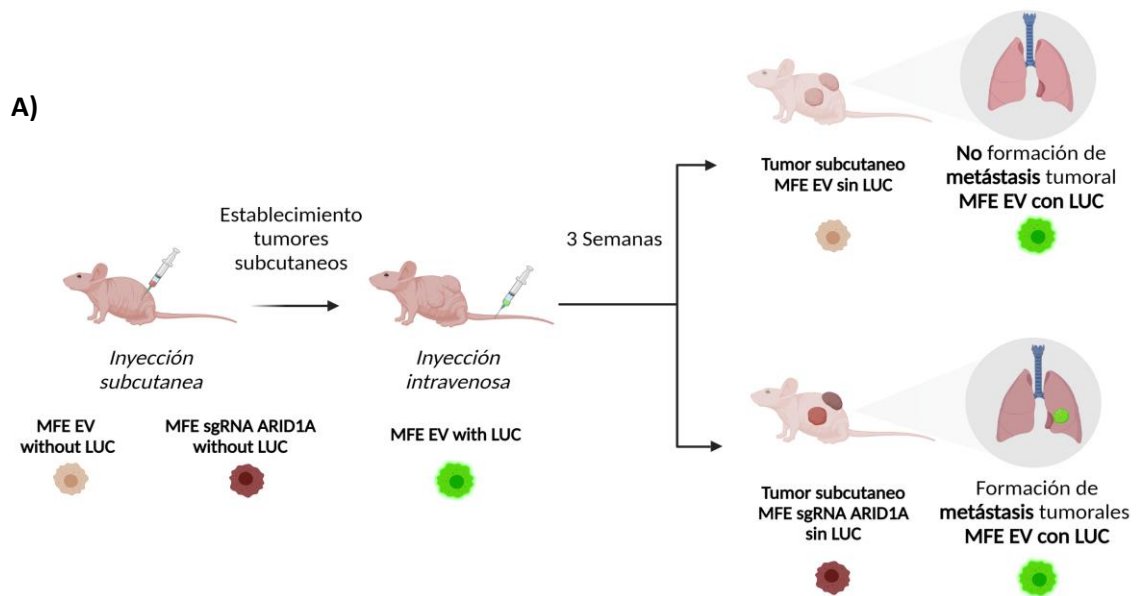


**Figura 87. Los plasmas recolectados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* con CE promueven la adquisición de fenotipos EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A)



Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión de E-cadherina,  $\beta$ -catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB en células A) IK y B) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas con plasmas recolectados de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P-+) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (P-f) con adenocarcinomas endometriales. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Por último, se decidió ratificar si los resultados obtenidos se reproducían *in vivo*. Para ello, primero se generaron tumores subcutáneos con células MFE-296 infectadas con sgRNA contra ARID1A o su vector control (ambas sin marcar con el gen reportero de la luciferasa) en ratones inmunodeficientes (NSG). Transcurridas 3 semanas y con los tumores subcutáneos ya bien establecidos, se inyectaron intravenosamente células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A marcadas con el gen reportero luciferasa (MFE-296 EV-LUC), en todos los grupos de ratones (figura 88 A). Después de 3 semanas post inyección intravenosa, los resultados revelaron que los ratones que poseían tumores subcutáneos con células MFE-296 sgRNA ARID1A-3, presentaban un mayor número de focos metastáticos en pulmón de células MFE-296 EV positivas para luciferasa, en comparación con aquellos ratones que poseían tumores subcutáneos constituidos por las células control (Figura 88 B-D). Estos resultados indicaban que las células MFE-296 EV-LUC inyectadas en los ratones con tumores subcutáneos de células MFE-296 sgRNA ARID1A-3, habían adquirido mayores capacidades de diseminación en comparación con las células MFE-296 EV-LUC inyectadas en los ratones con tumores subcutáneos de células MFE-296 EV.



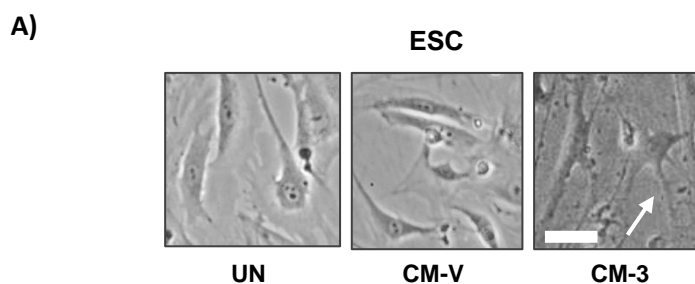
**Figura 88. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la diseminación y colonización metastásica en pulmón *in vivo*.** A) Esquema representativo del diseño experimental. Brevemente, las células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (n=10) o sus células control (lentiCRISPRv2) (n=10) fueron inyectadas subcutáneamente y se dejaron crecer durante 3 semanas. Transcurridos este tiempo ya establecidos los tumores subcutáneos,  $50 \times 10^4$  células EGFP-luciferasa MFE-296 EV fueron inyectadas intravenosamente y se dejaron crecer durante 3 semanas (ir a materiales y métodos para mayor detalle). B) Imágenes representativas de la señal de bioluminiscencia e imágenes representativas macroscópicas de los pulmones de los ratones de ambos grupos. C) Imágenes representativas microscópicas de las tinciones de Eosina Hematoxilina (EH) comparando las metástasis generadas en los pulmones de los ratones de ambos grupos. Barra de escala =100  $\mu$ m. D) Gráfico representativo mostrando el número de ratones con focos metastáticos presentes en los grupos de animales indicados. \*  $P \leq 0,05$ . EV, vector vacío.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que las células de CE con alteraciones en ARID1A son capaces de inducir señales pro-tumorogénicas, que promueven las capacidades migratorias, invasivas y de diseminación de las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.

### 2.1. Análisis del efecto de las células tumorales de endometrio con expresiones alteradas de ARID1A en la activación de células estromales endometriales circundantes y la modulación de sus funciones pro-tumorogénicas.

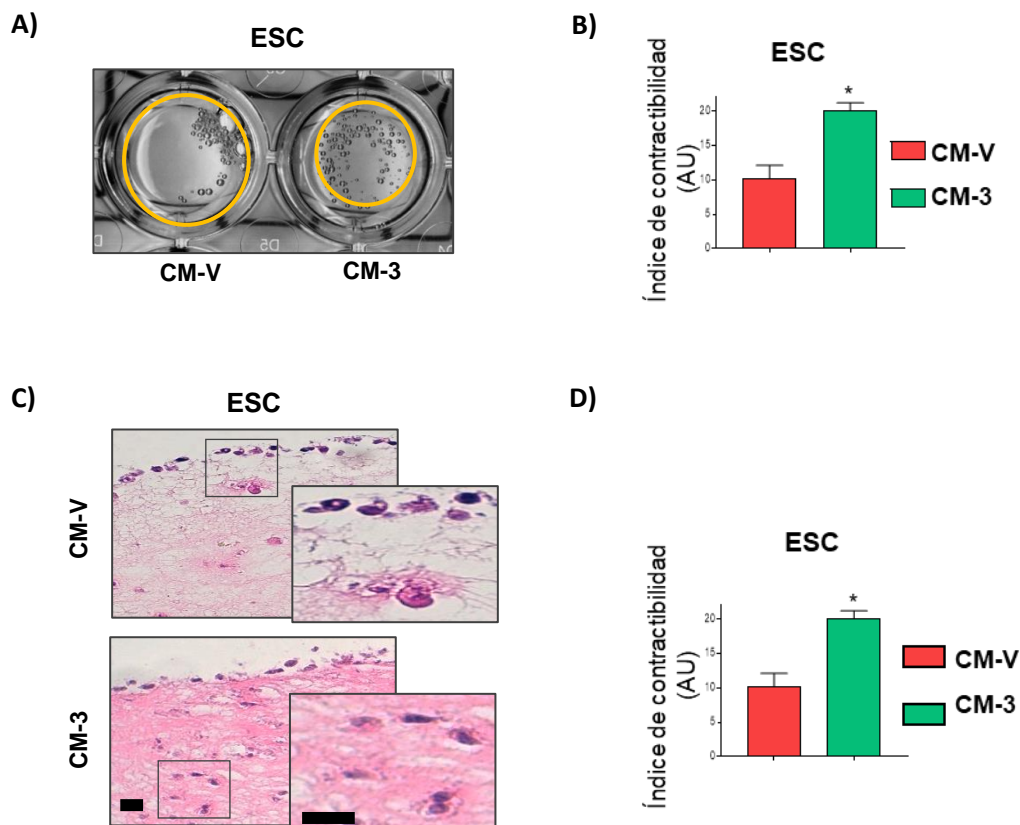
El microambiente tumoral es una entidad compleja y en continua evolución, donde los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son el principal tipo de célula estromal y uno de los componentes más activos en algunos tipos tumorales<sup>65,70,148</sup>. Por ello, y debido a que está demostrado que algunas señales de las células tumorales son capaces de regular las funciones estromales<sup>149</sup>, se decidió investigar si las señales pro-tumorales inducidas por las células de CE con alteraciones en la expresión de ARID1A podían también liderar la activación y función de las células estromales endometriales.

Para ello, se aislaron células estromales endometriales (ESC) de ratones con fenotipos salvajes y se estimularon con los CM recolectados de las células IK sgRNA ARID1A-3 (CM-3) o de sus células parenterales (CM-V). Interesantemente, se apreció que tras los tratamientos con CM-3 las ESC adquirían morfologías más elongadas, características de los fenotipos CAF<sup>72</sup>, en comparación con aquellas que habían sido tratadas con CM-V (Figura 89).



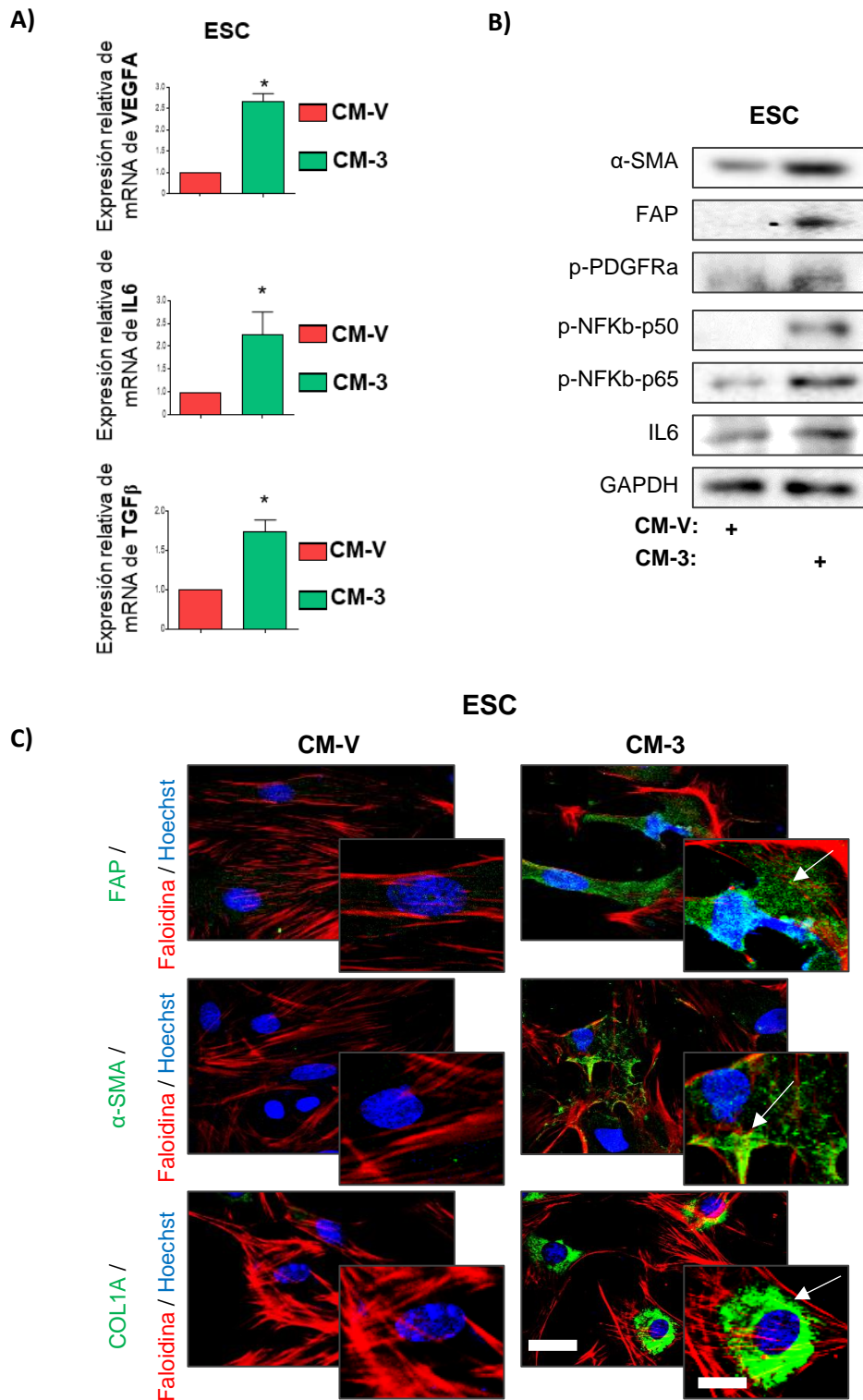
**Figura 89. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen cambios morfológicos en las ESC.** A) Imágenes representativas de contraste de fases de las ESC previamente tratadas o no con CM recolectado de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3) o del vector vacío (CM-V). Barra de escala =10  $\mu$ m.

Una vez establecidos estos cultivos estromales tratados con CM-V o CM-3, lo primero que se evaluó fue la característica habilidad que presentan los CAFs de remodelación de las matrices<sup>150</sup>, mediante ensayos de contractilidad de geles de colágeno. Los resultados mostraron que aquellas ESC que habían estado en contacto con CM-3 poseían mayores capacidades para contraer los geles de colágeno, en comparación con las que habían sido tratadas con CM-V (figura 90 A-B). En concordancia con los resultados obtenidos, co-cultivos organotípicos revelaron que las matrices generadas por las ESC tratadas previamente con CM-3 eran más permisivas para la invasión de las células tumorales que aquellas que habían sido generadas por ESC previamente tratadas con CM-V, mostrando mayores índices de invasión por parte de las células IK con expresión salvaje de ARID1A (figura 90 C-D).



**Figura 90. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la activación de las ESC.** A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por ESC previamente tratadas durante 48h con CM recolectado de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) (CM-3) o del vector vacío (CM-V) y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas de cultivos organotípicos mostrando la invasión de las células IK EV en matrices previamente remodeladas por ESC pretratadas durante 48h con CM3 o CMV y D) cuantificación del índice de invasión. Barra de escala =100  $\mu$ m. \* P $\leq$ 0,05. EV, vector vacío.

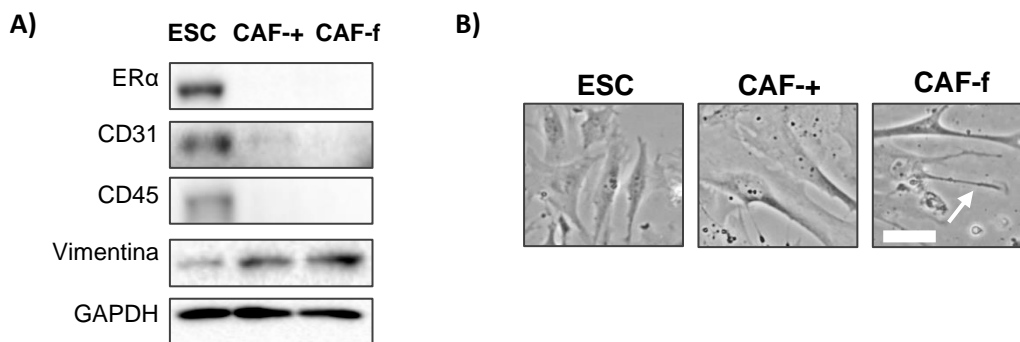
Posteriormente, se decidió analizar el estado de expresión de algunos marcadores relacionados con la activación de las células estromales y el fenotipo de los CAFs<sup>72</sup>. Los resultados del análisis de qRT-PCR revelaron que las ESC pretratadas con CM-3, expresaban de manera significativa mayores niveles de mRNA de VEGF, IL6 y TFG- $\beta$ , factores de secreción típicos del fenotipo CAF, en comparación con los tratados con CM-V (figura 91 A). Además, los ensayos de western blot revelaron que las ESC que habían sido tratadas con CM-3 expresaban mayores niveles de expresión de algunos marcadores típicos de activación estromal y fenotipos CAF, tales como  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$  $\beta$ -p50 (Ser337), p- NF $\kappa$  $\beta$ -p65 (Ser536) e IL6, en comparación con las que habían sido tratadas con CM-V (Figura 91 B). Finalmente, se corroboraron estos resultados mediante la realización de ensayos de inmunofluorescencia contra los marcadores de activación estromal típicos de los fenotipos CAF:  $\alpha$ -SMA, FAP y COL-1 (Figura 91 C).



**Figura 91. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC.** ESC fueron tratadas durante 48h con CM recolectado de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2 *ARID1A*-3) (CM-3) o del vector vacío (CM-V). A) Histograma representativo de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de VEGFA, IL6 y TGFβ1. B) Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p-NFκβ-p65 (Ser536) e IL6. La GAPDH fue usada como control de carga. C) Imágenes representativas de la

inmunofluorescencia de los marcadores de activación estromal FAP,  $\alpha$ -SMA y COL1A. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25 $\mu$ m. \* P $\leq$ 0,05. EV, vector vacío.

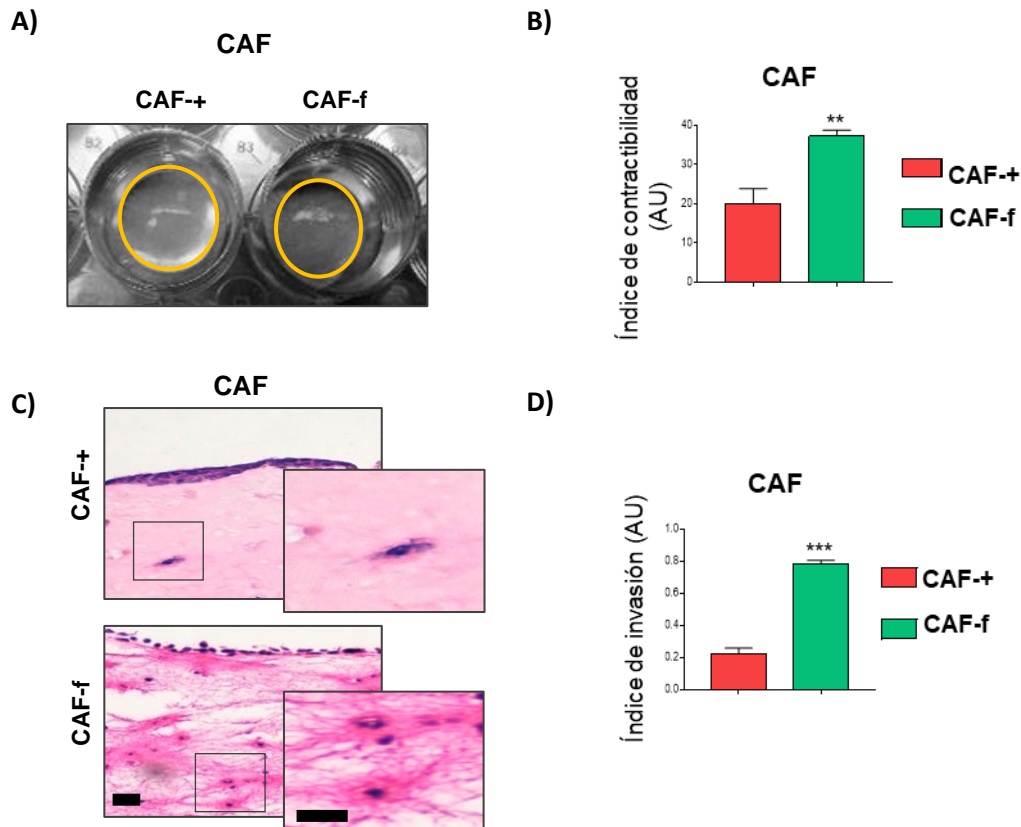
Dado los resultados obtenidos, se decidió estudiar que sucedía *in vivo* con la activación de las células endometriales estromales en los tumores deficientes para ARID1A. Para ello, se aislaron células endometriales estromales, de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+) o de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) con adenocarcinomas endometriales. Lo primero, se corroboró por selección negativa que estas células eran CAFs, observándose que tanto las células CAF-f como las CAF-+ perdían la expresión del marcador epitelial ER $\alpha$ , la del marcador endotelial CD31 y la del marcador de células inmunes CD45 (figura 92 A). Además, los resultados del ensayo de western blot también revelaron un incremento del marcador de fibroblastos vimentina en los CAFs, en comparación con las ESC salvajes (figura 92 A). Asimismo, al analizar la morfología de estas células por contraste de fases, se observó que tanto los CAF-+ como los CAF-f poseían una morfología elongada en comparación con las células estromales salvajes, aunque se apreció que ésta era aún más pronunciada en los CAF-f (figura 92 B).



**Figura 92. Corroboración del aislamiento de CAFs de los adenocarcinomas endometriales del modelo murino *Cre:ER*; *Pten<sup>ff</sup>*; *Arid1a<sup>ff</sup>*.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de ER $\alpha$ , CD31 y CD45 en ESC salvajes, y CAFs aislados de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+) o de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) con adenocarcinomas endometriales. La GAPDH fue usada como control de carga. B) Imágenes representativas de contraste de fases de ESC salvajes, CAF-+ y CAF-f. Barra de escala =10  $\mu$ m.

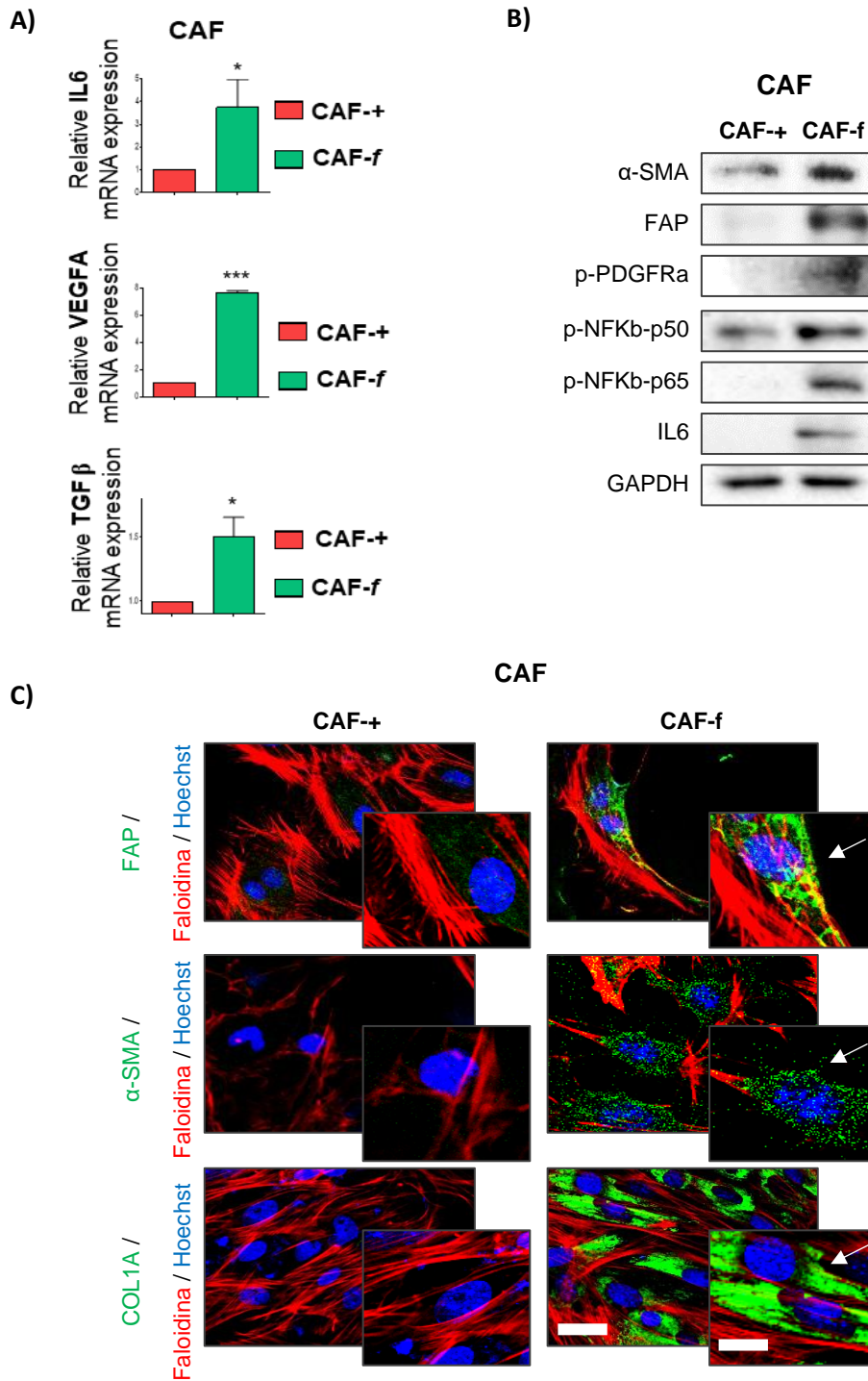
Al evaluar la capacidad de remodelación de matrices de estas células estromales, los ensayos de contractilidad de colágeno revelaron que los CAF-f poseían una mayor capacidad de contraer los geles de colágeno, en comparación con los CAF-+ (figura 93 A-B). De manera similar, los ensayos de co-cultivos organotípicos corroboraron que las matrices generadas por los CAF-f poseían una mayor permisividad para la invasión de las células tumorales, en comparación a las que habían sido remodeladas por los CAF-+, observándose en ellas mayores índices de invasión por parte de las células IK con expresión salvaje de ARID1A (figura 93 C-D).





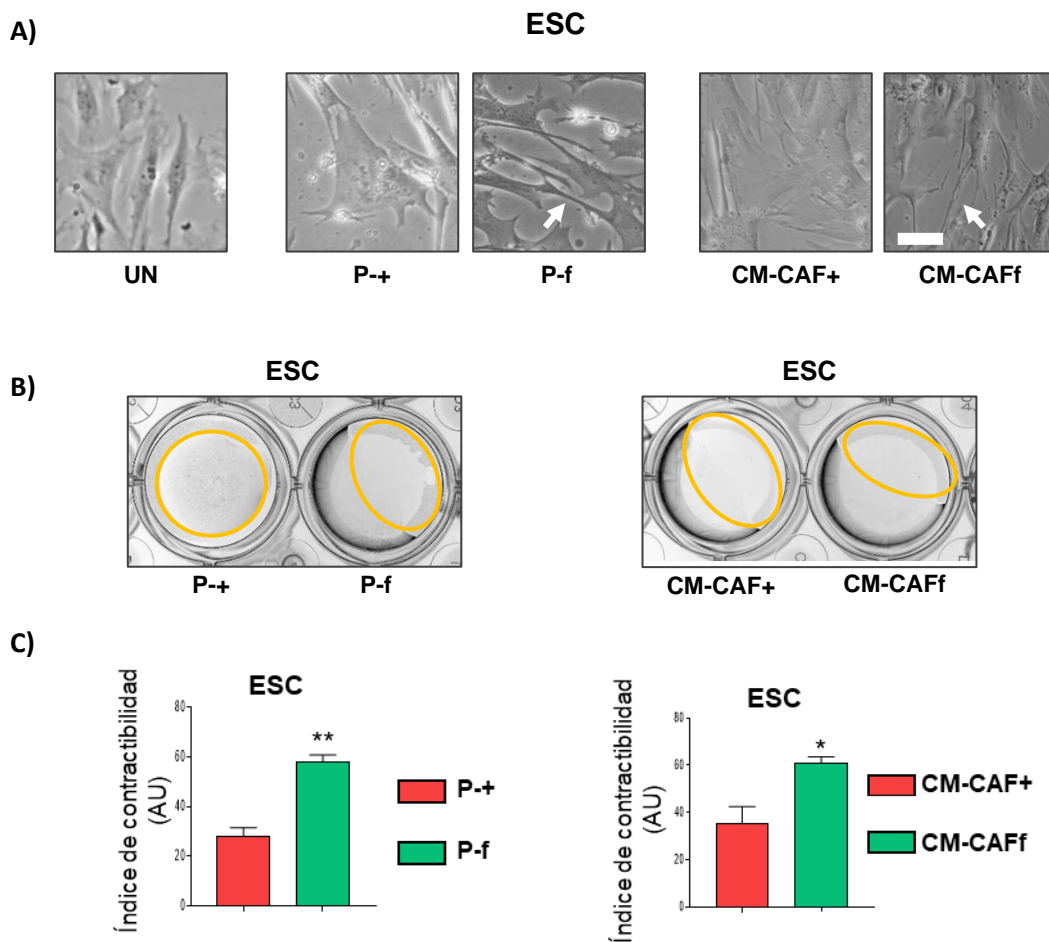
**Figura 93. Los CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, presentan mayor actividad CAF respecto a los de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*. A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por CAF aislados de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF+) o de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) con adenocarcinomas endometriales y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas de cultivos organotípicos mostrando la invasión de las células IK EV en matrices previamente remodeladas por los CAF+ o CAF-f y D) cuantificación del índice de invasión. Barra de escala =100  $\mu$ m. \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .**

Para corroborar los resultados obtenidos, se decidió evaluar, de igual manera que en la figura 91, los niveles de expresión de varios marcadores asociados a la activación estromal. En primer lugar, se evaluó por RT-qPCR los niveles de expresión de mRNA de los factores de secreción VEGF, IL6 y TFG- $\beta$ . Los resultados revelaron que estos marcadores se encontraban significativamente incrementados en los CAF-f, en comparación con los CAF+ (Figura 94 A). Además, cuando se analizaron por ensayos de western blot los niveles de expresión de proteína de marcadores asociados a los fenotipos CAF, tales como  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p-NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) o IL6, se pudo apreciar que los CAF-f expresaban mayores niveles de todos estos marcadores en comparación con los CAF+ (figura 94 B). Por último, los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia contra  $\alpha$ -SMA, FAP y COL-1 corroboraron estos resultados, encontrándose una expresión mayor en los CAF-f respecto a los CAF+ (figura 94 C).



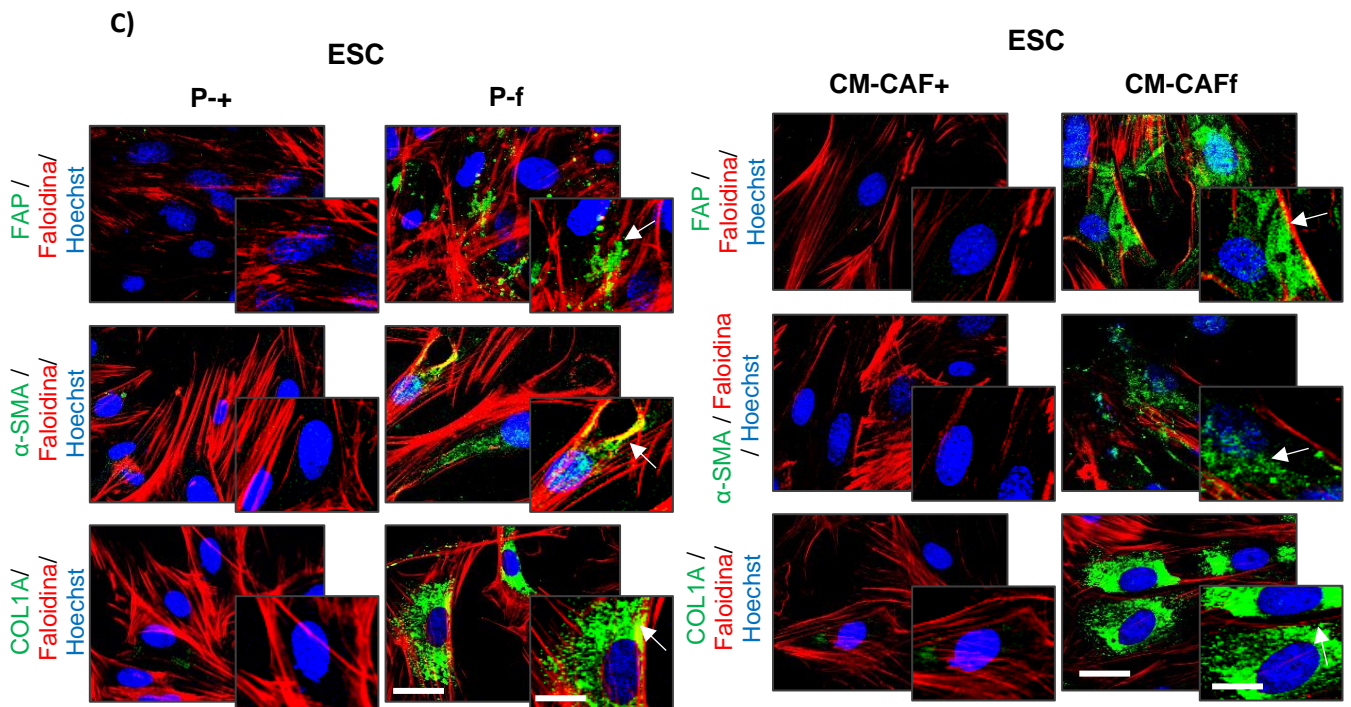
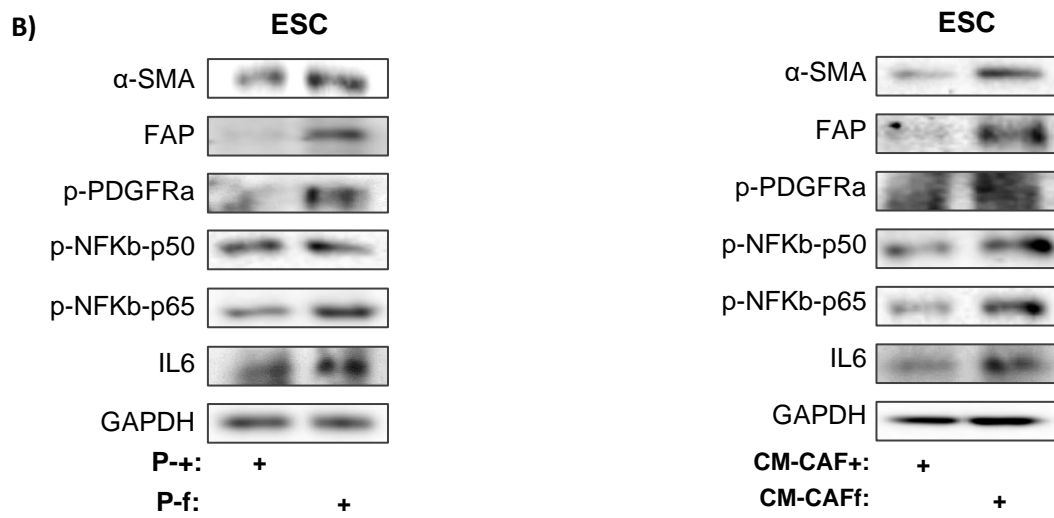
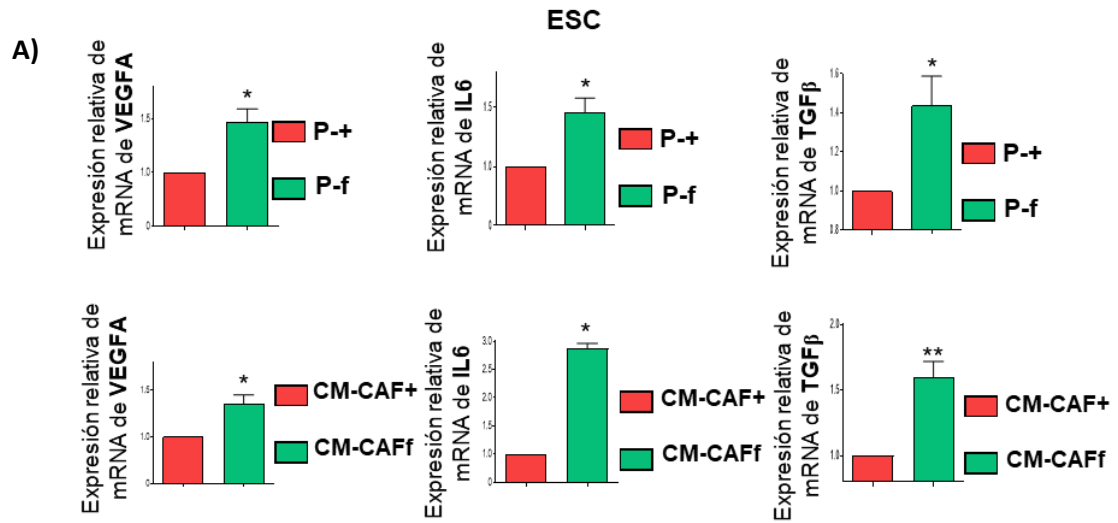
**Figura 94.** Los CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, presentan mayores marcadores de fenotipos CAF respecto a los de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*. CAF fueron aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF+). A) Histograma representativo de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de VEGFA, IL6 y TGFβ1. B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p-NFκβ-p65 (Ser536) e IL6. La GAPDH fue usada como control de carga. C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los marcadores de activación estromal FAP, α-SMA y COL1A. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25μm. \* P≤0,05; \*\*\*P≤0,001.

Además, avalando los resultados mostrados, se apreció que la inducción de activación estromal se reproducían del mismo modo en las ESC cuando éstas eran tratadas tanto con el plasma de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>ff/f</sup>* con adenocarcinomas endometriales, como con CM recolectados de los CAF aislados de los adenocarcinomas endometriales de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>ff/f</sup>*. Cuando se analizó por contraste de fases la morfología de las ESC tratadas con los plasmas o los CM recolectados de los CAFs, las ESC que habían sido tratadas con el P-f o con los CM de los CAF-f (CM-CAff) adquirían morfologías más elongadas y poseían una mayor capacidad de contraer los geles de colágeno, en comparación con las que habían sido tratadas con P-+ o con los CM de los CAF-+ (CM-CAF+), respectivamente (figura 95).



**Figura 95. El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>ff/f</sup>* con CE inducen mayor activación de las ESC.** ESC fueron tratadas durante 48h con plasma aislado de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>ff/f</sup>* (P-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P-+) con adenocarcinomas de endometrio, o con CM recolectado de CAFs previamente aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>ff/f</sup>* (CM-CAff) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CM-CAF+). A) Imágenes representativas de contraste de fases en las condiciones indicadas. Barra de escala =10  $\mu$ m. B) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por ESC previamente sometidas a los tratamientos indicados y C) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

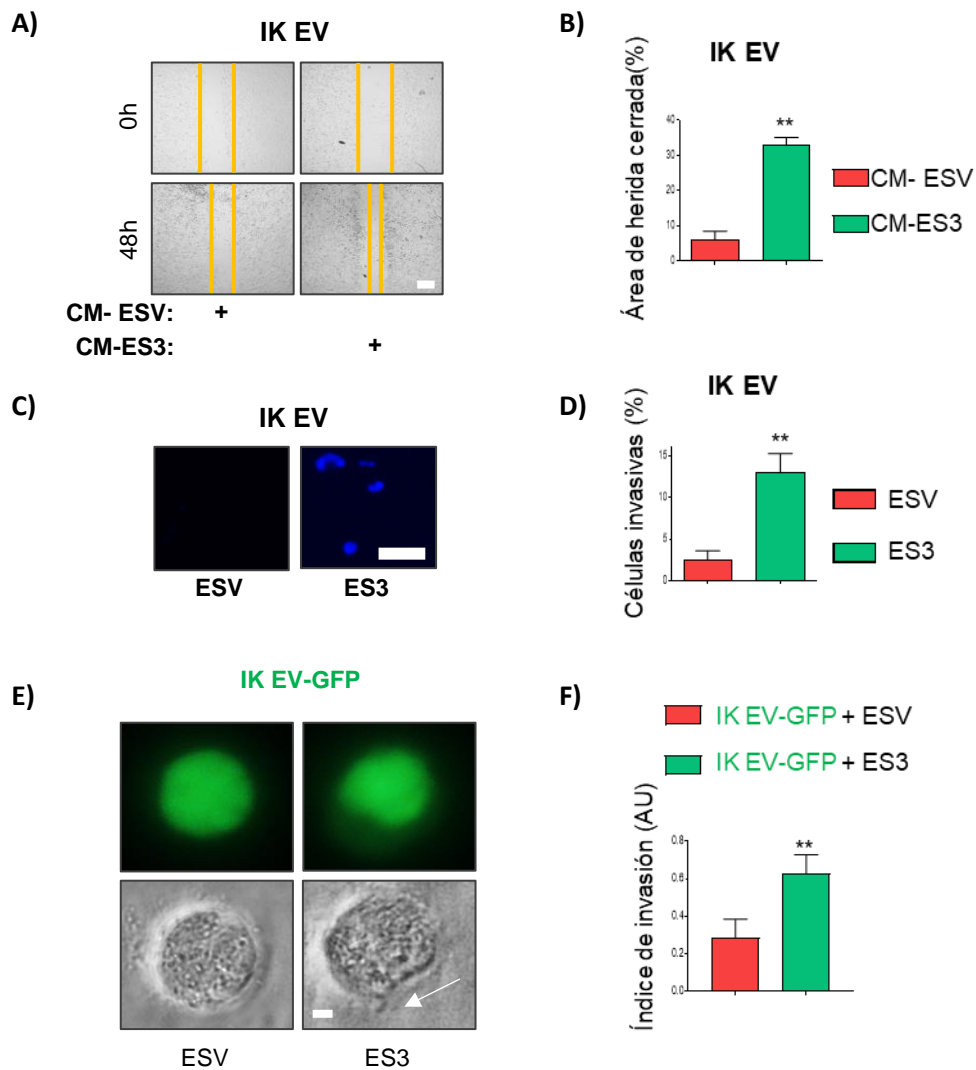
De nuevo, con tal de corroborar estos resultados, se analizaron los niveles de marcadores de activación estromal. Como era de esperar, el análisis por RT-qPCR desveló un incremento en los niveles de expresión de mRNA de los factores de secreción VEGF, IL6 y TFG- $\beta$ , tanto en las ESC tratadas con P-f como en las tratadas con CM-CAFF, en comparación con los que habían sido tratados con P-f o con CM-CAF+, respectivamente (Figura 96 A). De acuerdo con estos resultados, al analizar la expresión por ensayos de western blot de marcadores asociados a los fenotipos CAF, tales como  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p-NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) o IL6, se observó que estos también se hallaban incrementados en las ESC tratadas con P-f o con CM-CAFF en comparación con sus respectivos controles (Figura 96 B). Por último, los ensayos de inmunofluorescencia contra las proteínas  $\alpha$ -SMA, FAP y COL-1 ratificaron estos resultados, encontrándose más elevadas en las ESC pretratadas con P-f o CM-CAFF respecto a sus controles (Figura 96 C).



**Figura 96. El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* con CE inducen la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC.** ESC fueron tratadas durante 48h con plasma aislado de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (P-f) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P+) con adenocarcinomas de endometrio, o con CM recolectado de CAFs previamente aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (CM-CAff) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CM-CAF+). A) Histograma representativo de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de VEGFA, IL6 y TGFβ1, en las condiciones indicadas. B) Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p-NFκβ-p65 (Ser536) e IL6, en las condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los marcadores de activación estromal FAP, α-SMA y COL1A, en las condiciones indicadas. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25μm. \* P≤0,05; \*\*P≤0,01.

Los CAFs están implicados en potenciar muchas propiedades tumorales, pero en particular están bien descritos como potenciadores de la invasión y la metástasis de las células tumorales<sup>151,152</sup>. Por ello, se decidió analizar si estas ESC además de activarse también adquirirían mayores habilidades pro-tumorogénicas. Para ello se recolectó CM de ESC que habían sido previamente activadas mediante tratamientos con CM procedente de células IK infectadas con sgRNA contra ARID1A (CM-ES3) o con el vector vacío (CM-ESV) y se trataron células IK con expresión salvaje de ARID1A. Los ensayos de migración de wound healing mostraron que la incubación de las células IK con CM-ES3 resultaba en un incremento de sus capacidades migratorias, en comparación con las que habían sido incubadas con CM-ESV (figura 97 A-B). Además, al realizar ensayos de invasión de transwell de células IK EV, empleando como quimioatrayente las ESC previamente activadas con CM-3 (ES-3) o CM-V (ES-V), se observó que las células IK EV mostraban mayores ratios de invasión en presencia de las células estromales ES-3, en comparación con cuando lo estaban en presencia de las ES-V (figura 97 C-D). En el mismo sentido, cuando se realizaron co-cultivos 3D de células IK salvajes marcadas con GFP, con células estromales ES-3 o ES-V sin marcar, se observó que las células tumorales que estaban creciendo en presencia de las células estromales ES-3, incrementaban más su capacidad de formación de filopodios e invasión del Matrigel, en comparación con aquellas células tumorales que lo hacían en presencia de células estromales ES-V (figura 97 E-F).

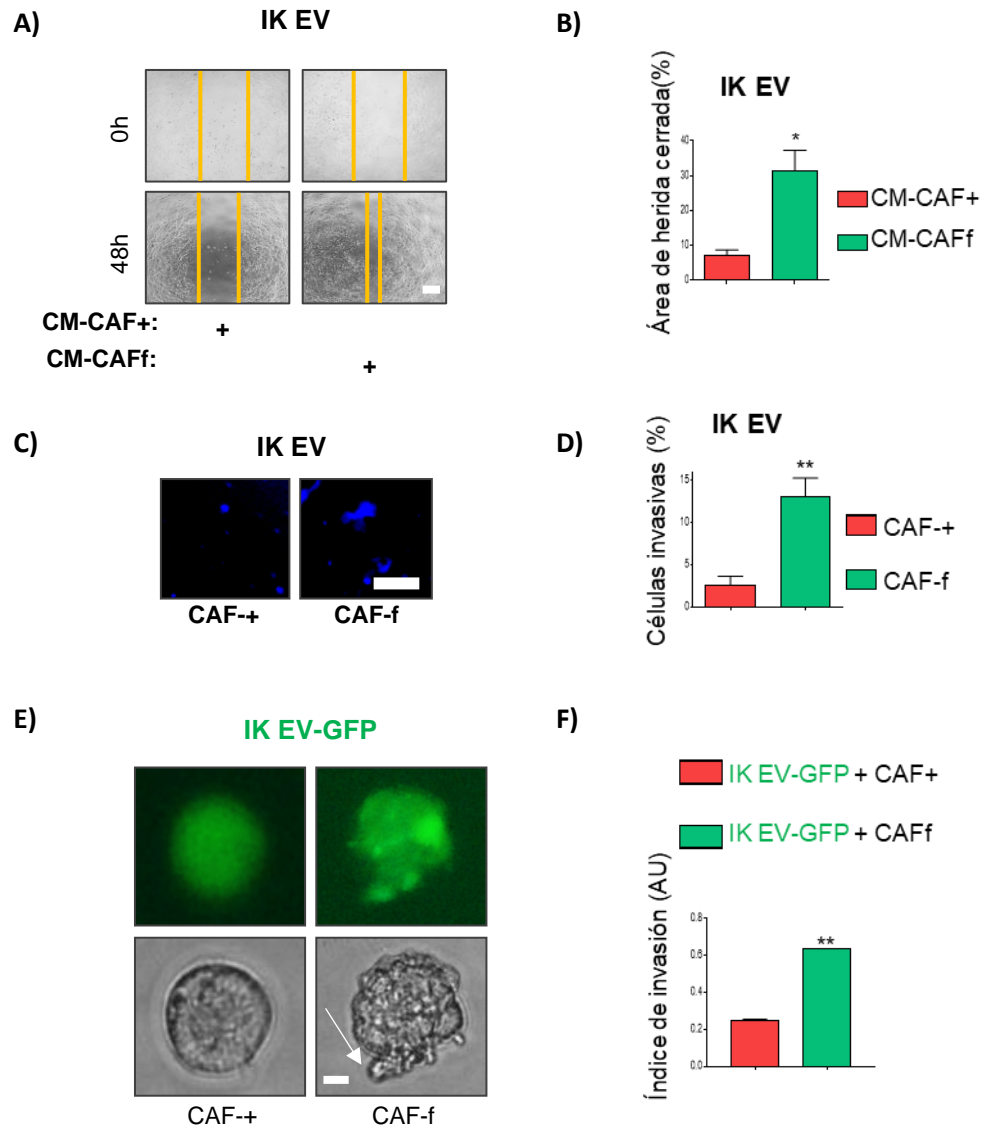




**Figura 97. Las ESC activadas por lo CM de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A poseen mayores habilidades pro-tumorigénicas.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK EV tratadas durante 48h con CM recolectados de ESC previamente activadas durante 48h con CM-3 (CM-ES3) o con CMV (CM-ESV) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK EV quimioatraídas por ESC previamente activadas durante 48h con CM-3 (ES3) o con CMV (ESV) y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25  $\mu$ m. E) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con ESC previamente activadas durante 48h con CM-3 (ES3) o con CMV (ESV) y B) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25  $\mu$ m. \*\*  $P \leq 0,01$ . AU, unidad arbitraria.

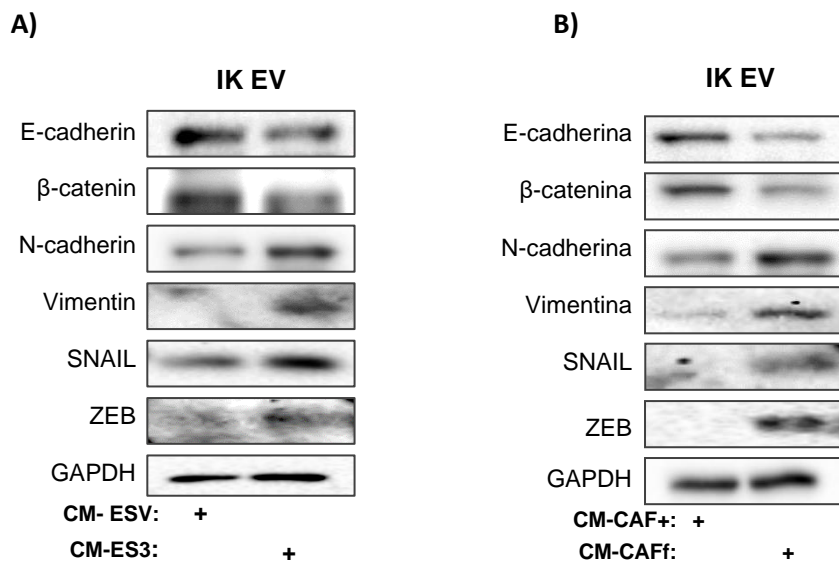


Después, se decidió analizar si los CAFs aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* también poseían mayores capacidades pro-tumorales que los que habían sido aislados de los CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*. Para ello, de igual manera que en los experimentos de la Fig. 97, se recolectaron CM de los CAF-f (CM-CAff) o de los CAF-+ (CM-CAF+) y se trataron células IK con expresión salvaje de ARID1A. Los ensayos de migración de wound healing denotaron un incremento en las capacidades migratorias de aquellas células que habían sido tratadas con los CM-CAff en comparación con las que lo habían sido con los CM-CAF+ (figura 98 A-B). Asimismo, cuando se analizaron las capacidades invasivas mediante ensayos de transwell, las células IK EV que tenían como quimioatrayente células CAF-f presentaban significativamente mayores niveles de invasión, respecto de aquellas que habían tenido como quimioatrayente células CAF-+ (Figura 98 C-D). Finalmente, ensayos de co-cultivos 3D de células IK EV marcadas con GFP con células CAF-f o CAF-+ sin marcar, mostraron que aquellas células tumorales que habían crecido co-cultivadas con los CAF-f tenían una mayor capacidad de formación de filopodios e invasión del Matrigel respecto a aquellas que habían crecido en co-cultivo con células CAF-+ (Figura 98 E-F)



**Figura 98. Los CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* poseen mayores habilidades pro-tumorigénicas.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK EV tratadas durante 48h con CM recolectado de CAFs previamente aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* (CM-CAFf) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CM-CAF+). y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK EV quimioatraídas por CAFs previamente aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* (CAFf) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF+). y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25  $\mu$ m. E) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con CAFf o CAF+ y F) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25  $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ . AU, unidad arbitraria.

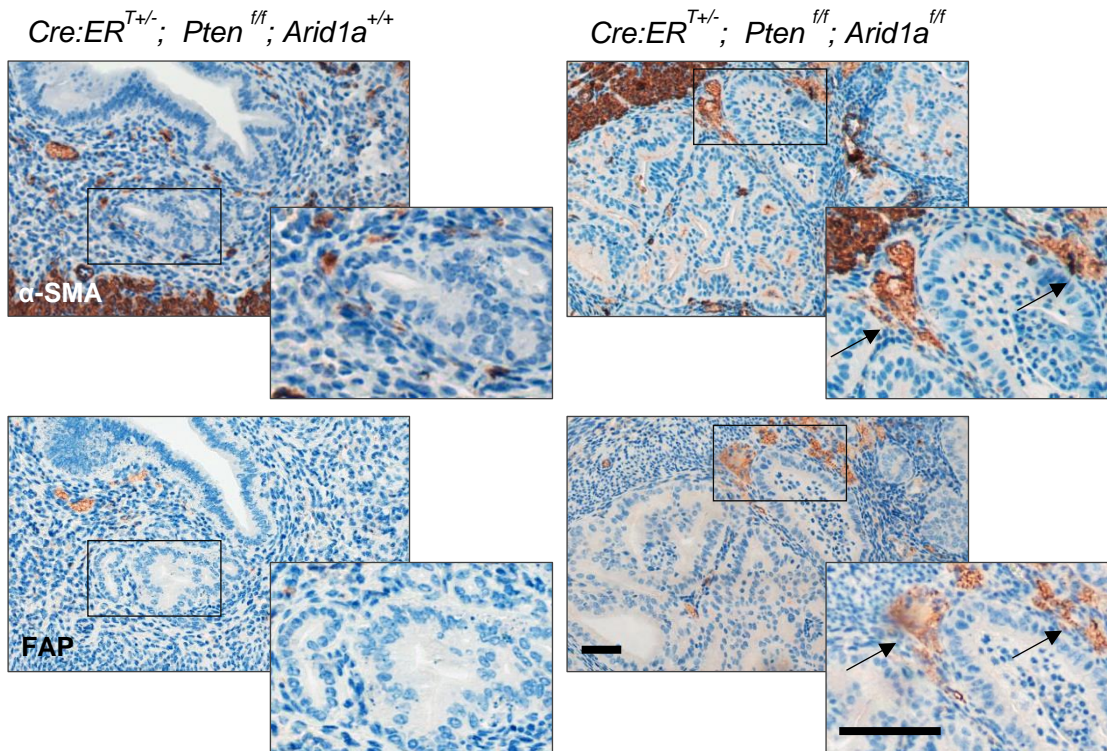
Finalmente, se corroboró que esta adquisición de capacidades migratorias e invasivas promovida por las células estromales activadas y los CAFs, también iba acompañada de un incremento de los marcadores de EMT tanto en las células IK EV que habían sido tratadas con CM procedentes de los ESC-3 como en las que lo habían sido con CM recolectados de los CAF-f. Los resultados demostraron que efectivamente, existía una disminución de expresión marcadores epiteliales tales como la E-cadherina y la  $\beta$ -catenina y un incremento de expresión de marcadores mesenquimales tales como N-cadherina o vimentina y de los factores de transcripción SNAIL y ZEB, en las células IK con expresión salvaje de ARID1A que habían sido tratadas con CM-ES3 o CM-CAff, en comparación con sus respectivos controles CM-ESV o CM-CAF+ (figura 99).



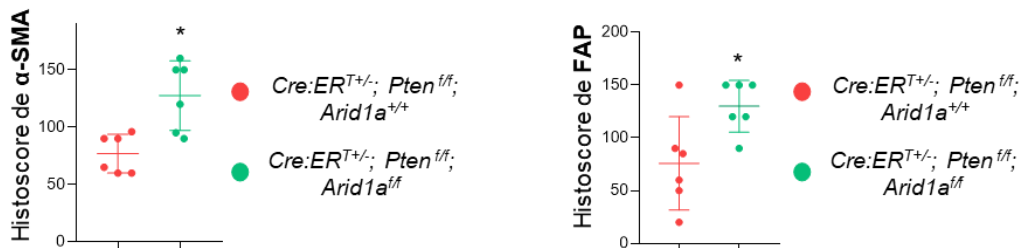
**Figura 99. Las ESC activadas por los CM de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A y los CAFs aislados de CE de los ratones  $Cre:ER^{T+/-}; Pten^{ff}; Arid1a^{ff}$  inducen fenotipos de EMT.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de E-cadherina,  $\beta$ -catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB en células IK EV tratadas durante 48h con CM recolectados de ESC previamente activadas durante 48h con CM-3 (CM-ES3) o con CMV (CM-ESV) o B) con CM recolectado de CAFs previamente aislados de CE de ratones  $Cre:ER^{T+/-}; Pten^{ff}; Arid1a^{ff}$  (CM-CAff) o  $Cre:ER^{T+/-}; Pten^{ff}; Arid1a^{+/+}$  (CM-CAF+). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Por último, para verificar si estos efectos sobre la activación estromal se replicaban *in vivo*, se decidió analizar mediante ensayos de inmunohistoquímica de secciones de adenocarcinomas endometriales de los ratones de la colonia  $Cre:ER^T; Pten^{ff}; Arid1a^{ff}$ , el estado de expresión de los marcadores de activación estromal  $\alpha$ -SMA y FAP. Los resultados mostraron un mayor incremento de la expresión de ambos marcadores en el estroma endometrial de los ratones  $Cre:ER^{T+/-}; Pten^{ff}; Arid1a^{ff}$ , en comparación con el de los ratones  $Cre:ER^{T+/-}; Pten^{ff}; Arid1a^{+/+}$  (Figura 100).

A)

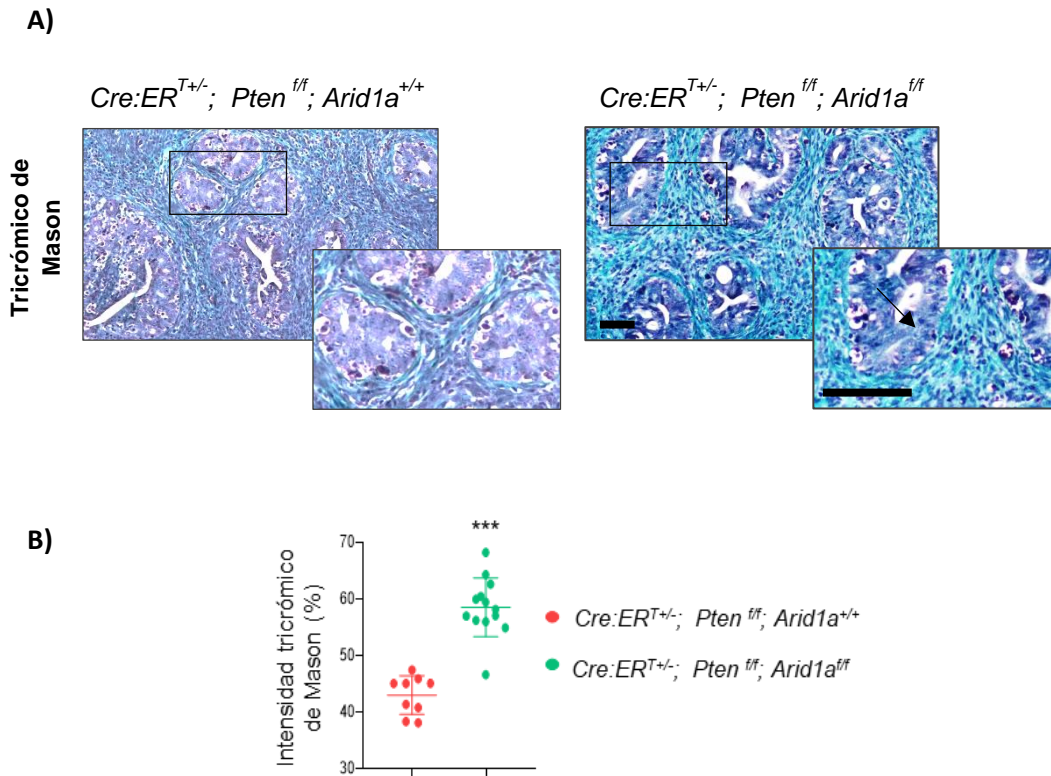


B)



**Figura 100. La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la expresión de marcadores de activación estromal. A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA y FAP en secciones consecutivas de úteros de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* con adenocarcinomas endometriales y B) cuantificación de los niveles de expresión. Barra de escala= 100 $\mu$ m.

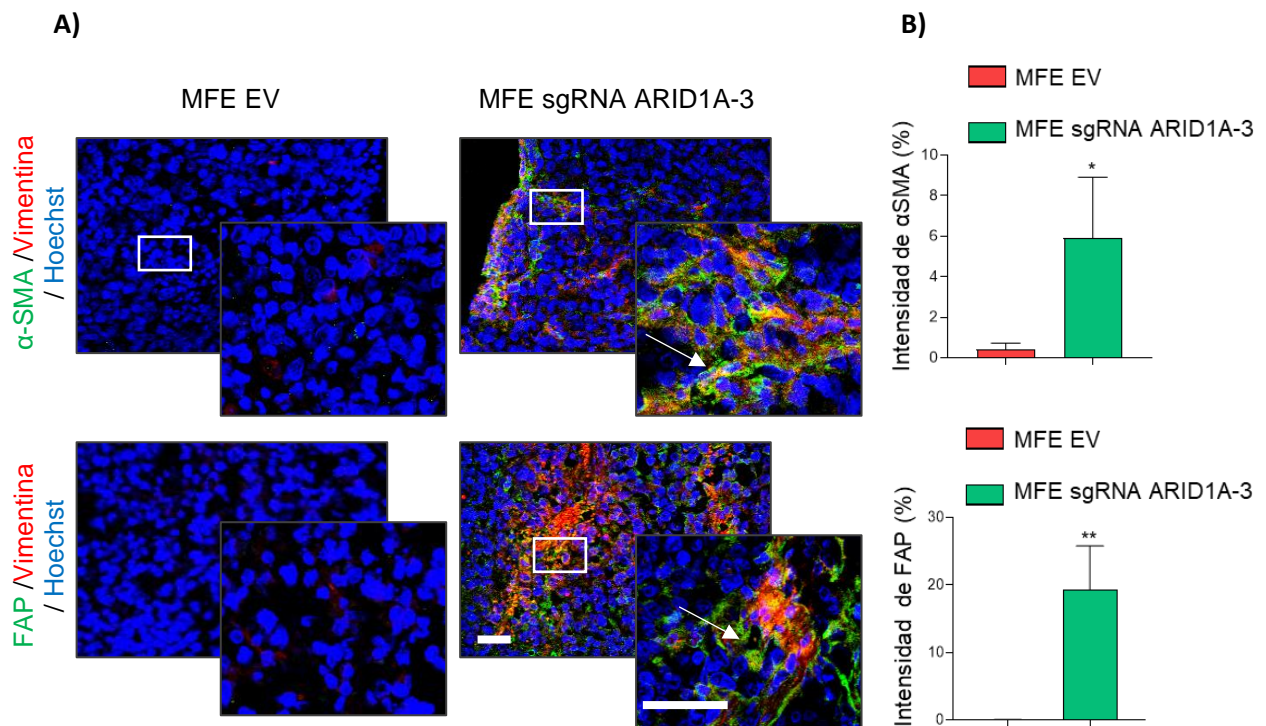
Además, y en concordancia con la observada activación estromal, la tinción de tricrómico de Mason denotó que los tumores endometriales de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* presentaban una mayor deposición de colágeno fibrilar tumoral que los tumores de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*, sugiriendo que estos poseían un estroma endometrial más reactivos (figura 101).



**Figura 101. La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la deposición de colágeno fibrilar tumoral.** A) Imágenes representativas de la tinción de tricrómico de Mason en secciones consecutivas de úteros de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* con adenocarcinomas endometriales y B) cuantificación de los niveles de expresión. Barra de escala= 100 $\mu$ m. \*\*\*  $P \le 0,001$ .

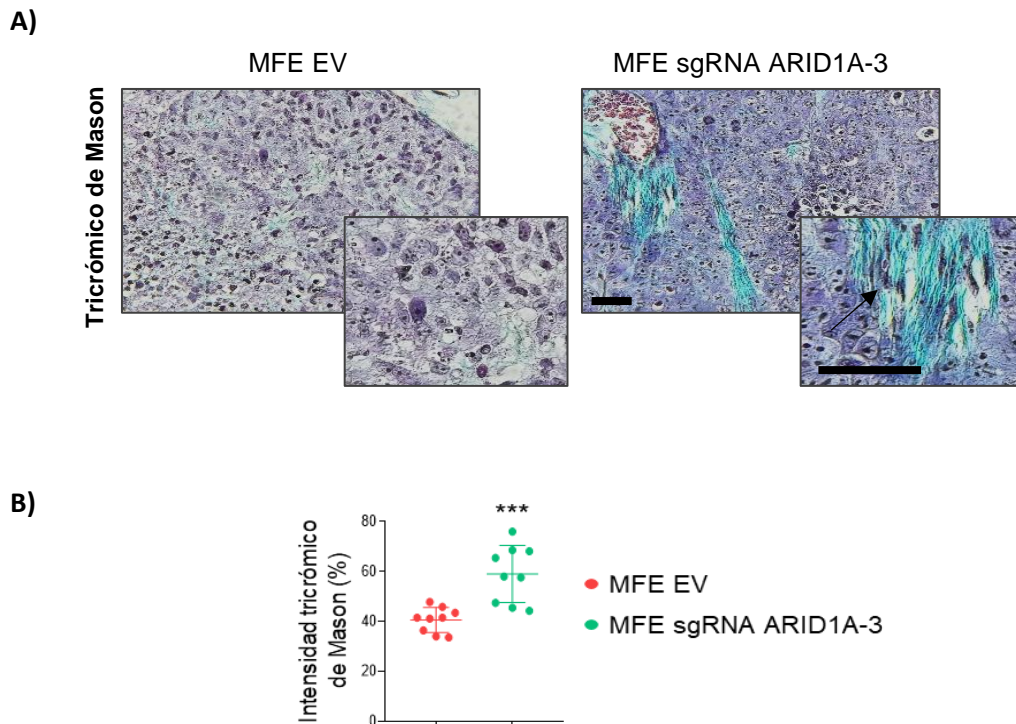
En consonancia con estos resultados, cuando se analizaron la expresión de  $\alpha$ -SMA y FAP mediante ensayos de inmunofluorescencia en los tumores xenógrafos subcutáneos de los ratones del experimento de la figura 87, se observó que aquellos tumores que estaban constituidos por células MFE-296 infectadas con sgRNA contra ARID1A, poseían mayor expresión de dichos marcadores de actividad estromal en comparación con aquellos que estaban compuestos por células MFE-296 infectadas con el EV, sugiriendo que estos tumores poseían una mayor capacidad para reclutar y activar células estromales (figura 102).





**Figura 102. Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de activación estromal en tumores subcutáneos *in vivo*.** A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra α-SMA y FAP en secciones consecutivas de tumores subcutáneos constituidos por células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 *ARID1A-3*) o del vector vacío y B) cuantificación de los niveles de expresión. La vimentina y el Hoechst fueron usadas como marcadores de fibroblastos y núcleo respectivamente. Barra de escala= 100μm. \*\*\* P≤0,001. EV, vector vacío.

Asimismo, cuando se analizó mediante la tinción tricrómica de Mason la deposición del colágeno fibrilar tumoral en estos tumores subcutáneos, se corroboró que el estroma de los tumores subcutáneos constituidos por células MFE-296 sgRNA *ARID1A-3* era significativamente más reactivo que el de los tumores subcutáneos con expresión salvaje de *ARID1A*, presentando una mayor deposición de colágeno fibrilar tumoral (figura 102).

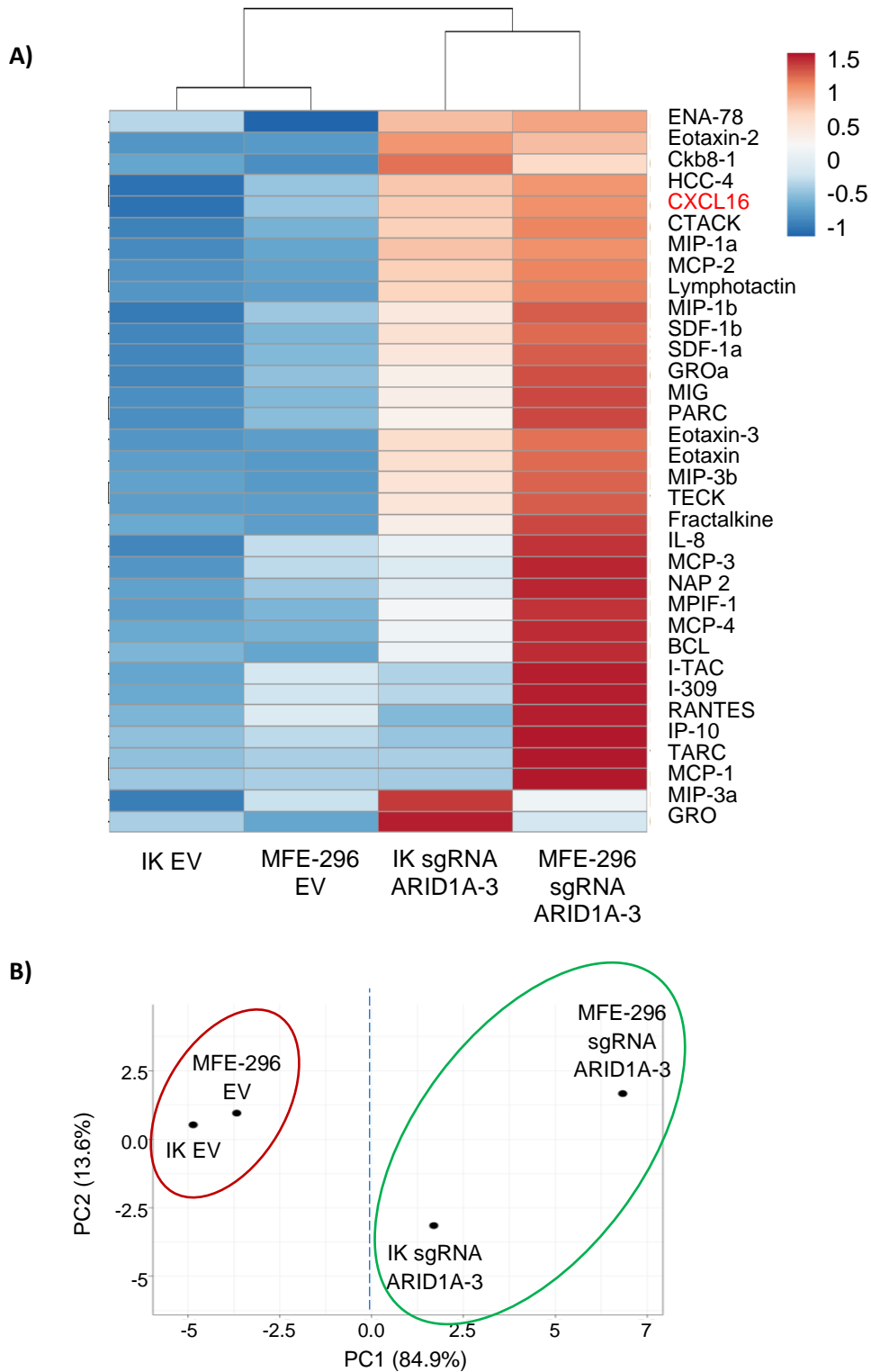


**Figura 103.** Las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la deposición de colágeno fibrilar tumoral en tumores subcutáneos *in vivo*. A) Imágenes representativas de tinción tricrómica de Mason en secciones consecutivas de tumores subcutáneos constituidos por células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) o del vector vacío. y B) cuantificación de los niveles de expresión. Barra de escala= 100µm. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

### 2.3. Análisis del secretoma de las células tumorales de endometrio con expresiones alteradas de ARID1A.

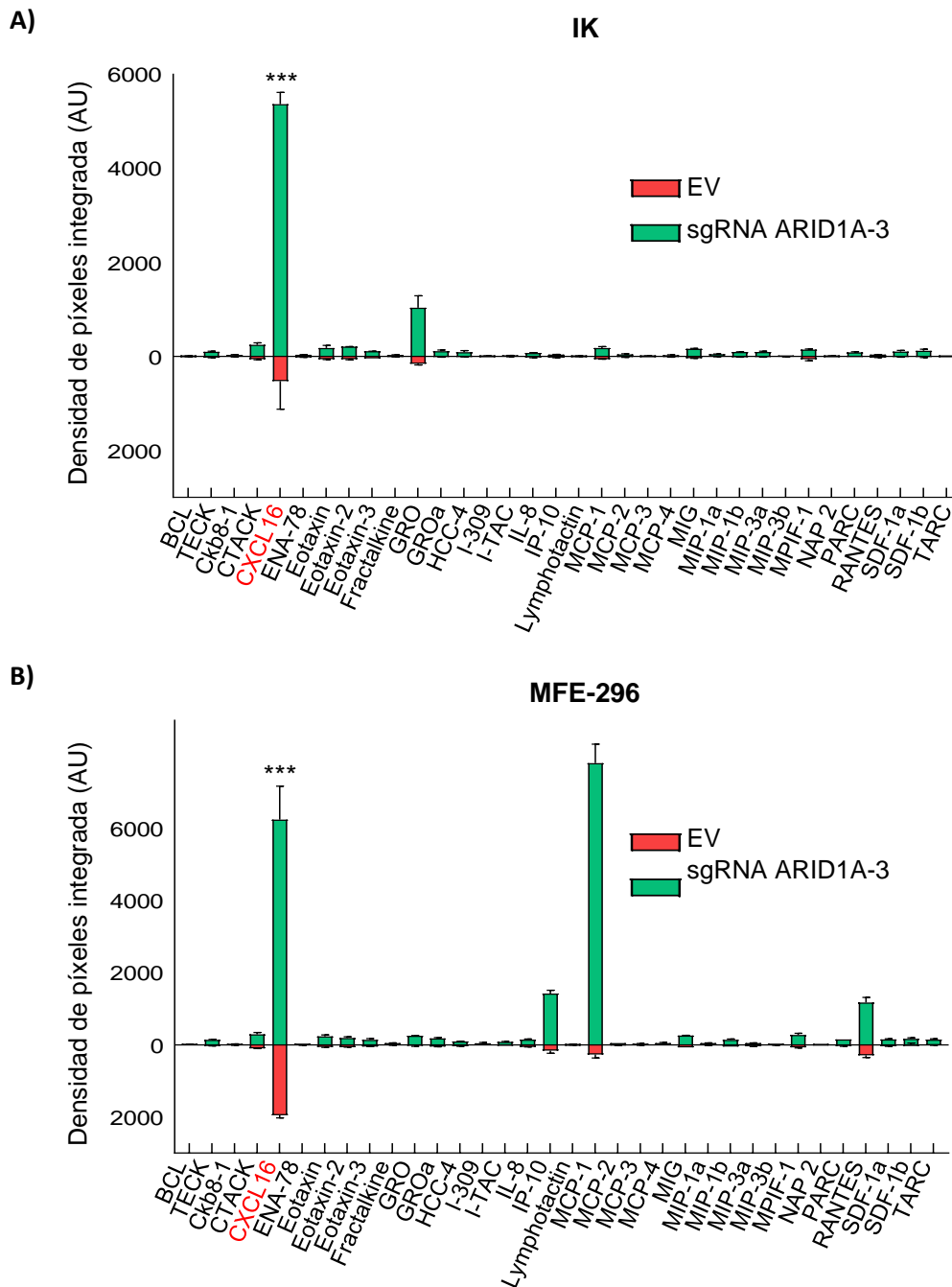
Los factores solubles secretados en el microambiente tumoral pueden fomentar la agresividad tumoral<sup>147</sup>. Dado los resultados obtenidos, se hipotetizó que los efectos pro-tumorógenicos observados en las células de CE con alteraciones de ARID1A, al menos inicialmente, podrían ser promovidos por señales paracrinias dirigidas por factores solubles secretados por estas células tumorales. Como las citoquinas poseen un papel fundamental facilitando la interacción entre las células tumorales y el microambiente tumoral, se decidió estudiar las posibles diferencias en el perfil de secreción entre las células de CEE IK y MFE-296 con expresión alterada o salvaje de ARID1A. Para ello se realizó un array de citoquinas, en el cual se analizó la abundancia de 38 quimioquinas solubles en los CM procedentes de células IK y MFE-296 infectadas con el sgRNA contra ARID1A o con el vector vacío. Los resultados del ensayo revelaron que el CM de las células de CEE con expresión regulada a la baja de ARID1A, mostraban niveles moderadamente más elevados de la mayoría de quimioquinas tumorales analizadas, en comparación con el CM de sus células control con expresión salvaje de ARID1A (figura 104 A). Además, el análisis de componentes principales (PCA) puso de manifiesto que estas células de CEE analizadas, se comprometían discretamente en programas de secreción de quimioquinas, en función de los niveles de expresión de ARID1A que poseían (figura 104 B).





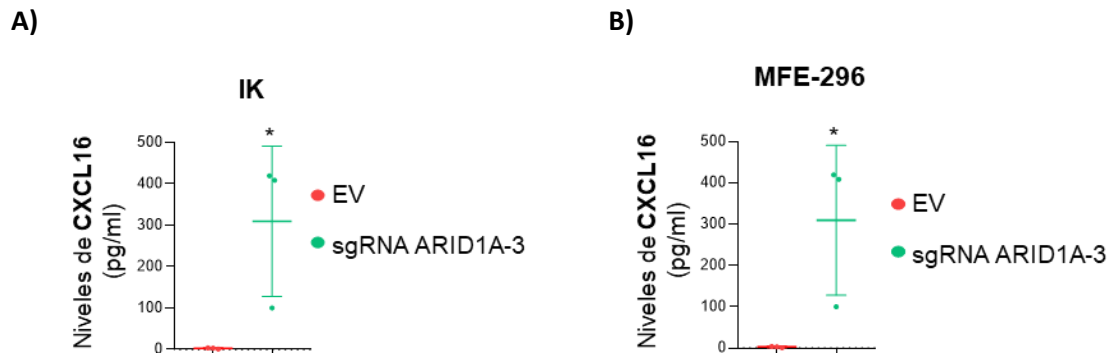
**Figura 104. La pérdida de expresión de ARID1A potencia la secreción de quimioquinas en las células de CEE.** A) Heatmap mostrando en agrupaciones jerárquicas los niveles normalizados del análisis del array de quimioquinas realizado con CM recolectado tras 48h de células IK o MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 *ARID1A-3*) o del vector vacío y B) y cambios en el perfil de secreción representados por un análisis de componentes principales (PCA). EV, vector vacío.

En particular, cuando se analizaron en detalle los niveles relativos de quimioquinas secretadas, se pudo apreciar que los niveles relativos de la quimioquina CXCL16 se encontraban destacadamente más elevados en los CM recolectados de las células que presentaban alteraciones en ARID1A en comparación con las que poseían expresiones salvajes de ARID1A, tanto en el caso de las IK (figura 105 A) como en el de las MFE-296 (figura 105 B).



**Figura 105. La pérdida de expresión de ARID1A potencia la secreción de la quimioquina CXCL16 en las células de CEE.** Gráficos representativos del análisis del array, mostrando los niveles relativos de las quimioquinas secretadas en los CM recolectados tras 48h de células A) IK y B) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 *ARID1A*-3) o del vector vacío. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

Además, con el fin de corroborar estos resultados, se realizó un ensayo Elisa contra CXCL16 en los CM recolectados de las células IK y MFE infectadas con el sgRNA contra ARID1A o con el EV. Como puede apreciarse en la figura 106, los resultados de dicho ensayo ratificaron que existía una mayor concentración de la quimioquina CXCL16 en los CM procedentes de las células que presentaban alteraciones en la expresión de ARID1A, en comparación a sus controles.

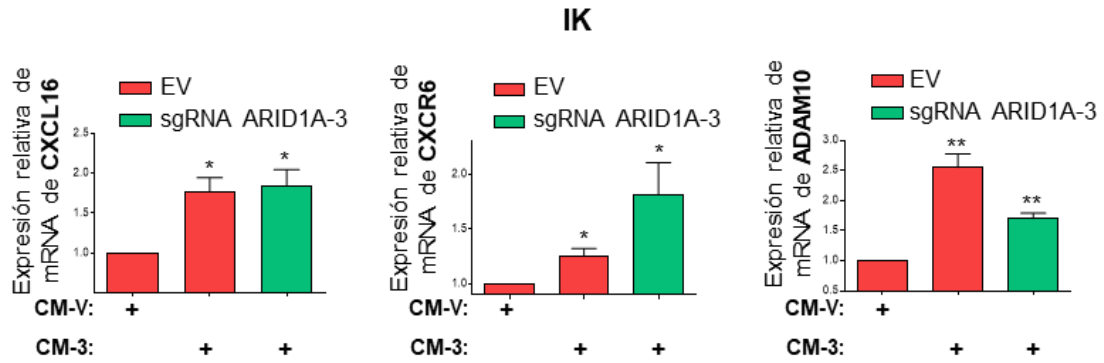


**Figura 106. Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A secretan mayores niveles de quimioquina CXCL16.** Gráficos representativos del ensayo Elisa contra CXCL16 realizado en CM recolectados tras 48h de células A) IK y B) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 *ARID1A-3*) o del vector vacío. \*  $P \leq 0,05$ . EV, vector vacío.

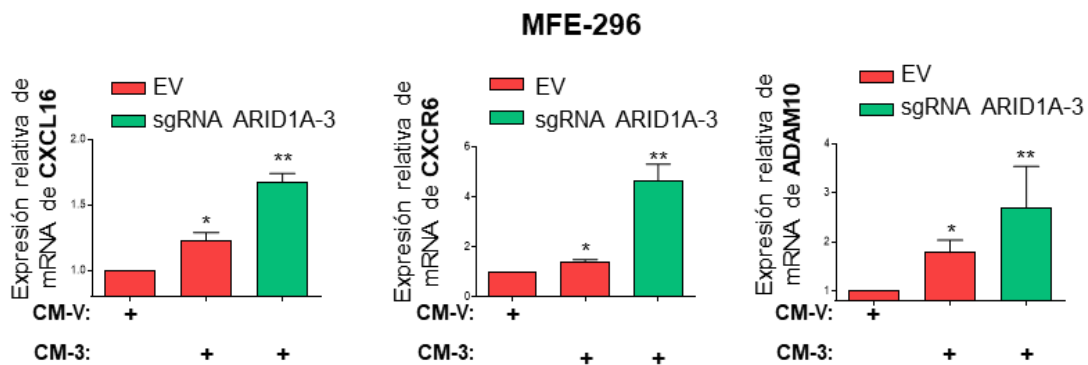
Dado los resultados obtenidos, se decidió validar por RT-qPCR que este incremento observado de quimioquina CXCL16 secretada en los CM de las células con expresión alterada de ARID1A, se encontraba correlacionado también con un incremento de los niveles de expresión de mRNA de CXCL16, así como de los del receptor modulador de CXCL16, CXCR6 y de la metaloproteasa ADAM10 (directamente relacionada con la activación de CXCL16) en las células tumorales<sup>113,114</sup>. Como puede apreciarse en la figura 106, efectivamente, las células IK y MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A previamente tratadas con CM-3 tenían niveles significativamente mayores de CXCL16, CXCR6 y ADAM10, respecto a las células que habían sido tratadas con CM-V.

Además, se observó que este incremento de los niveles de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 también era significativamente superior en las células IK o MFE-296 infectadas con el sgRNA ARID1A-3, en comparación con sus controles infectados con el EV (figura 107).

A)

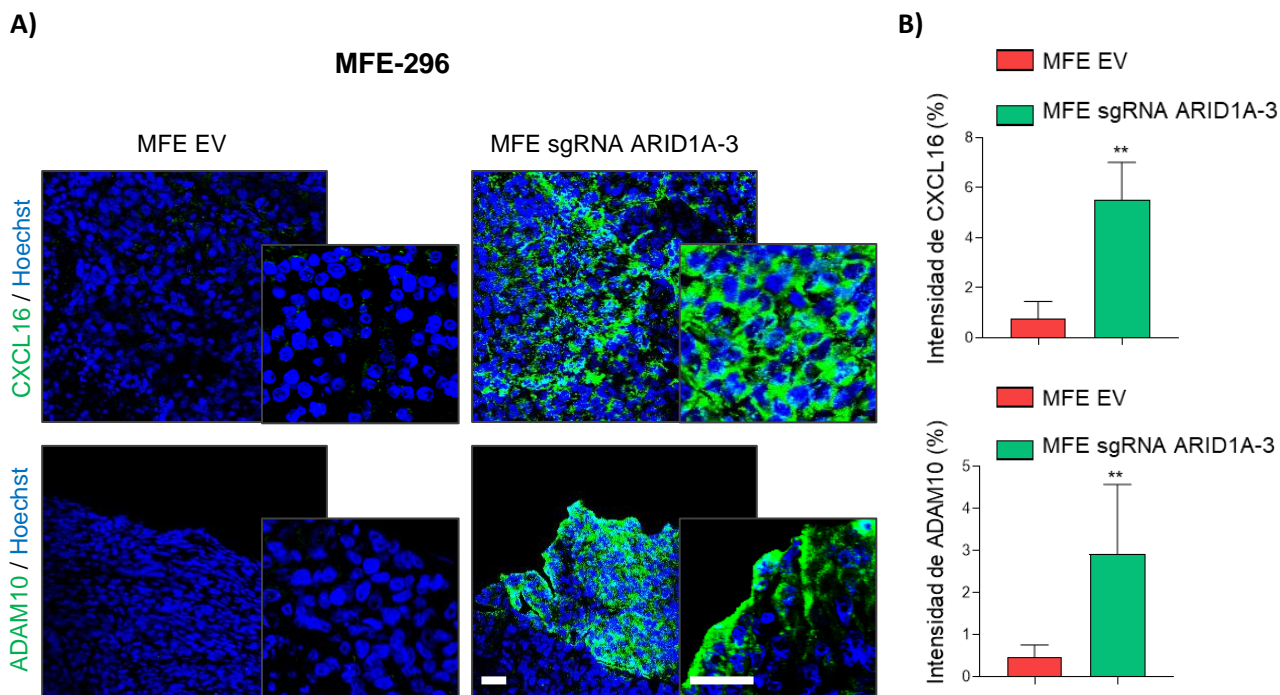


B)



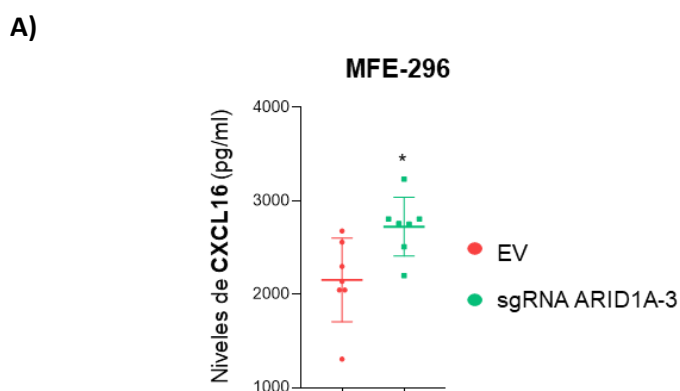
**Figura 107.** Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan niveles elevados de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 además de promover la expresión de éstos en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. Histogramas representativos de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 de células A) IK y B) MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) o del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK y MFE-296 infectadas con el EV (CM-V) o con sgRNA ARID1A-3 (CM-3). \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ . EV, vector vacío.

Con el fin de corroborar que estos resultados también se reproducían *in vivo*, se analizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia los niveles de expresión CXCL16 y ADAM10 en los tumores xenógrafos subcutáneos de los ratones del experimento de la figura 88. Los resultados mostraron que aquellos tumores que estaban compuestos por células MFE-296 infectadas con el sgRNA ARID1A-3 poseían una mayor expresión tanto de CXCL16 como de ADAM10 respecto a aquellos tumores que estaban compuestos por las células control (figura 108).



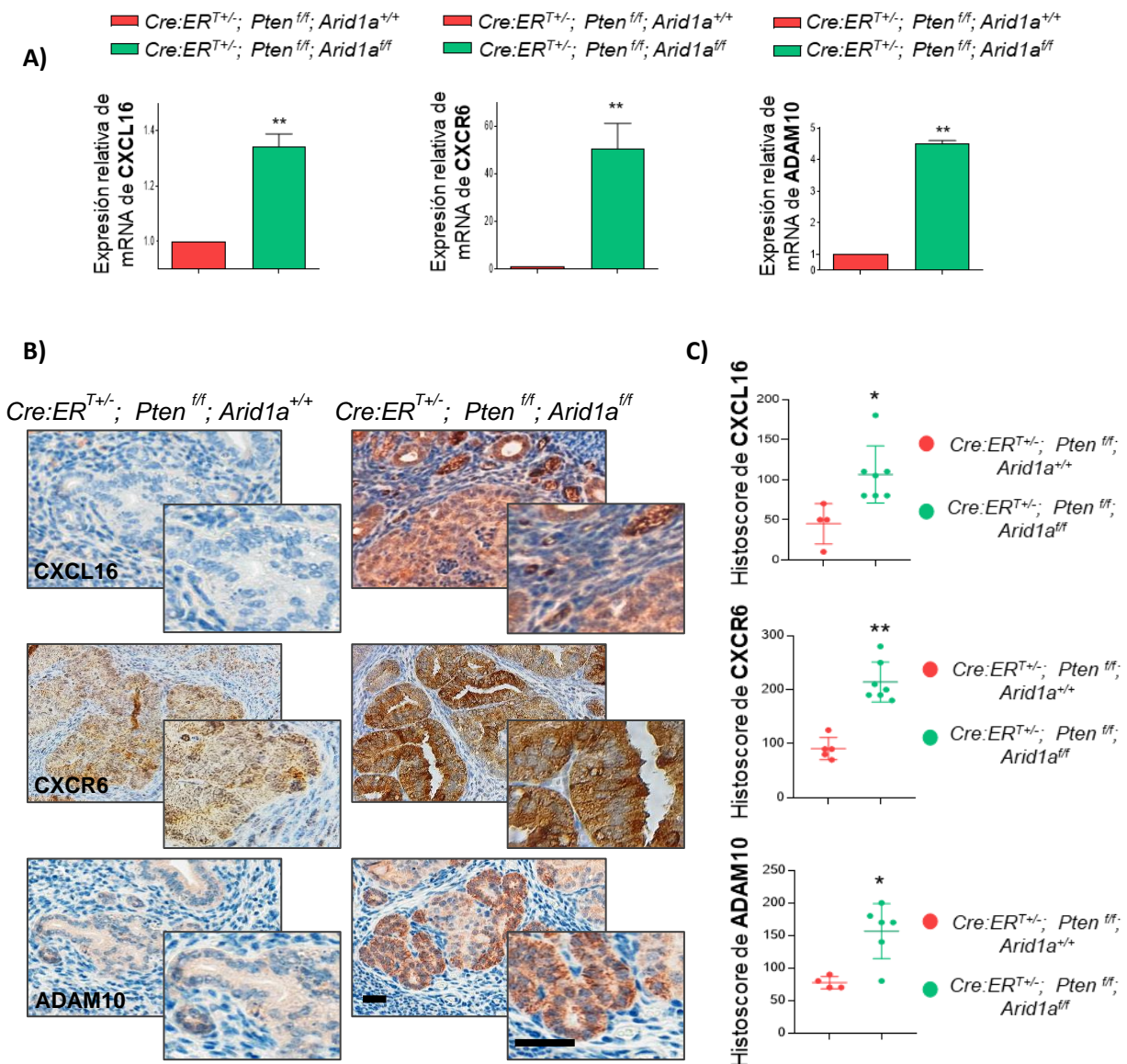
**Figura 108.** Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A inducen la expresión de marcadores de CXCL16 y ADAM10 en tumores subcutáneos *in vivo*. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra CXCL16 y ADAM10 en secciones consecutivas de tumores subcutáneos constituidos por células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) o del vector vacío y B) cuantificación de los niveles de expresión. El Hoechst fue usado como marcador de núcleo. Barra de escala= 100µm. \*\*\* P≤0,001. EV, vector vacío.

En concordancia con estos resultados, el ensayo Elisa contra CXCL16 realizado con los plasmas extraídos de los ratones del experimento de la figura 88 con tumores subcutáneos, mostró que aquellos ratones con tumores xenógrafos formados por células MFE-296 sgRNA ARID1A-3 presentaban en sus plasmas concentraciones de CXCL16 significativamente mayores, respecto a los plasmas de los ratones con tumores xenógrafos formados por células MFE-296 EV (figura 109).



**Figura 109. Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A promueven la secreción de la quimioquina CXCL16 *in vivo*.** A) Gráfico representativo del ensayo Elisa contra CXCL16 realizado con plasmas recopilados de ratones inmunocomprometidos con tumores xenógrafos subcutáneos, constituidos por células MFE-296 infectadas con lentivirus portadores del sgRNA *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) o del vector vacío. \*  $P \leq 0,05$ . EV, vector vacío.

Por último, se decidió evaluar si estos resultados se reproducían en nuestro modelo murino de adenocarcinoma endometrial *Cre:ER<sup>T</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*. Para ello, primero de todo se evaluaron mediante ensayos de RT-qPCR los niveles de expresión a nivel de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10. Como puede observarse en la figura 110 A, los resultados mostraron que efectivamente existía un incremento de expresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 en las células epiteliales endometriales aisladas de los tumores de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, en comparación con las de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>*. Además, ensayos de inmunohistoquímica contra CXCL16, CXCR6 y ADAM10 revelaron que también existía un incremento significativo de los niveles de proteína de dichos marcadores, en los endometrios de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, en comparación con los de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (figura 110 B-C).

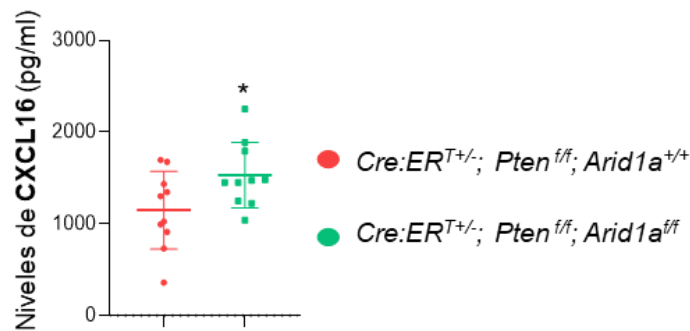


**Figura 110. La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa la expresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10.** A) Histogramas representativos de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 de células endometriales epiteliales aisladas de úteros de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* con adenocarcinomas endometriales. B) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra CXCL16, CXCR6 y ADAM10 en secciones consecutivas de úteros de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* con adenocarcinomas endometriales y C) cuantificación de los niveles de expresión. Barra de escala= 100µm.

Finalmente, ensayos Elisa contra CXCL16 desvelaron que también existía un incremento de los niveles secretados de esta quimioquina en los plasmas de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* con CE, en comparación con los plasmas aislados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* con CE (figura 111).



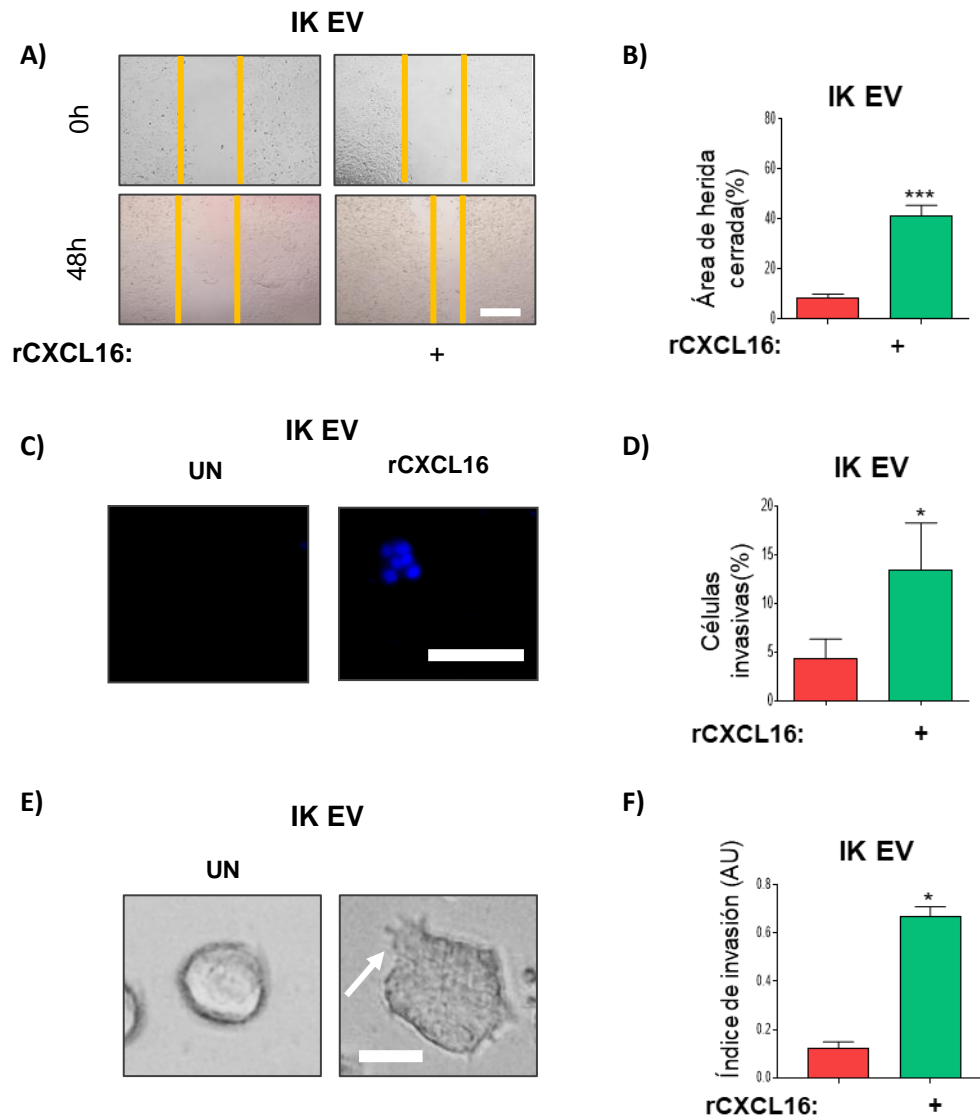
A)



**Figura 111. La pérdida de ARID1A en adenocarcinomas endometriales de los ratones con pérdida de PTEN incrementa los niveles de CXCL16 secretado en plasma.** A) Gráfico representativo del ensayo Elisa contra CXCL16 realizado con plasmas recopilados de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* con adenocarcinomas endometriales. \*  $P \leq 0,05$ .

#### 2.4. Análisis del efecto del CXCL16 secretado por las células tumorales deficientes para ARID1A en la promoción de fenotipos más agresivos en las células de CE circundantes con expresión salvaje de ARID1A.

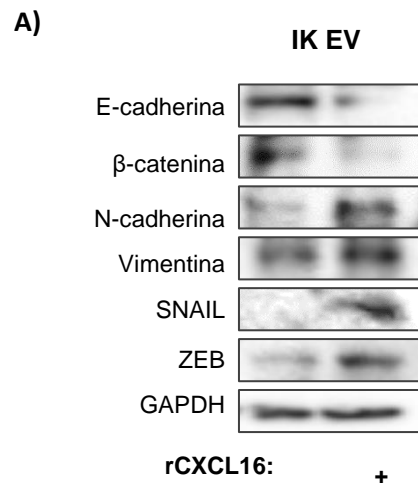
En primer lugar, para corroborar el rol de CXCL16 en la adquisición de fenotipos tumorales más agresivos en las células de CE, células IK con expresión salvaje de ARID1A fueron tratadas con proteína CXCL16 recombinante (rCXCL16). Ensayos de migración de wound healing, y de invasión de transwell y de cultivos 3D, mostraron que estas células poseían mayores capacidades migratorias e invasivas en presencia del tratamiento con rCXCL16 (figura 112).



**Figura 112. CXCL16 promueve la migración e invasión en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas o no con rCXCL16 (25ng/ml) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas o no durante 48h con rCXCL16 (25ng/ml) y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25 $\mu$ m. E) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D de células IK infectadas con EV en presencia o no de tratamientos con rCXCL16 (25ng/ml) y F) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25  $\mu$ m. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío. AU, unidad arbitraria.

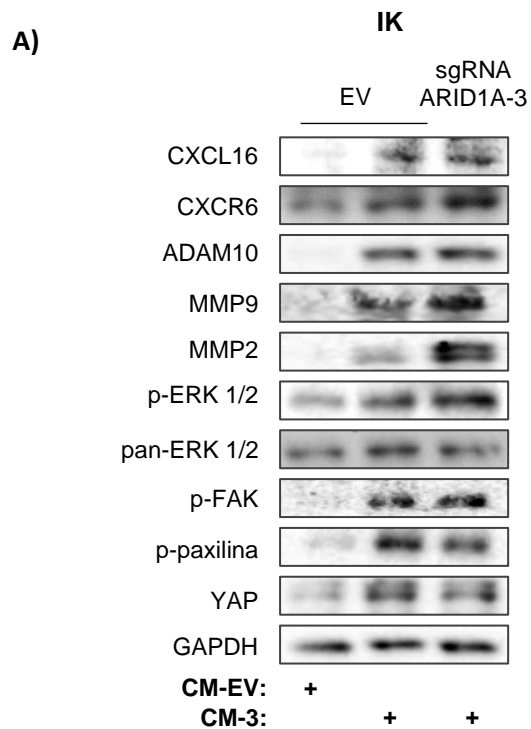
En concordancia con estos resultados, al analizar por western blot la expresión de algunos marcadores característicos del fenotipo de EMT, se vio que las células IK EV que habían sido tratadas con rCXCL16 expresaban menores niveles de marcadores epiteliales como E-cadherina

y  $\beta$ -catenina, así como mayores niveles de marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina, y factores de transcripción relacionados con la promoción del EMT tales como SNAIL y ZEB, en comparación con las no tratadas (figura 113).



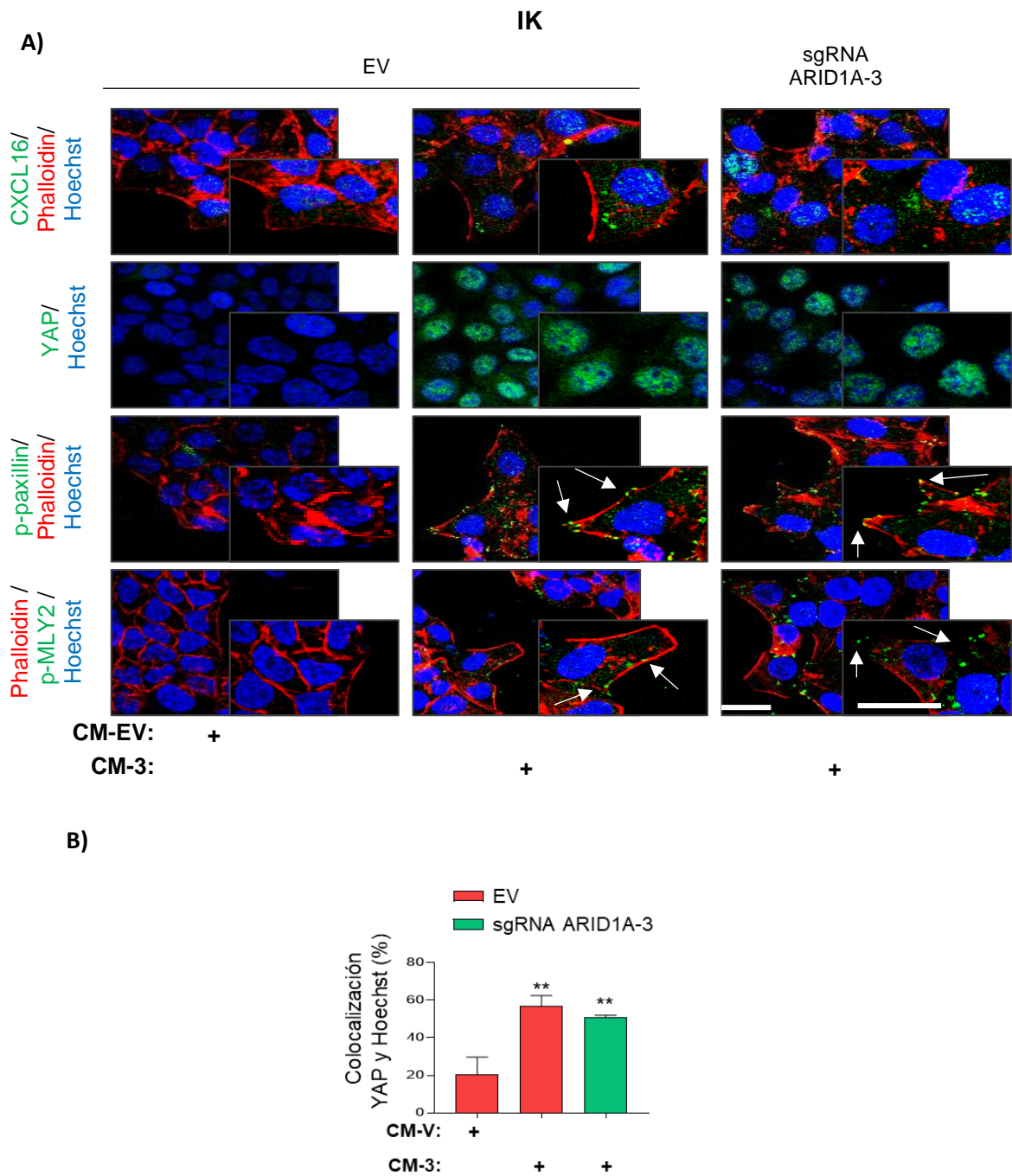
**Figura 113. CXCL16 promueve alteraciones en los niveles de expresión de marcadores de EMT en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de E-cadherina,  $\beta$ -catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB en células IK tratadas o no durante 48h con rCXCL16 (25ng/ml). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

La activación del eje CXCR6/CXCL16 por medio de la vía ERK, es capaz de liderar la formación de fibras de estrés, formar filamentos de actina-miosina contráctiles y mantener adhesiones focales, que desencadenan en un incremento de la señalización de la vía p-paxilina/FAK y la activación y translocación nuclear de YAP/TAZ, conduciendo a la sobreexpresión de proteínas como MMP2, MMP9, ADAM10, CXCR6 y CXCL16, y generándose así un bucle de retroalimentación positiva<sup>112,115,118,120,153</sup>. Para corroborar que los niveles de sobreexpresión de la quimioquina CXCL16 eran los responsables de los fenotipos observados tras los tratamientos con los CM, lo primero que se hizo fue evaluar la activación del eje CXCL16/CXCR6 en las células IK EV tratadas con CM-3 o CM-V. Los ensayos de western blot revelaron la existencia de elevados niveles de expresión de algunas proteínas claves para la activación del eje CXCR6/CXCL16, tales como CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK  $\frac{1}{2}$  (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP, en las células IK con expresión salvaje de ARID1A que habían sido previamente tratadas con CM-3, en comparación con las que habían sido tratadas con CM-V (figura 114). Además, se observó que las células IK infectadas con el sgRNA ARID1A-3 también expresaban mayores niveles de estas proteínas claves para el eje CXCR6/CXCL16, en comparación con las IK EV (figura 114).



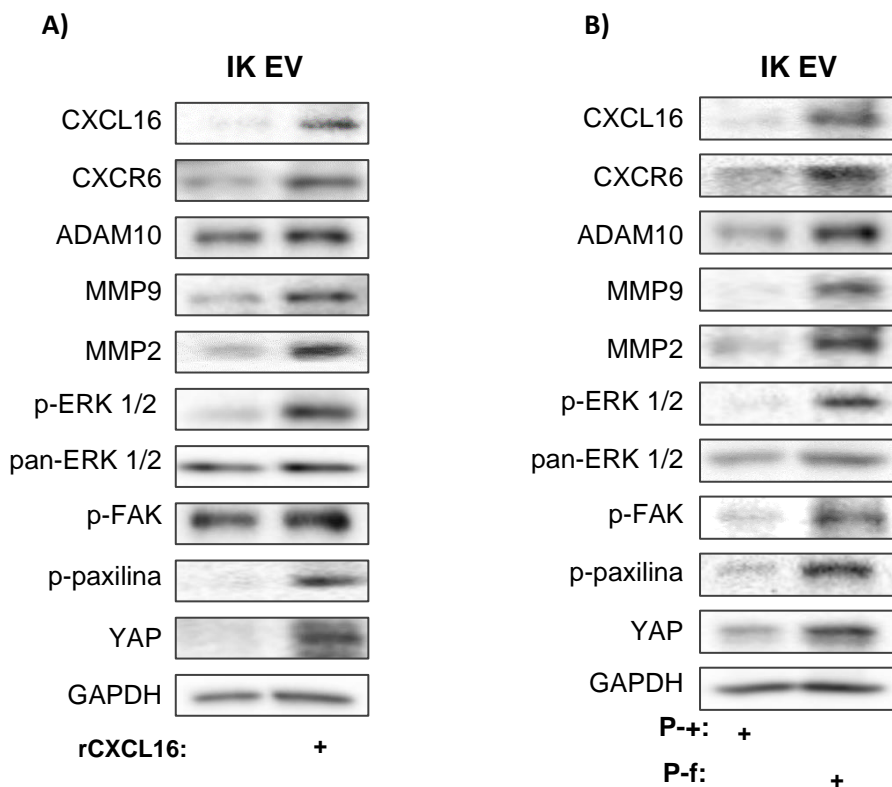
**Figura 114.** Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan hiperactivada la vía CXCR6/CXCL16 y promueven la activación de ésta en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP en células IK infectadas con lentivirus portadores del sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) o del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con sgRNA ARID1A-3 (CM-3). La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Estos resultados fueron corroborados mediante la realización de ensayos de inmunofluorescencia, los cuales reafirmaron que en las células IK EV tratadas con CM-3, existía un incremento de los niveles de CXCL16, YAP, p-paxilina (tyr118) y p-MYL2 (Ser19), respecto a las células tratadas con CM-V (figura 114 A). Además, dicho ensayo desveló que en estas células IK EV tratadas con CM-3 también se daba una mayor acumulación nuclear de YAP, un incremento de los niveles de p-paxilina formando adhesiones focales en la membrana plasmática y una acentuada asociación de la p-MYL2 con las fibras de estrés de actina, respecto a las células IK EV que habían sido tratadas con CM-V (figura 115 A-B). Reafirmando así la existencia de una hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16. De nuevo, en concordancia con previos resultados, estos resultados también se reprodujeron en las células IK infectadas con el sgRNA ARID1A-3, al ser comparadas con las células IK EV (figura 115 A-B).



**Figura 115.** Las células humanas de CEE con pérdida de expresión de ARID1A presentan cambios en la localización y expresión de CXCL16, YAP, p-paxilina y p-MLY2 y promueven dichos cambios en células de CEE con expresión conservada de ARID1A. A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los efectores de la vía CXCR6/CXCL16, CXCL16, YAP, p-paxilina (Tyr118) y p-MYL2 (Ser19). B) Gráfico que muestra el porcentaje de colocalización de YAP con el marcador nuclear Hoechst. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25µm. \*\* P<0,01. EV, vector vacío.

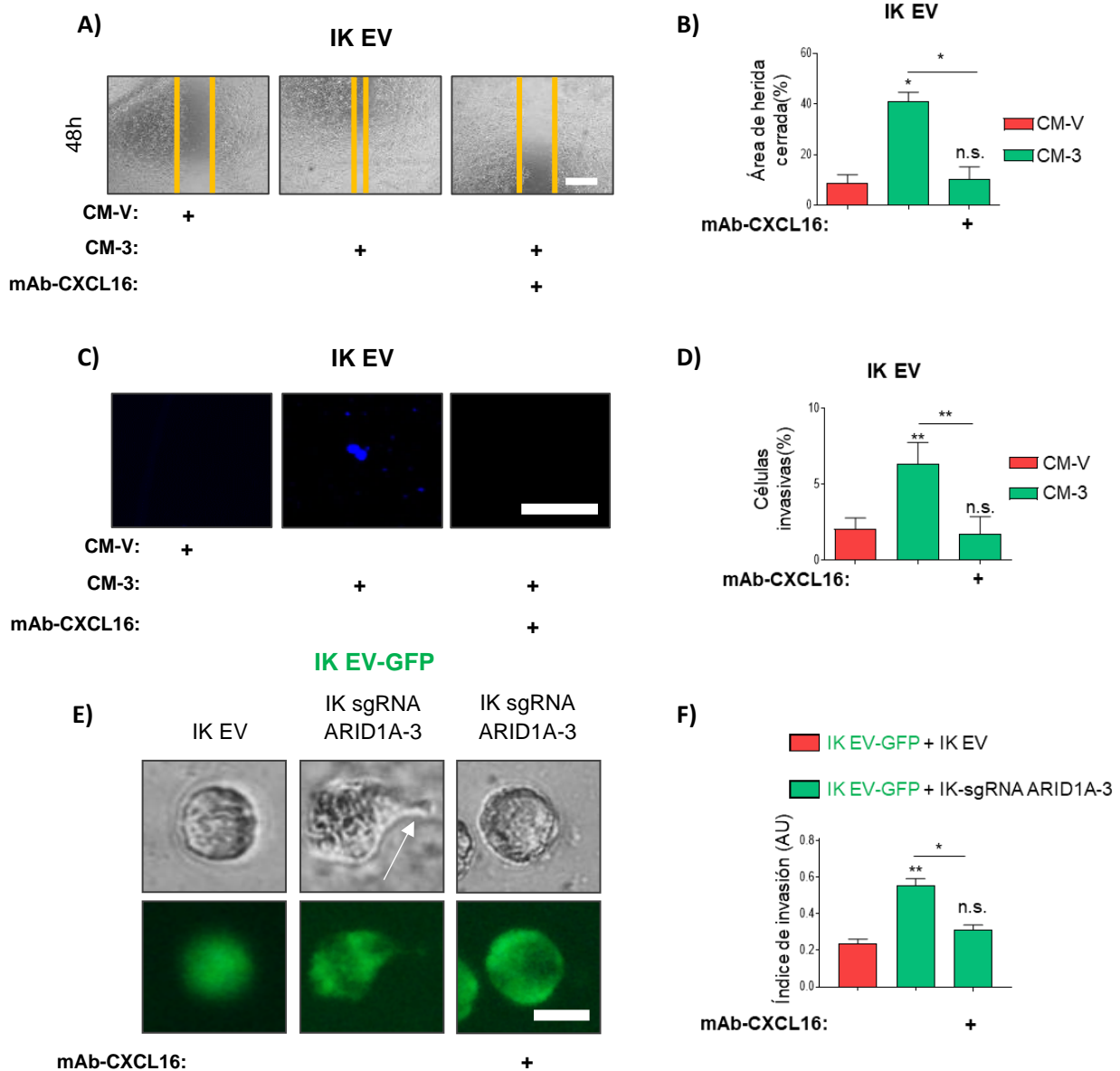
Además, para corroborar la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en presencia de CXCL16, se analizaron mediante ensayos de western blot, el estado de expresión de los principales efectores de esta vía en células IK EV que habían sido tratadas con rCXCL16. Se observó que, efectivamente, estas células también mostraban incrementados los niveles de expresión de CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP, respecto a las no tratadas (figura 116 A). Estos mismos resultados se replicaban en las células IK EV que habían sido tratadas con plasmas de ratones P-f, respecto a sus controles tratados con plasma de ratón P-+ (figura 116 B). Corroborándose así, que el incremento de los niveles de CXCL16 desencadena en la hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16.



**Figura 116. Tanto los tratamientos con rCXCL16 como el plasma de los ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* con CE inducen la activación de la vía CXCR6/CXCL16.** Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP en células IK infectadas con lentivirus portadores del EV tratadas durante 48h con A) proteína recombinante CXCL16 (25ng/ml) o B) con plasma aislado de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (P-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P-+) con adenocarcinomas de endometrio. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Posteriormente, se quiso ratificar que la secreción de la quimioquina CXCL16 por parte de las células de CE con regulación a la baja de ARID1A, era la responsable de los efectos observados en la adquisición de fenotipos tumorales más agresivos, en las células colindantes de CE con expresión salvaje de ARID1A. Con este fin, células IK con expresión salvaje de ARID1A fueron tratadas con CM-V o CM-3, en presencia o no de anticuerpos neutralizantes contra CXCL16. Los

ensayos de migración de wound healing, y de invasión de transwell y de los cultivos 3D, revelaron que el anticuerpo neutralizante contra CXCL16 revertía los efectos observados tras los tratamientos con CM-3 en la adquisición de capacidades migratorias e invasivas de las células IK EV (figura 117).

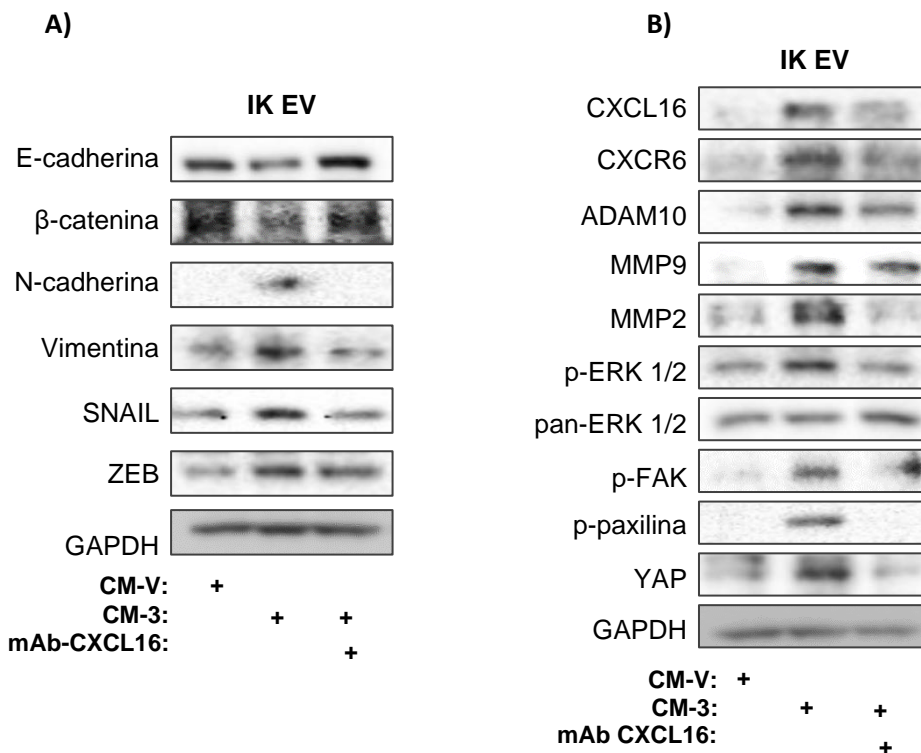


**Figura 117.** La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revertió las capacidades migratorias e invasivas promovidas por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A. A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A-3*) (CM-3), en presencia o no de anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100 µm. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell



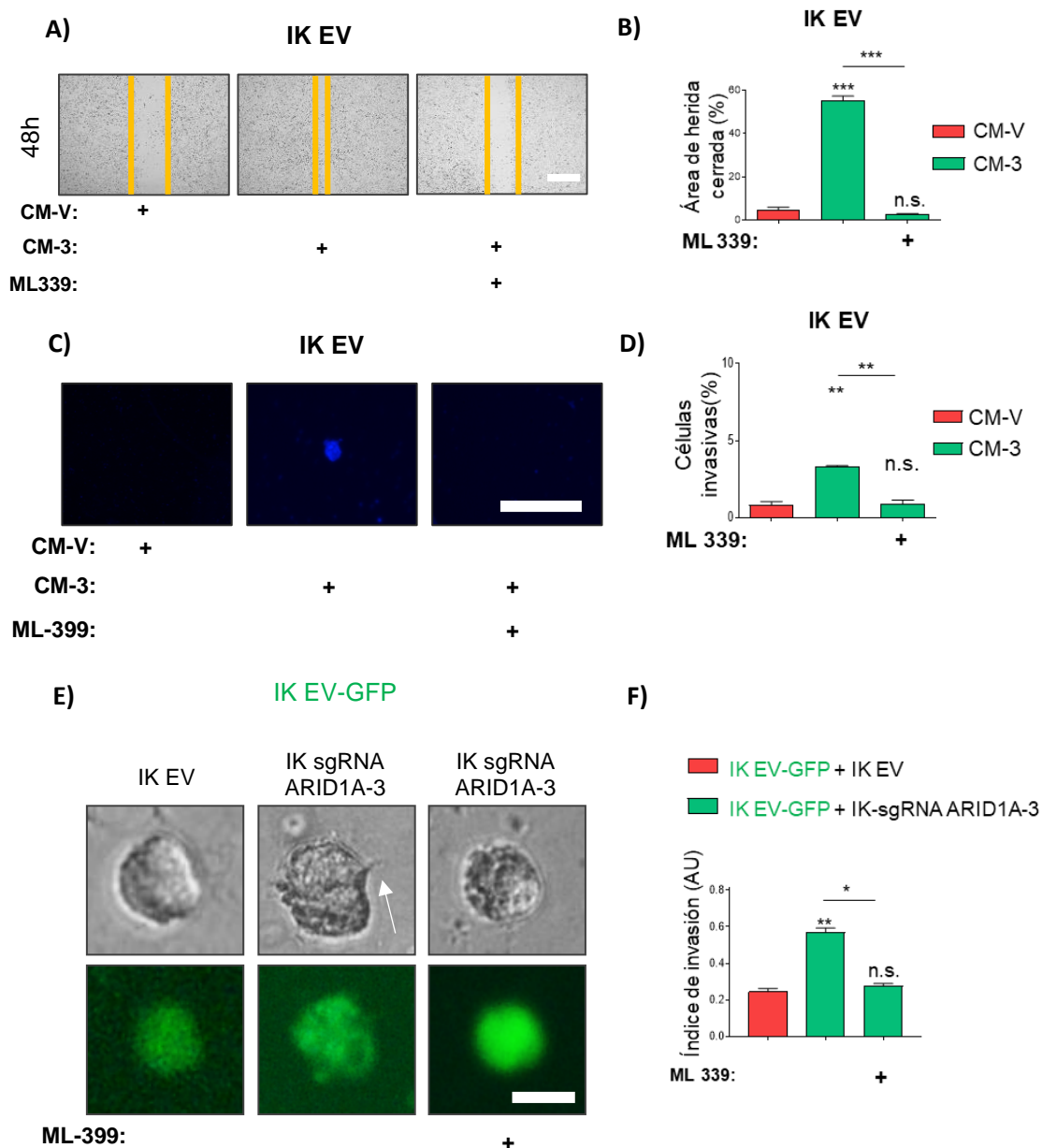
después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3), en presencia o no de anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) durante 48h y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25µm. E) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con células IK no marcadas con GFP, infectadas o no con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) en presencia o no de anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) y B) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25 µm. n.s. (no significativo, P≥0,05); \* P≤0,05; \*\* P≤0,01. EV, vector vacío. AU, unidad arbitraria.

De acuerdo con estos resultados, cuando se analizó por ensayos de western blot los niveles de expresión de los marcadores de EMT, se pudo apreciar que la adición de anticuerpo neutralizante contra CXCL16 revertía el efecto que el medio CM-3 generaba en las células IK EV, restaurando los niveles de los marcadores epiteliales E-cadherina y β-catenina y disminuyendo la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina, vimentina, SNAIL y ZEB (figura 118 A). Además, se corroboró que con este bloqueo de la quimioquina CXCL16 secretada en los CM-3, también se revertía la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16, puesto que al añadir el anticuerpo neutralizante de CXCL16 se revertía la sobreexpresión de los principales efectores de dicha vía (CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP), inducida por los tratamientos con CM-3 en las células IK-EV (figura 118 B).



**Figura 118. La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte la alteración en el fenotipo EMT y la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16, promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A.** Células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A*-3) (CM-3) en presencia o no de anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) durante 48h. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de los marcadores de EMT E-cadherina, β-catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB. B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

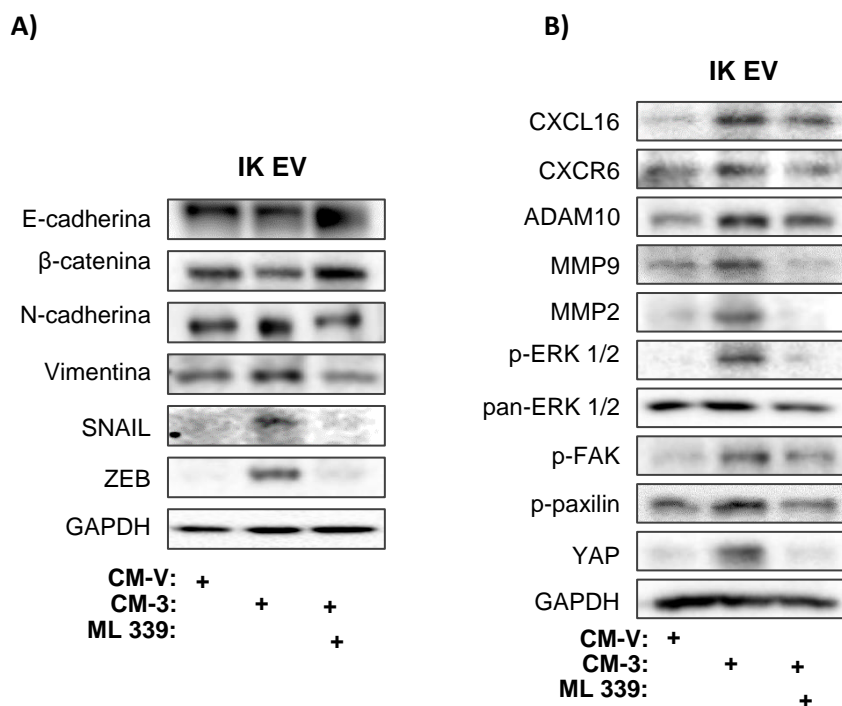
Dado que el receptor único y específico de CXCL16 es CXCR6<sup>154</sup>, se decidió analizar si los resultados obtenidos con el mAb-CXCL16, se replicaban al realizar la inhibición farmacológica del receptor CXCR6. Para ello se empleó el inhibidor farmacológico selectivo de CXCR6, ML-339, en células IK EV tratadas con CM-3 y se analizaron los efectos en la migración e invasión. Los resultados de los ensayos de migración de wound healing, e invasión de transwell y de cultivos 3D, revelaron que de igual manera que con el bloqueo de CXCL16, la inhibición de CXCR6 revertía los efectos que el CM-3 tenía en la inducción de la migración e invasión en las células IK EV (figura 119).



**Figura 119. La inhibición de CXCR6 revierte las capacidades migratorias e invasivas promovidas por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A.** A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A-3*) (CM-3) en presencia o no del inhibidor de CXCR6 (ML 339) (140ng/ml) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst de ensayos de invasión de transwell después de retirar las células no invasoras, llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A-3*) (CM-3) en presencia o no del inhibidor de CXCR6 (ML 339) (140ng/ml) durante 48h y D) cuantificación del porcentaje de células invasivas. Barra de escala = 25 $\mu$ m. E) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con células IK infectadas o no con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-*ARID1A-3*) en presencia o no del inhibidor de CXCR6 (ML 339)

(140ng/ml) y B) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25  $\mu$ m. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío. AU, unidad arbitraria.

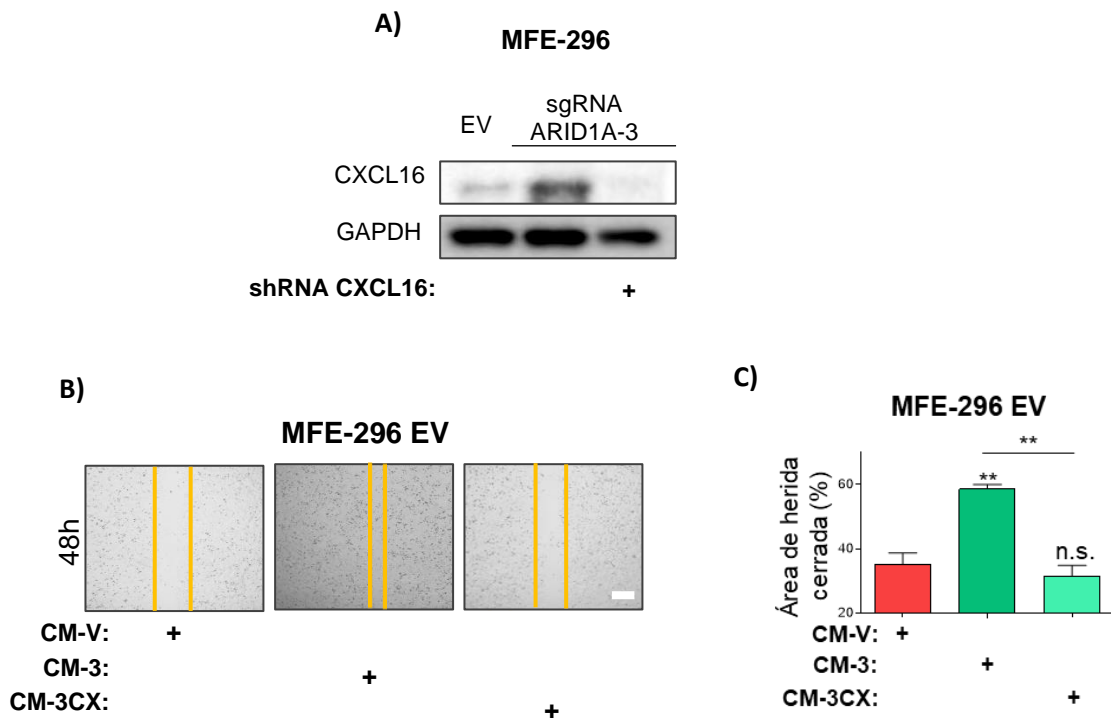
Finalmente, se ratificó por western blot que, al igual que con la neutralización de CXCL16, la inhibición de CXCR6 revertía los efectos en la inducción del fenotipo EMT que los tratamientos con CM-3 promovían en las células IK EV. Los resultados mostraron que en las células IK EV tratadas con CM-3 y ML-399, se producía un incremento de los marcadores epiteliales (E-cadherina y  $\beta$ -catenina) y una disminución de los marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, SNAIL y ZEB), en comparación con las tratadas únicamente con CM-3 (figura 120 A). Además, al tratar las células con ML-399, también se observó una disminución de los niveles de expresión de las proteínas clave para la actividad del eje CXCR6/CXCL16 (CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK  $\frac{1}{2}$  (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP), inducidos por los tratamientos con CM-3 (figura 120 B). Sugiriendo que la inhibición de CXCR6, también revertía la hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16 provocada por el CM-3 en las células IK EV.



**Figura 120. La inhibición de CXCR6 revierte la alteración en el fenotipo EMT y la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16, promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A.** Células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío, tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3), en presencia o no del inhibidor de CXCR6 (ML 339) (140ng/ml), durante 48h. A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de los marcadores de EMT E-cadherina,  $\beta$ -catenina, N-cadherina, vimentina, MMP-2, SNAIL y ZEB. B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK  $\frac{1}{2}$  (Thr202/Tyr204),

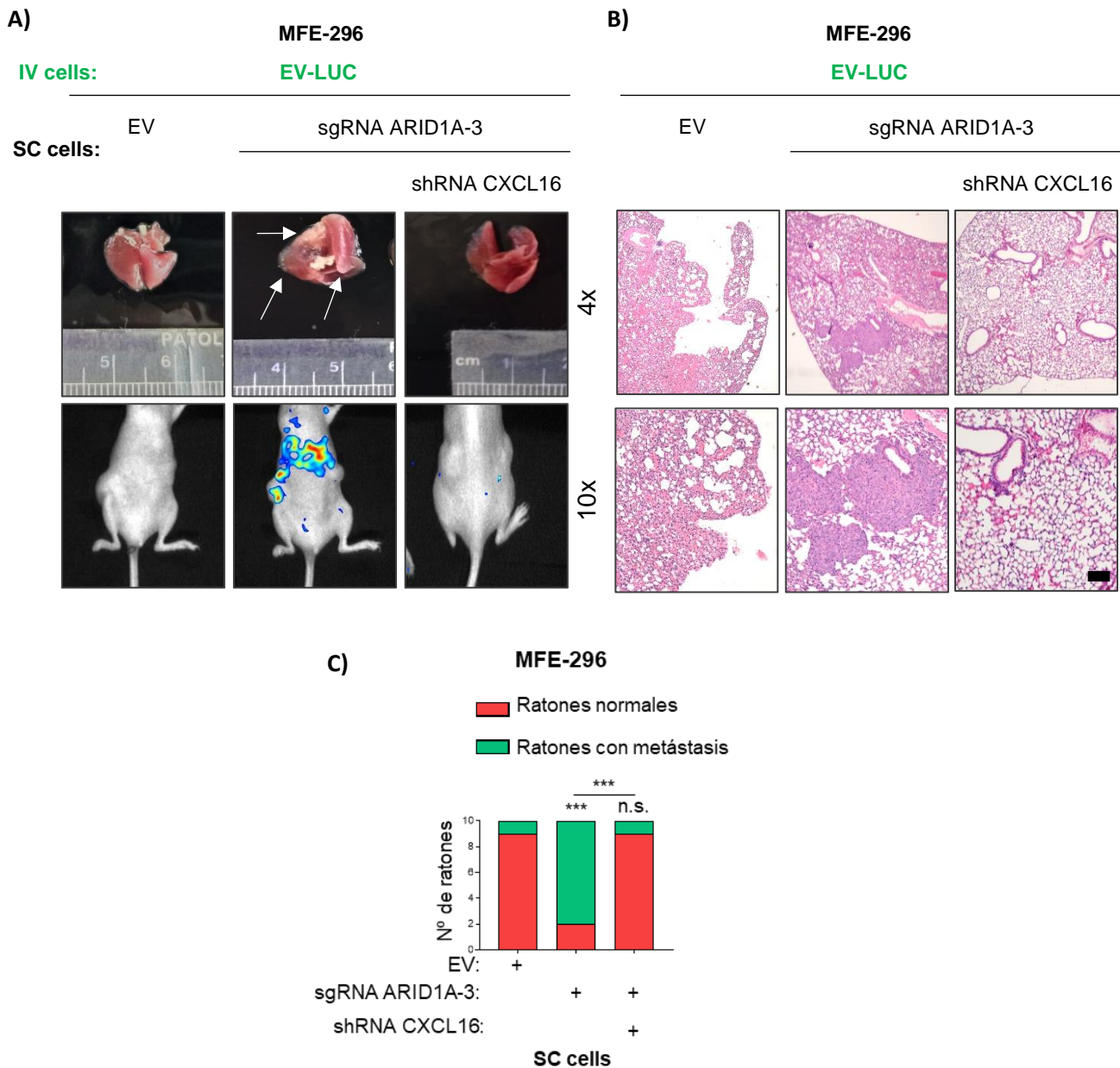
p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío.

Estos efectos fueron replicados mediante el silenciamiento de CXCL16 en las células MFE-296 sgRNA ARID1A-3, mediante el empleo de un shRNA contra CXCL16. La bajada de expresión de CXCL16 fue comprobada por western blot (figura 121 A). A continuación, se recopiló el CM de estas células MFE-296 sgRNA ARID1A-3 shRNA CXCL16 (CM-3CX), junto con el CM-3 y CM-V y se trataron células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A con estos CM. Mediante ensayos de wound healing se evaluó el efecto que estos CM tenían sobre las capacidades migratorias de las células MFE-296 EV. Los resultados demostraron que, en concordancia con los resultados previos, los CM-3CX tenían reducido el potencial para promover las capacidades de las células MFE-296 EV, en comparación con los CM-3 (figura 121 B-C).



**Figura 121. El silenciamiento de CXCL16 en las células humanas de CEE con expresión alterada de ARID1A revierte su capacidad de promover la migración en las células humanas de CEE con expresión salvaje de ARID1A.** A) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de CXCL16 en células MFE-296 deficientes de ARID1A (o no) infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-CXCL16 o control. GAPDH usada como control de carga. B) Imágenes representativas a tiempo 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células MFE-296 EV tratadas con CM recolectados de células MFE-296 infectadas con el EV (CM-V), con el sgRNA contra ARID1A (CM-3) o con el sgRNA contra ARID1A y el shRNA contra CXCL16 (CM-3CX) y C) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*  $P \leq 0,01$ . EV, vector vacío.

Finalmente se decidió corroborar que este efecto de CXCL16 también se replicaban *in vivo*. Para ello se empleó la misma estrategia que en el experimento de la figura 87. Primero se generaron tumores subcutáneos con células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A, células MFE-296 infectadas con el sgRNA contra ARID1A o células MFE-296 co-infectadas con el sgRNA contra ARID1A y con el shRNA contra CXCL16, en ratones inmunodeficientes (NSG). Una vez transcurridas tres semanas, y con los tumores subcutáneos ya bien establecidos, se inyectaron intravenosamente células MFE-296 con expresión salvaje para ARID1A y marcadas con el gen reportero de la lucifera (MFE-296 EV-LUC), en los tres grupos de ratones. Después de 3 semanas post-inyección intravenosa, los resultados revelaron que mientras que en el grupo de ratones con tumores subcutáneos con células MFE-296 sgRNA ARID1A-3, todos presentaban focos metastáticos en pulmón de células MFE-296 EV marcadas con luciferasa, interesantemente, en el grupo de ratones con tumores subcutáneos con células MFE-296 sgRNA ARID1A-3 pero con expresión disminuida de CXCL16, el número de ratones con focos metastáticos se veía dramáticamente disminuido (figura 122). Estos resultados, en conjunto, sugieren un papel fundamental de CXCL16, por parte de las células de CE con alteraciones de ARID1A, en la promoción de la diseminación tumoral de las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.



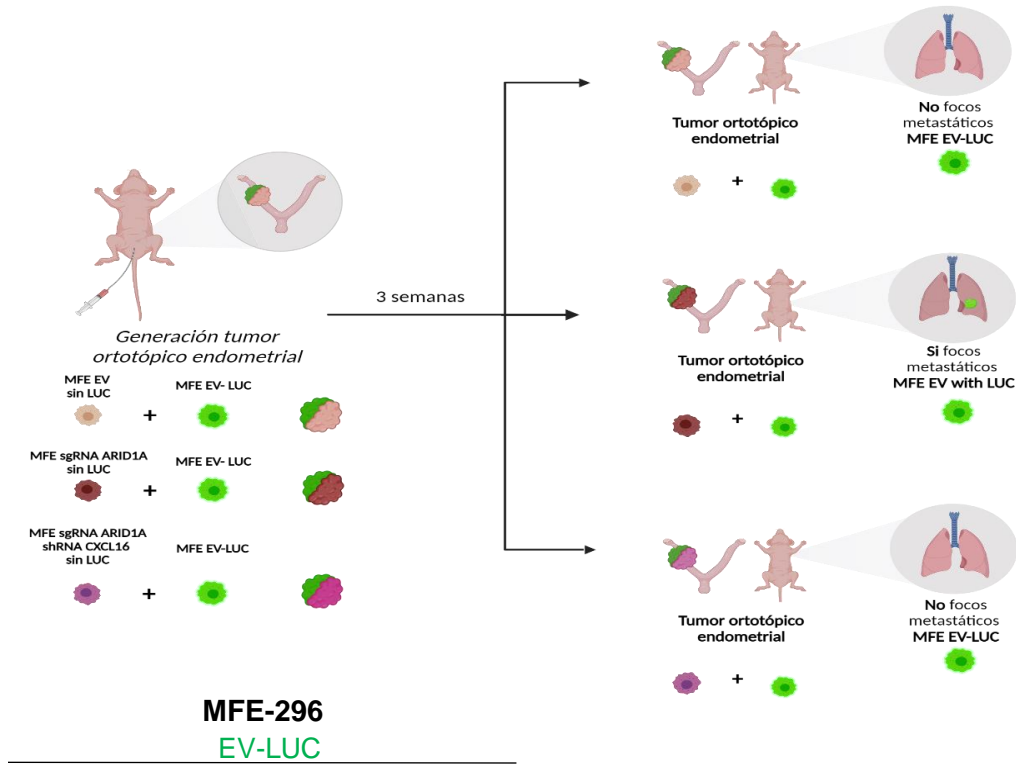
**Figura 122. La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastásica promovida por las células de CEE con alteraciones de ARID1A en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A *in vivo*.** Células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A o con expresión alterada de ARID1A infectadas o no con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6, fueron inyectadas subcutáneamente y se dejaron crecer durante 3 semanas. Transcurrido este tiempo, y ya establecidos los tumores subcutáneos,  $50 \times 10^4$  células GFP-luciferasa MFE-296 EV (MFE-296 EV-LUC), fueron inyectadas intravenosamente y se dejaron crecer durante 3 semanas (ir a materiales y métodos para mayor detalle). A) Abajo, imágenes representativas de la señal de bioluminiscencia y, arriba, imágenes representativas macroscópicas de los pulmones de los ratones de ambos grupos. B) Imágenes representativas microscópicas de las tinciones de Eosina Hematoxilina (EH) comparando las metástasis generadas en los pulmones de los ratones de ambos grupos. Barra de escala =100  $\mu$ m. C) Gráfico representativo mostrando el número de ratones con focos metastásicos presentes en los grupos de animales indicados. n.s. (no significativo); \*\*\*  $P \leq 0,005$ . EV, vector vacío. SC, subcutáneas; IV, intravenosas.



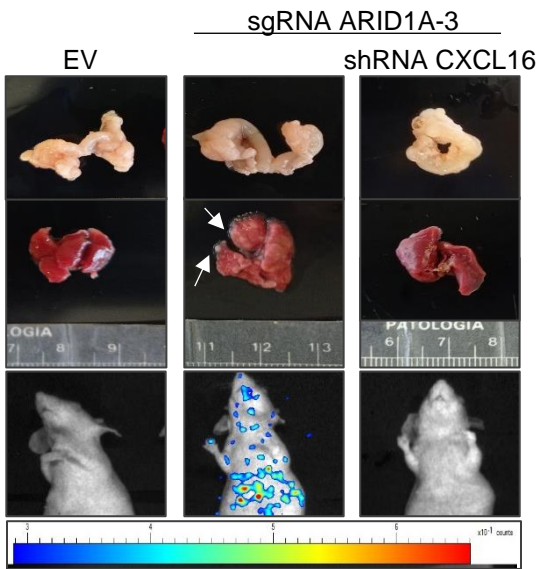
Por último, y debido al papel tan importante que se ha visto que tiene el microambiente tumoral en las funciones pro-tumorogénicas de las células de CE con alteraciones de ARID1A, se decidió poner a punto un modelo murino ortotópico xenógrafo endometrial, para ver si los resultados observados en el modelo murino anterior (figura 122), se replicaban en presencia de un microambiente tumoral endometrial. Para ello, células MFE-296 EV marcadas con el gen reportero GFP-Luciferasa (MFE-296 EV-LUC) fueron co-cultivadas durante 72h con células sin marcar con el gen reportero de la luciferasa: MFE-267 EV, MFE-296 sgRNA ARID1A-3 o MFE-296 sgRNA ARID1A-3 shCXCL16. Transcurrido este tiempo,  $3 \times 10^5$  células de cada condición, fueron inyectadas en una rama de ratones inmunodeficientes (NSG) (Figura 123 A).

Después de 3 semanas post-inyección ortotópica, se observó que la mayoría de ratones del grupo de ratones con tumores ortotópicos de células MFE EV-LUC y MFE-296 sgRNA ARID1A-3, presentaban focos metastáticos en pulmón de células MFE-296 EV marcadas con luciferasa (figura 122 B-D). Por el contrario, transcurrido este tiempo, no se observó ningún foco metastático en pulmón, ni en el grupo de ratones con tumores ortotópicos de células MFE EV-LUC y MFE-296 EV, ni el grupo de ratones con tumores ortotópicos de células MFE EV-LUC y MFE-296 sgRNA ARID1A-3 shRNA CXCL16 (figura 123 B-D). Ratificándose así, que el silenciamiento de CXCL16 en las células de CE con alteraciones de ARID1A reduce las capacidades de estas células de potenciar la diseminación y formación de metástasis de las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.

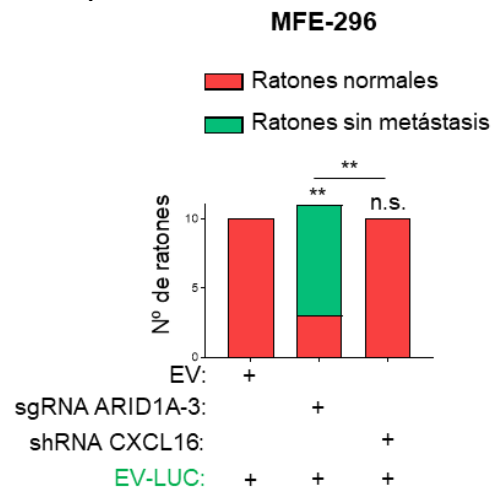
A)



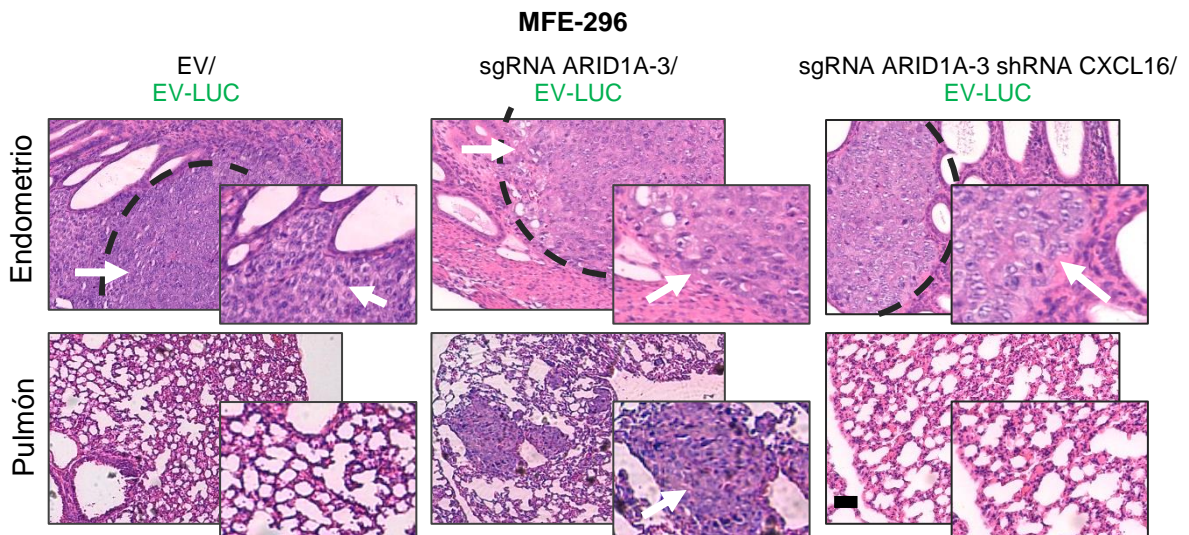
B)



C)



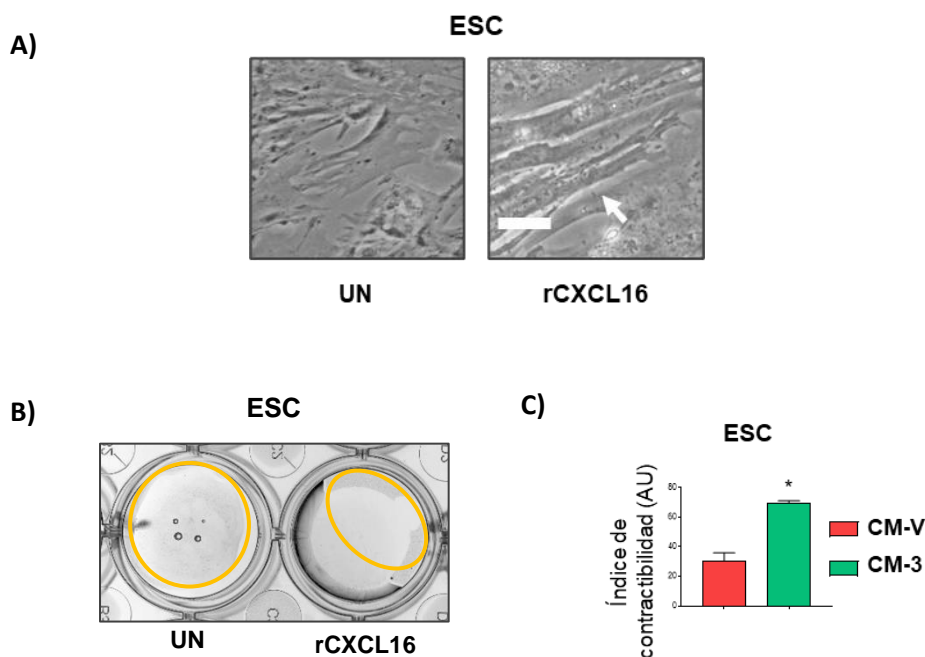
D)



**Figura 123. La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de diseminación y colonización metastásica promovida por las células de CEE con alteraciones de ARID1A en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A en los modelos murinos ortotópico xenografos de endometrio.** Células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A o con expresión alterada de ARID1A infectadas o no con partículas lentivirales que contienen shRNA-HDAC6, fueron co-cultivadas con células MFE-296 EV marcadas con el gen reportero de la luciferasa (MFE-296 EV-LUC) durante 72h e inyectadas en el endometrio y se dejaron crecer durante 3 semanas. A) Diagrama representativo del experimento. B) Abajo, imágenes representativas de la señal de bioluminiscencia y, arriba, imágenes representativas macroscópicas de pulmones y útero de los ratones de los grupos indicados. C) Gráfico representativo mostrando el número de ratones con focos metastáticos presentes en los grupos de animales indicados D) Imágenes representativas microscópicas de las tinciones de Eosina Hematoxilina (EH) comparando las metástasis generadas en los pulmones y los focos tumorales en endometrio de los ratones de los grupos indicados. Barra de escala =100  $\mu$ m. n.s. (no significativo); \*\*  $P \leq 0,01$ . EV, vector vacío.

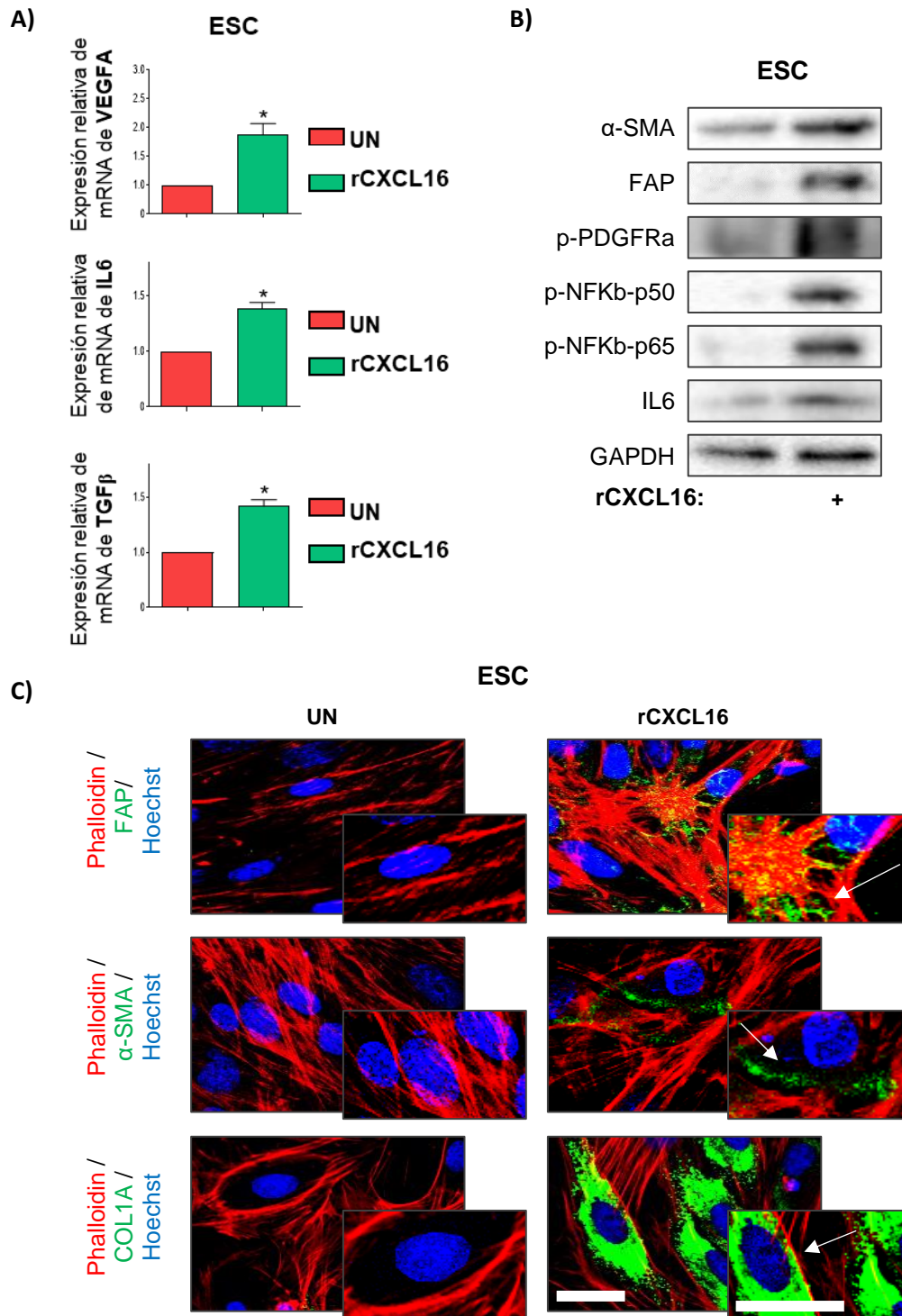
**2.5. Análisis del efecto del CXCL16 secretado por las células tumorales deficientes para ARID1A en la promoción de la activación de las ESC circundantes.**

Con el fin de descubrir si la secreción de CXCL16 facilitaba la activación de las ESC, se realizó el aislamiento de ESC y éstas fueron tratadas con proteína CXCL16 recombinante (rCXCL16). Lo primero que se observó fue que, tras el tratamiento con rCXCL16, las ESC adquirían morfologías más elongadas, características de los fenotipos CAF (figura 124 A). Lo segundo que se hizo, fue analizar, mediante la realización de ensayos de contractibilidad de geles de colágeno, si dichas células estromales se encontraban activas. Como puede apreciarse en la figura 124 B-C, los resultados mostraron que, efectivamente, aquellas células que habían sido tratadas con rCXCL16 poseían una mayor capacidad para contraer dichos geles en comparación con los controles no tratados.



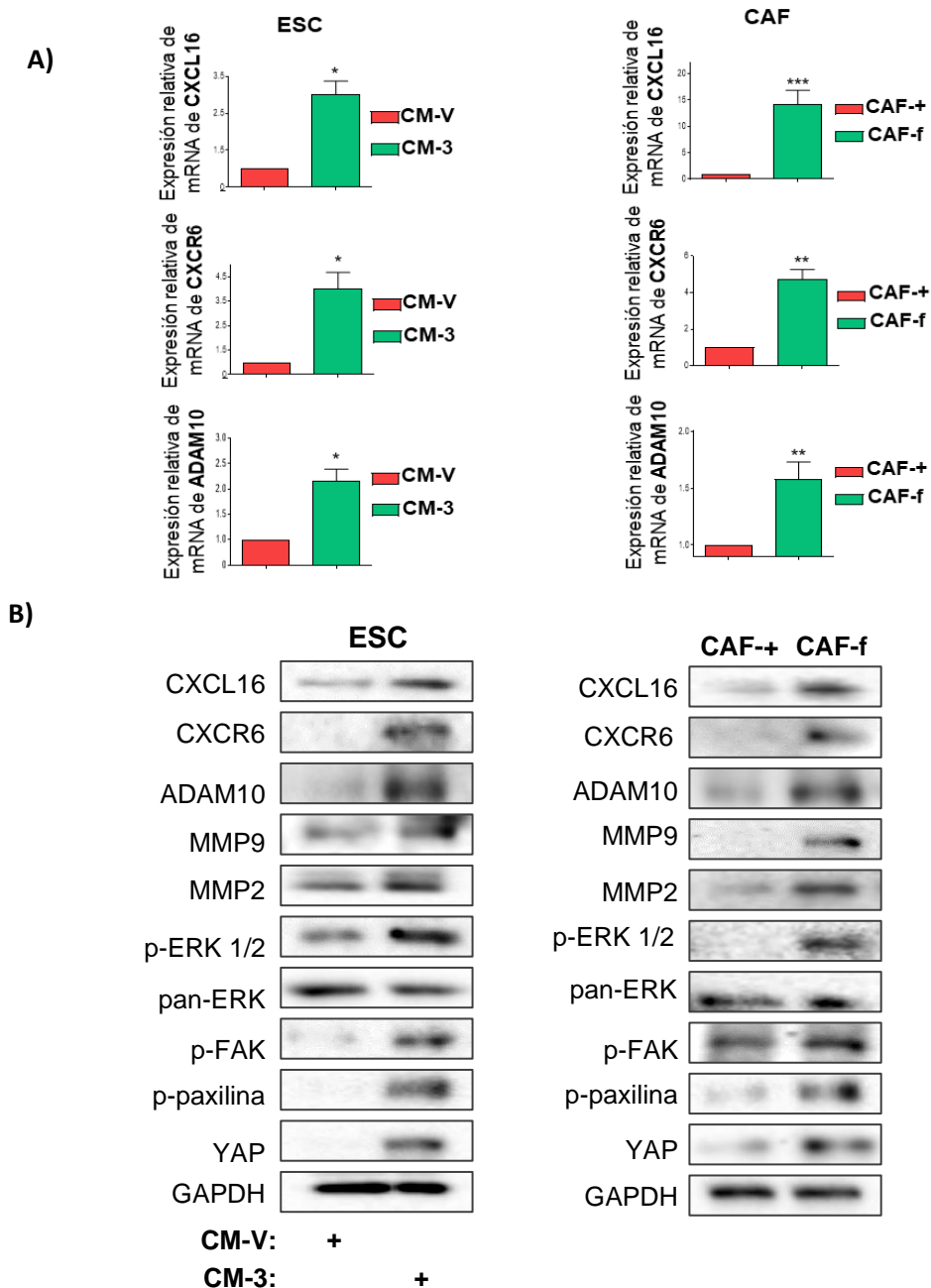
**Figura 124. La proteína rCXCL16 induce activación de las ESC.** ESC fueron tratadas durante 48h con rCXCL16 (25ng/ml). A) Imágenes representativas de contraste de fases. Barra de escala =10  $\mu$ m. B) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por ESC previamente sometidas a los tratamientos indicados y C) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. \*  $P \leq 0,05$ .

Con el fin de corroborar que aquellas ESC tratadas con rCXCL16 estaban siendo activadas, se decidió analizar el estado de expresión de algunos marcadores típicos del fenotipo de los CAF. Como puede apreciarse en la figura 125 A, el análisis de qRT-PCR desveló que las ESC que habían sido previamente tratadas con rCXCL16, expresaban mayores niveles de mRNA de los factores de secreción VEGF, IL6 y TFG- $\beta$ , en comparación con las que no habían sido tratadas. En concordancia con estos resultados, ensayos de western blot revelaron que los niveles de expresión de proteína de  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$  $\beta$ -p50 (Ser337), p-NF $\kappa$  $\beta$ -p65 (Ser536) o IL6, se encontraban incrementados en las ESC que habían sido tratadas con rCXCL16 con respecto las controles sin tratar (figura 125 B). Por último, ensayos de inmunofluorescencia contra  $\alpha$ -SMA, FAP y COL-1, marcadores de activación estromal típicos de los CAF, corroboraron que la proteína rCXCL16 inducía activación estromal en las ESC, puesto que aquellas células que habían sido previamente tratadas con la proteína recombinante expresaban mayores cantidades de todos estos marcadores respecto a las ESC no tratadas (figura 125 C).



**Figura 125. La proteína rCXCL16 induce la expresión de marcadores de activación estromal en las ESC.** ESC fueron tratadas durante 48h con rCXCL16 (25ng/ml). (A) Histograma representativo de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de VEGFA, IL6 y TGFβ1. B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p- NFκβ-p65 (Ser536) o IL6. La GAPDH fue usada como control de carga. C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los marcadores de activación estromal FAP, α-SMA y COL1A. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25μm. \* P≤0,05. EV, vector vacío.

Seguidamente, con el fin de validar la implicación de CXCL16 en la activación de las ESC causada por las células de CE con niveles alterados de ARID1A, se decidió analizar el estado de activación de la vía CXCR6/CXCL16, tanto en las ESC tratadas con CM-3 o CM-V, como en los CAFs aislados de los CE del modelo murino *Cre:ER<sup>T</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f o CAF-+). Primero, se validó por qRT-PCR los niveles de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10, los componentes primordiales de la vía CXCR6/CXCL16. Los resultados mostraron que los niveles de los tres marcadores se encontraban incrementados, tanto en las ESC tratadas con CM-3, como en los CAF-f, en comparación con sus respectivos controles (figura 126 A). Para ratificar estos resultados, se analizó mediante western blot los niveles de expresión de proteína de los principales efectores del eje CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP, observándose un incremento de todos ellos tanto en las ESC previamente tratadas con CM-3 como en los CAF-f, respecto sus respectivos controles (figura 126 B).

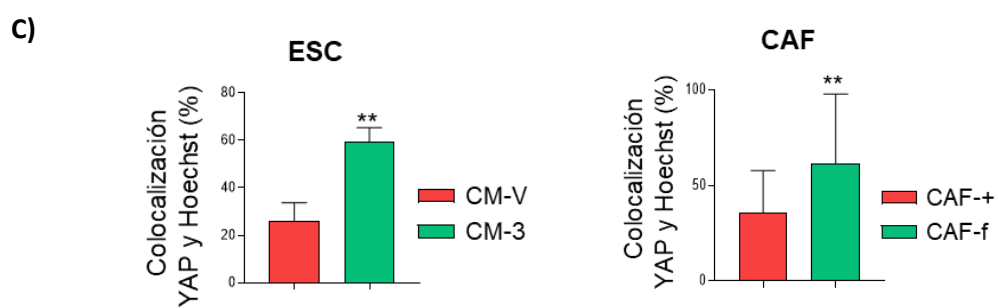
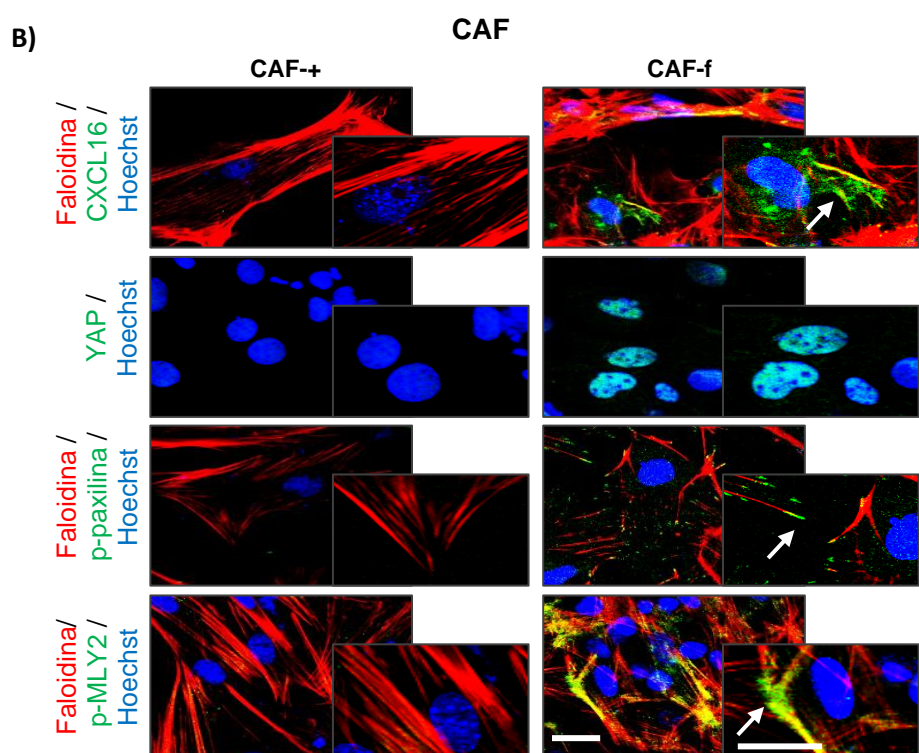
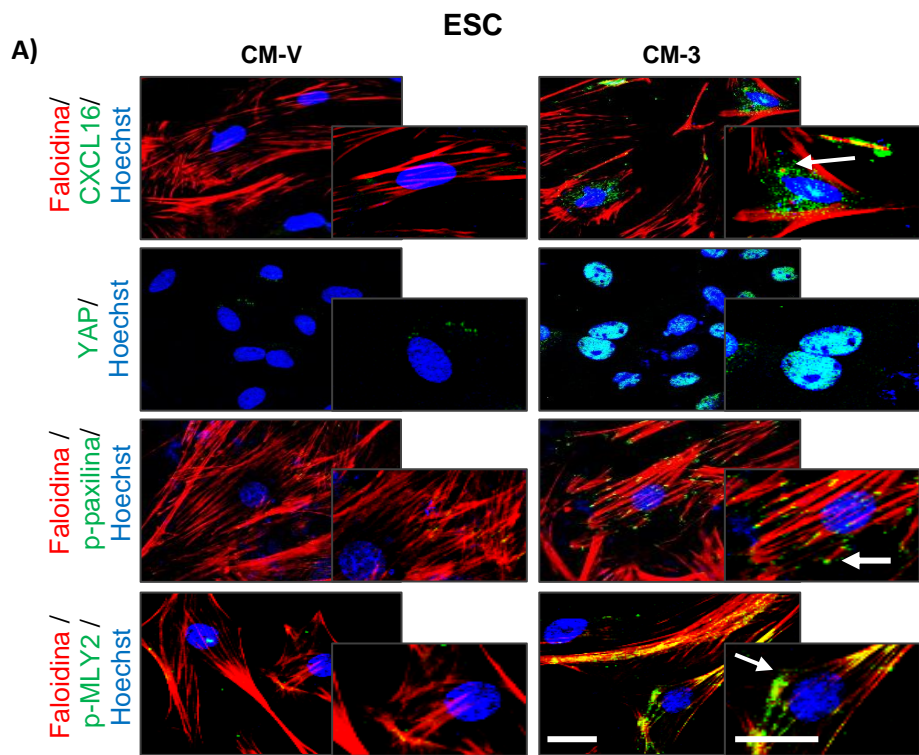




**Figura 126. La pérdida de expresión de ARID1A en células de CEE promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC y los CAF.** ESC fueron tratadas durante 48h con CM recolectado de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) (CM-3) o del vector vacío (CM-V). CAF fueron aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+). A) Histograma representativo de la RT-qPCR de los niveles de expresión de mRNA de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 en las condiciones indicadas. B) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP en condiciones indicadas. La GAPDH fue usada como control de carga. EV, vector vacío. \* P≤0,05; \*\* P≤0,01; \*\*\* P≤0,005. EV, vector vacío

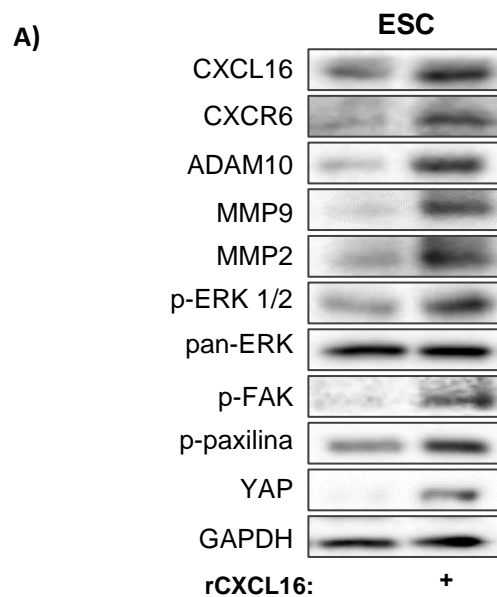
En línea con estos resultados, los ensayos de inmunofluorescencia contra CXCL16, YAP, p-paxilina (tyr118) y p-MYL2 (Ser19), demostraron que, efectivamente, tanto las células ESC tratadas con CM-3 como los CAF-f mostraban un incremento de expresión de todos estos marcadores en comparación con las ESC tratadas con CM-V o los CAF-+, respectivamente (figura 127 A). Además, las imágenes también revelaron la existencia de una acumulación nuclear de YAP, un incremento de los niveles de p-paxilina formando adhesiones focales en la membrana plasmática y una acentuada asociación de la p-MYL2 con las fibras de estrés de actina en estas células, corroborándose así la hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16 en las ESC tratadas con CM-3 y en los CAF-f, respecto a sus controles (127 A-B).





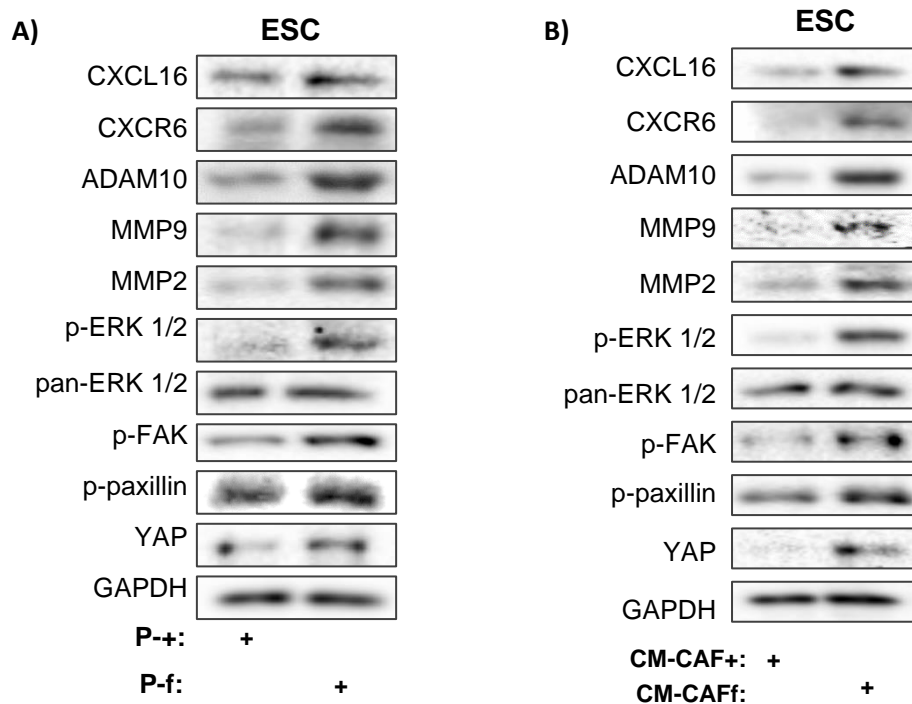
**Figura 127. La pérdida de expresión de ARID1A en células de CEE promueve cambios en la localización y expresión de CXCL16, YAP, p-paxilina y p-MLY2 en las ESC y los CAF.** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los efectores de la vía CXCR6/CXCL16, CXCL16, YAP, p-paxilina (tyr118) y p-MYL2 (Ser19) en A) ESC tratadas durante 48h con CM recolectado de células IK infectadas con lentivirus portadores de sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2 ARID1A-3) (CM-3) o del vector vacío (CM-V) y B) CAF aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (CAF-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+). C) Gráfico de la cuantificación de la intensidad de los marcadores. D) Gráfico que muestra el porcentaje de colocalización de YAP con el marcador nuclear Hoechst. La faloidina y el Hoechst fueron usados como marcadores de citoesqueleto de actina y núcleo respectivamente. Barra de escala =25µm. \*\* P≤0,01.

Asimismo, los resultados de los ensayos de western blot desvelaron un incremento de los niveles de expresión de proteína de los efectores claves del eje (CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP) en la ESC que previamente habían sido tratadas con rCXCL16, respecto a las células control sin tratar (figura 128). Demostrándose así, que la presencia de CXCL16 en el medio induce la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC.



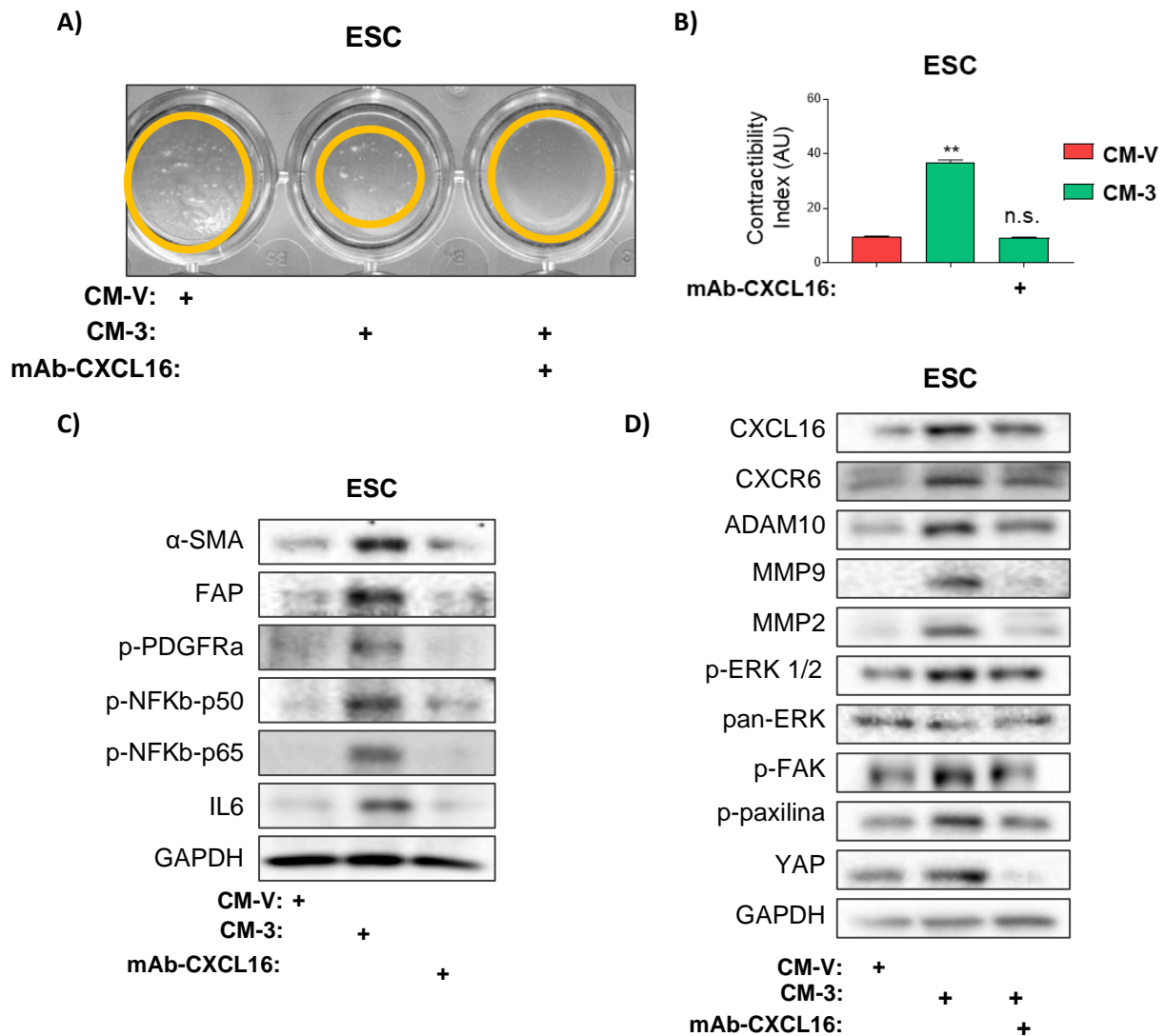
**Figura 128. La proteína CXCL16 promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC.** A) Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP en ESC previamente tratadas durante 48h con rCXCL16. La GAPDH fue usada como control de carga.

Resultados similares se obtuvieron con las ESC que habían sido tratadas con plasmas P-f, respecto a sus controles tratados con P-+ (figura 129 A), y en las ESC tratadas con CM-CAFf respecto a sus controles tratadas con CM-CAF+ (figura 129 B).



**Figura 129.** El plasma y el CM de los CAFs aislados de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* con CE promueve la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 en las ESC. Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP en ESC previamente tratadas durante 48h con A) plasma aislado de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* (P-f) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (P-+) con adenocarcinomas de endometrio, o B) con CM recolectado de CAFs previamente aislados de CE de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>f/f</sup>* (CM-CAff) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>f/f</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CM-CAF+). La GAPDH fue usada como control de carga.

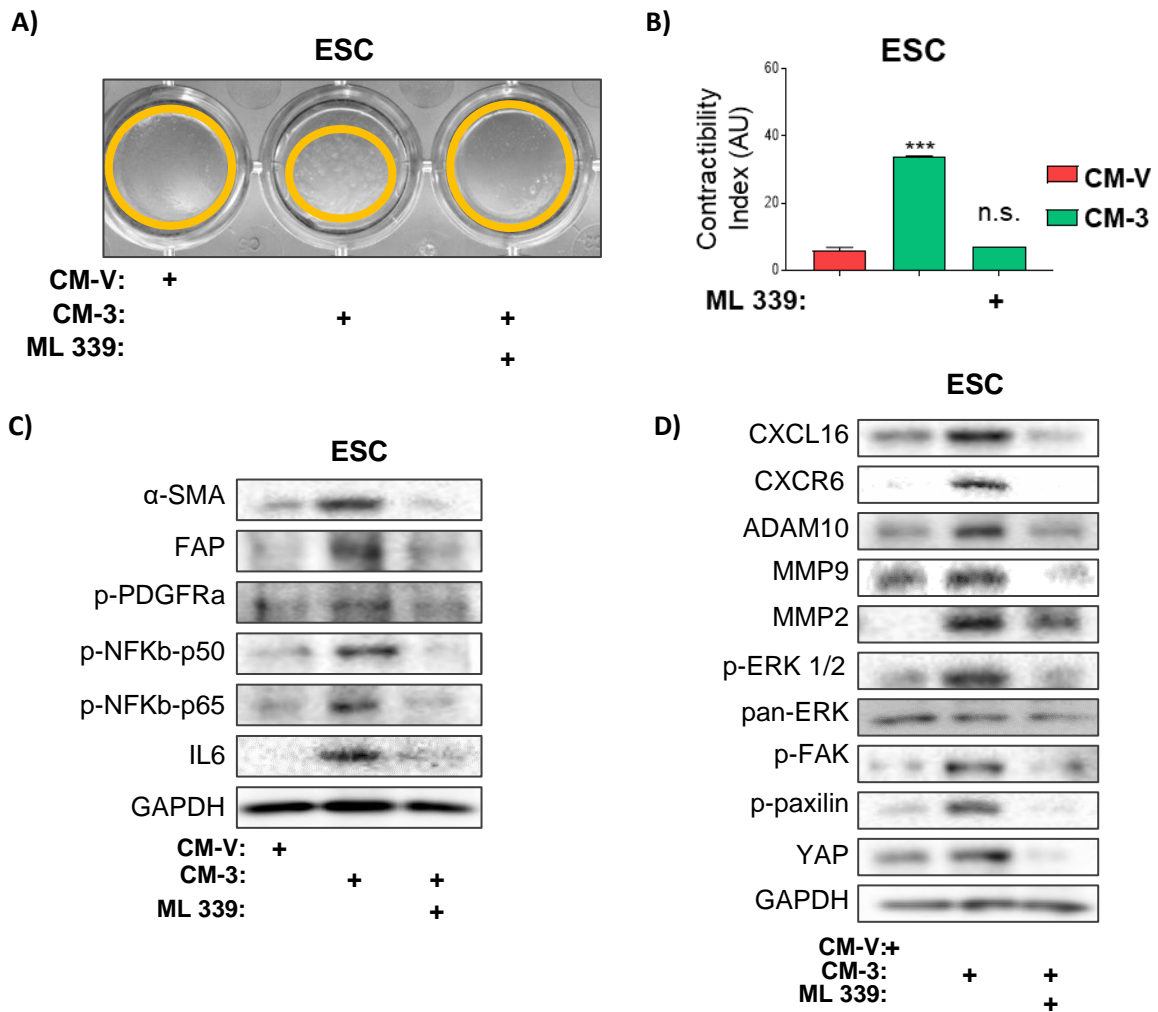
Para acabar de dilucidar si la secreción de CXCL16 por parte de las células de CE con alteraciones de ARID1A, era la responsable de la activación de las ESC, se añadió anticuerpo neutralizante contra CXCL16 en los CM procedentes de las células IK con expresión alterada de ARID1A y se analizó el impacto en la activación estromal. Como puede observarse en la figura 130 A-B, la neutralización del CXCL16 presente en el medio, revertía la capacidad de las ESC de contraer geles de colágeno inducida por los tratamientos con CM-3, reflejándose así una menor activación estromal. Además, se observó que la neutralización de la quimioquina CXCL16 en los CM-3, también revertía el efecto que estos CM provocaban en la sobreexpresión de los marcadores de activación estromal  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p-NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) e IL6, en las ESC (figura 130 C). Así mismo, se corroboró que con el bloqueo de la quimioquina CXCL16, también se revertía la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16, puesto que al añadir el anticuerpo neutralizante de CXCL16 al CM-3 se revertía la sobreexpresión de los principales efectores de dicha vía (CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP), inducida tras los tratamientos con CM-3 en las ESC (figura 130 C).



**Figura 130. La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte la activación de las ESC promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A.** ESC fueron tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3), en presencia o no de anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) durante 48h. A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por ESC previamente expuestas a los tratamientos indicados y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p- NFκβ-p65 (Ser536) e IL6. D) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*  $P \leq 0,01$ .

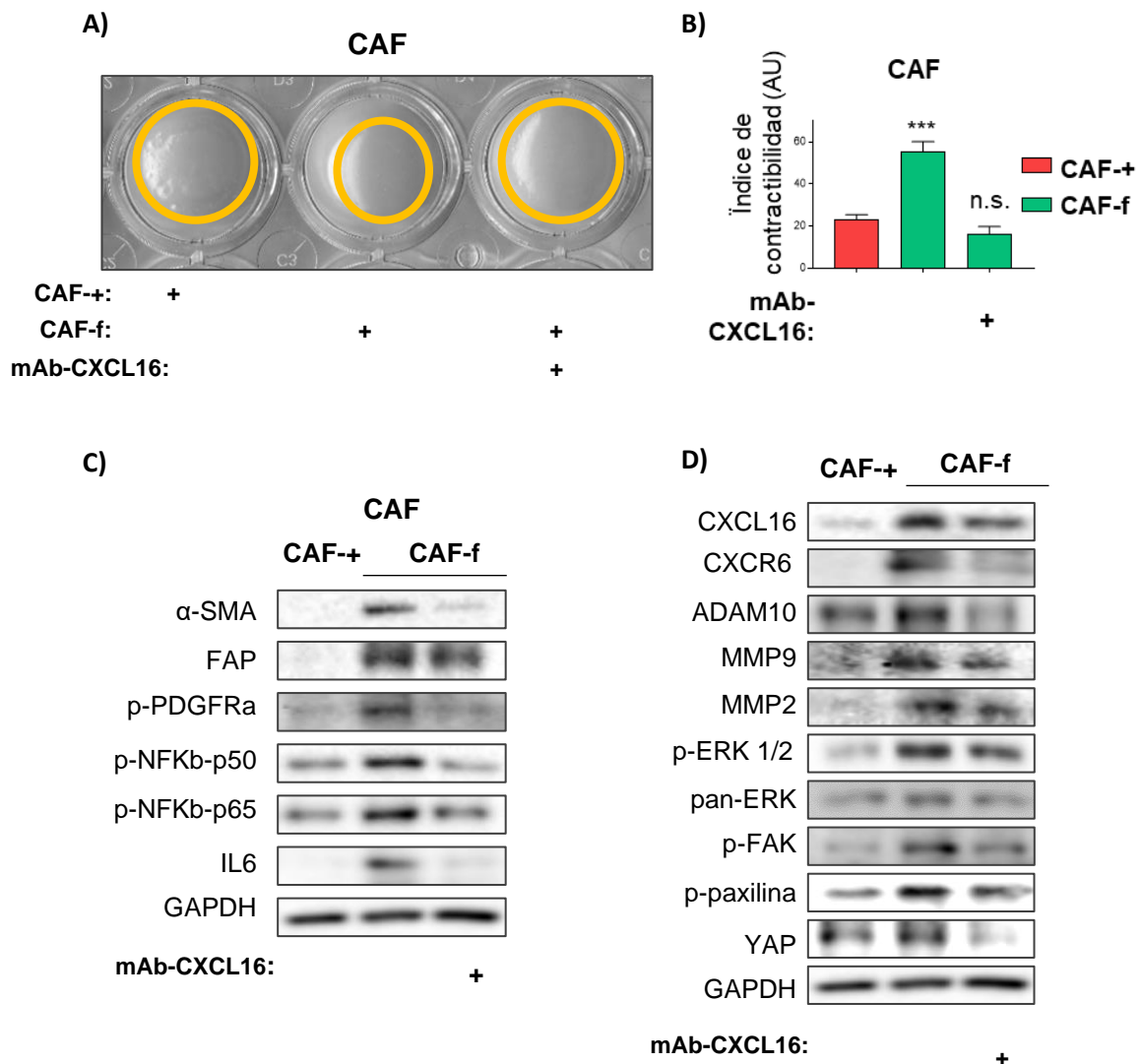
Finalmente, estos mismos experimentos se replicaron, pero bloqueando la actividad del receptor CXCR6 mediante la adición del inhibidor farmacológico selectivo para CXCR6, ML339. Los resultados revelaron que la inhibición de CXCR6 también revertía los efectos que el CM-3 promovía en las ESC, disminuyendo la capacidad de contraer geles de colágeno (figura 131 A-B)

y reduciendo la expresión de los marcadores de activación estromal  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p-NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) e IL6 (figura 131 C). De nuevo, se corroboró que con la inhibición del receptor CXCR6, se revertía la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16 inducida por los tratamientos con CM-3. Ensayos de western blot revelaron que la adición del inhibidor ML-339, revertía la sobreexpresión de los principales efectores de la vía CXCR6/CXCL16 (CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP), que se daba tras los tratamientos con CM-3 (figura 131 D).



**Figura 131. La inhibición de CXCR6 revierte la activación de las ESC promovida por las células de CEE con pérdida de ARID1A.** ESC fueron tratadas con medios condicionados (CM) recolectados de células IK infectadas con el EV (CM-V) o con el sgRNA contra *ARID1A* (lentiCRISPRv2-ARID1A-3) (CM-3) en presencia o no del inhibidor farmacológico de CXCR6 (ML 339) (140ng/ml) durante 48h. A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por ESC previamente expuestas a los tratamientos indicados y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p-NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) e IL6. D) Imágenes representativas del análisis por westernblot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*\*  $P \leq 0,005$ .

De acuerdo con estos resultados, se decidió evaluar el efecto que podría generar la inhibición del eje CXCR6/CXCL16 en los CAF aislados de los adenocarcinomas endometriales de los ratones *Cre:ER<sup>T</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*. Para ello, en primer lugar, se trataron los CAF-f con anticuerpo neutralizante de CXCL16, y se evaluó el impacto que dicho bloqueo inducía en sus capacidades para contraer los geles de colágeno. Como puede apreciarse en la figura 132 A-B, la neutralización de la quimioquina CXCL16, revertía la incrementada capacidad que los CAF-f presentaban, respecto a los CAF-+, de contraer los geles de colágeno. De modo similar, cuando se evaluó el estado de expresión de los marcadores típicos de los fenotipos CAF ( $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NFK $\beta$ -p50 (Ser337), p-NFK $\beta$ -p65 (Ser536) e IL6), se observó que estos se encontraban disminuidos en los CAF-f que habían estado en contacto con el anticuerpo neutralizante de CXCL16 (figura 132 C). Por último, se ratificó la disminución de la activación de la vía CXCR6/CXCL16 tras los tratamientos con el mAb-CXCL16, mediante la realización de ensayos de western blot contra CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP (figura 132 D).

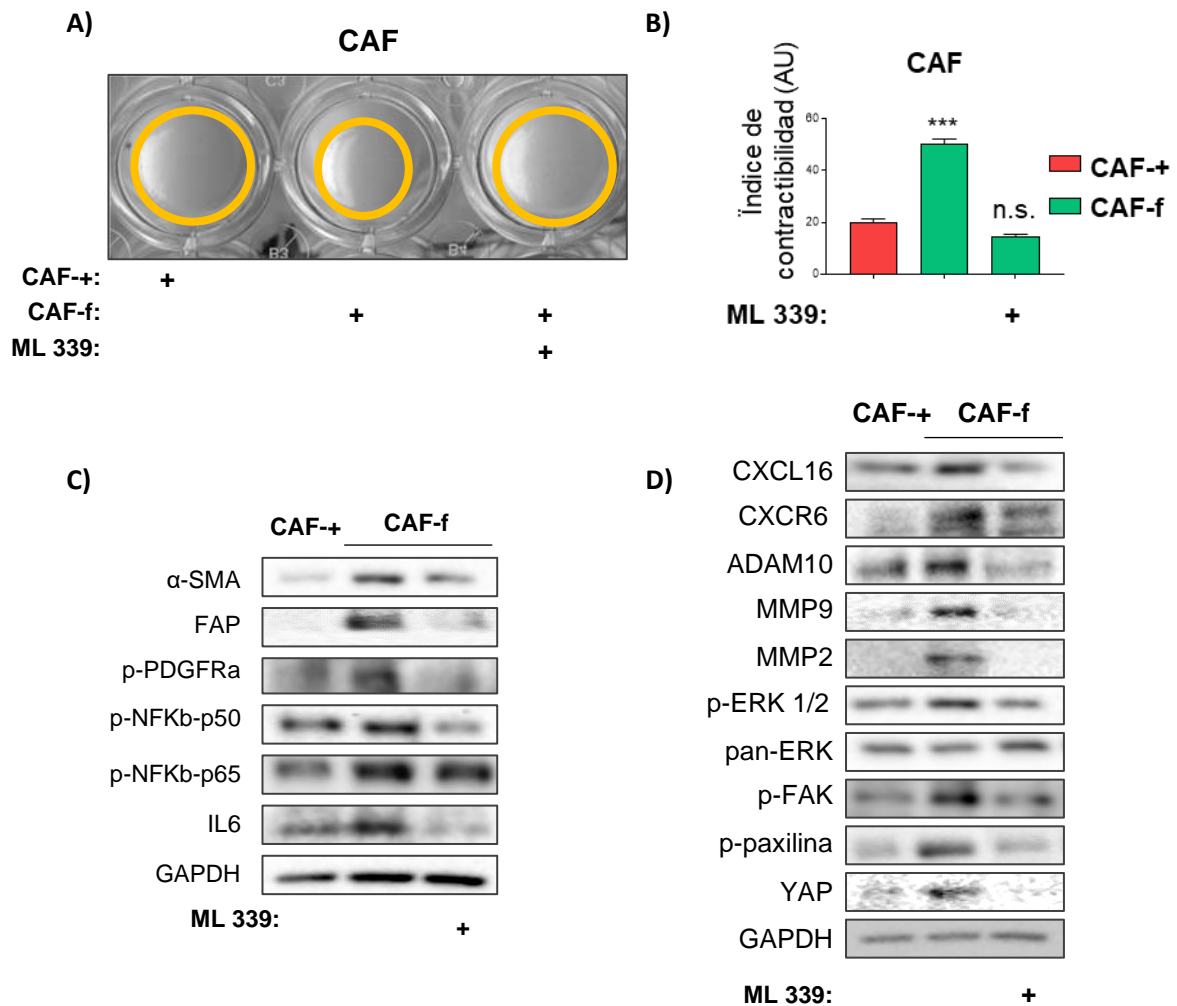


**Figura 132.** La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revertió el incrementado fenotipo CAF que presentan los CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T</sup>+/-; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*. CAFs



fueron aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>fl/fl</sup>* (CAF-f) o *Cre:ER<sup>T+/+</sup>; Pten<sup>fl/fl</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+), y fueron tratados o no con anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) durante 48h. A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por CAFs previamente expuestos a los tratamientos indicados y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p- NFκβ-p65 (Ser536) e IL6. D) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. n.s. (no significativo, P≥0,05); \*\*\* P≤0,005.

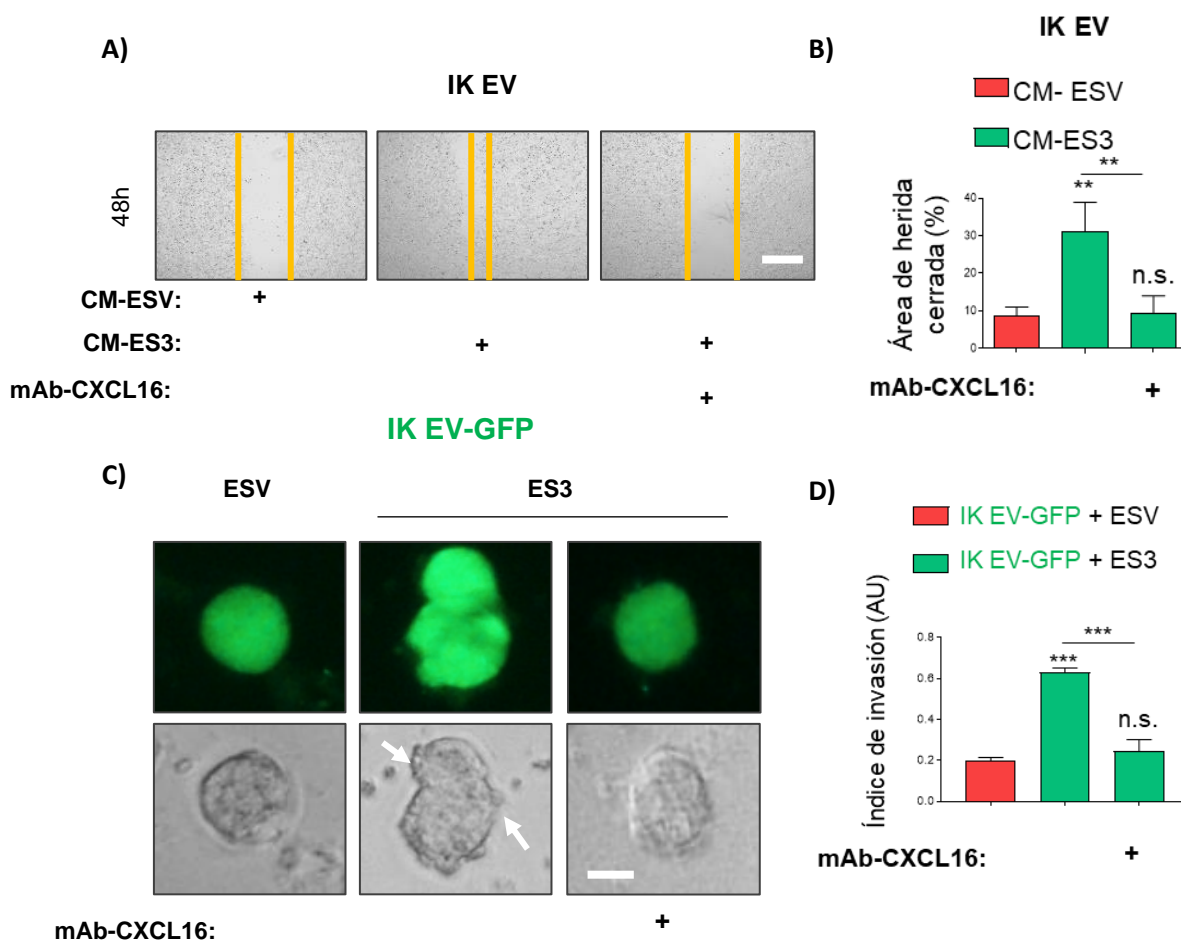
Después, se decidió evaluar si estos mismos resultados se replicaban del mismo modo, al realizar la inhibición farmacológica del receptor CXCR6. Los resultados mostraron que, efectivamente, los CAF-f que habían sido tratados con ML339, presentaban una menor capacidad de contracción de los geles de colágeno en comparación con los que no lo habían sido (figura 133 A-B), así como una expresión reducida de marcadores de activación estromal típicos del fenotipo CAF (α-SMA, FAP, p-PDGFRα (Tyr754), p-NFκβ-p50 (Ser337), p- NFκβ-p65 (Ser536) e IL6) (figura 133 C). Finalmente, el análisis de los niveles de expresión de proteína de CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP, mediante western blot, confirmó la bajada de activación del eje CXCR6/CXCL16 tras los tratamientos con el ML-339 (figura 133 D). Estos resultados sugieren la existencia de una auto retroalimentación positiva del eje CXCR6/CXCL16, en los CAF-f.





**Figura 133. La inhibición del receptor CXCR6 revierte el incrementado fenotipo CAF que presentan los CAFs aislados de CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*. CAF fueron aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF-+) y fueron tratados o no con inhibidor farmacológico de CXCR6 (ML 339) (140ng/ml) durante 48h. A) Imágenes representativas de geles de colágeno remodelados por CAFs previamente expuestos a los tratamientos indicados y B) histograma representativo de la cuantificación del índice de contractibilidad. C) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA, FAP, p-PDGFR $\alpha$  (Tyr754), p-NF $\kappa$ B-p50 (Ser337), p- NF $\kappa$ B-p65 (Ser536) e IL6. D) Imágenes representativas del análisis por western blot de los niveles de expresión CXCL16, CXCR6, ADAM10, MMP9, MMP2, p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-FAK (Tyr397), p-paxilina (Tyr118) y YAP. La GAPDH fue usada como control de carga. n.s. (no significativo, P $\geq$ 0,05); \*\*\* P $\leq$ 0,005.**

De acuerdo con los resultados obtenidos, ensayos de migración de wound healing (figura 134 A-B) y de invasión de cultivos 3D (figura 134 C-D), mostraron que la inhibición del eje CXCR6/CXCL16 con el anticuerpo neutralizante de CXCL16, también revertía la incrementada capacidad pro-tumorigénica observada en las ESC tratadas con CM-3. Observándose así, que los tratamientos con mAb-CXCL16 conducían a una disminución de las capacidades migratorias e invasivas promovidas por los CM de las células estromales previamente tratadas con CM-3 (CM-ES3), en las células tumorales con expresión salvaje de ARID1A.

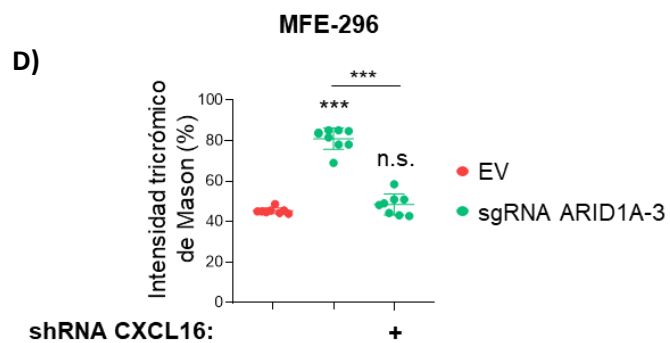
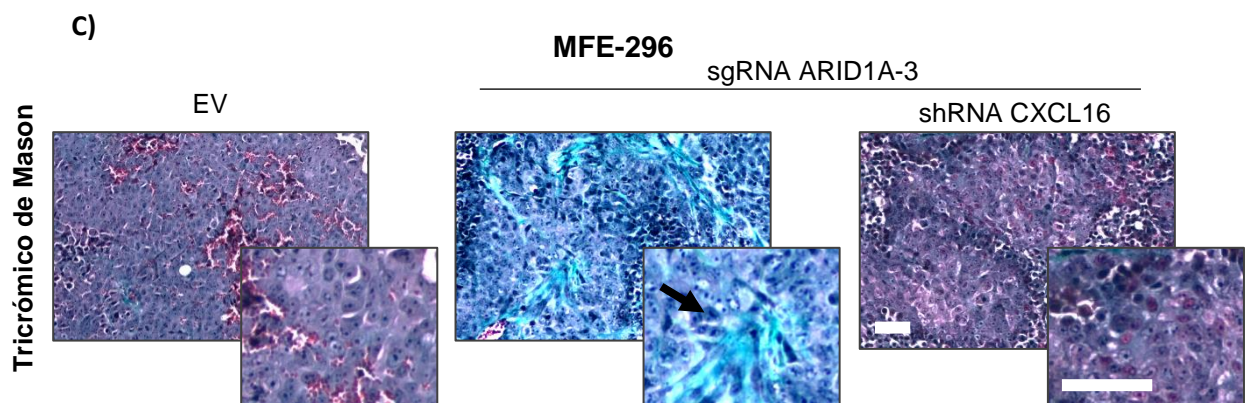
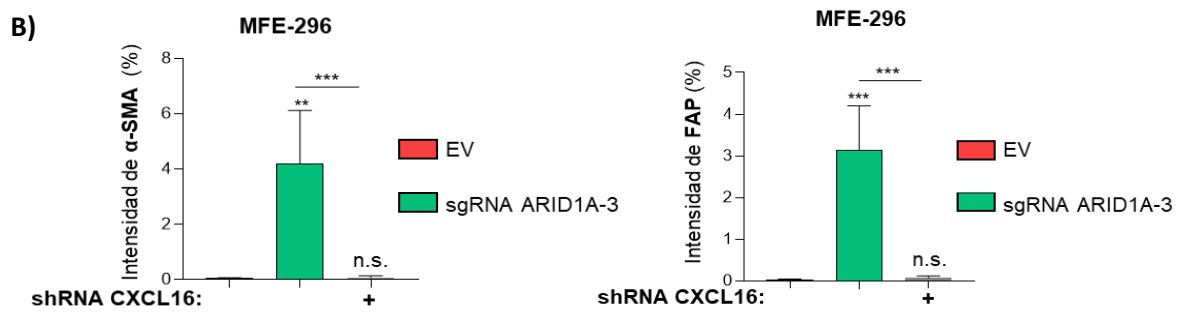
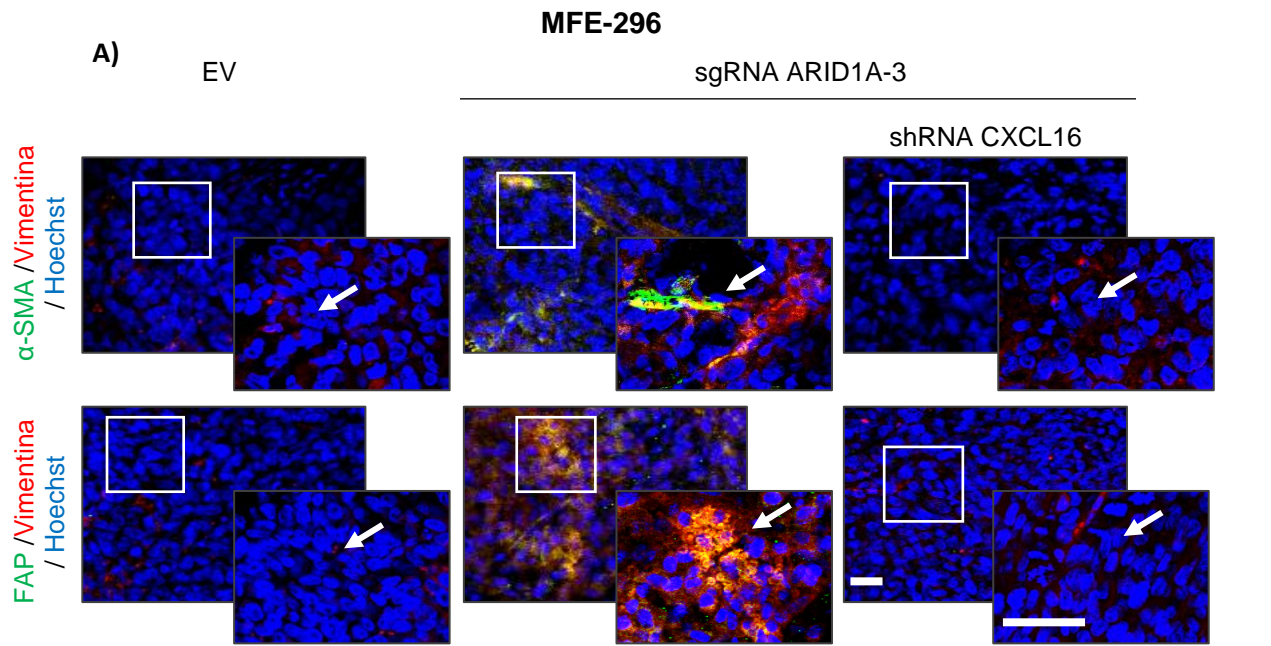




**Figura 135. La neutralización de la quimioquina CXCL16 secretada revierte las habilidades pro-tumorigénicas que poseen los CAFs aislados de los CE de los ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*.**

A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK EV tratadas durante 48h con CM recolectados de CAF aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CM-CAF+) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CM-CAFf) tratados o no con anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100 µm. C) Imágenes representativas de contraste de fases de cultivos 3D e inmunofluorescencia contra GFP de células IK infectadas con EV y GFP (IK EV-GFP) co-cultivadas con CAF aislados de adenocarcinomas endometriales de ratones *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>+/+</sup>* (CAF+) o *Cre:ER<sup>T+/-</sup>; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>* (CAF-f), en presencia o no del anticuerpo neutralizante de CXCL16 (mAb-CXCL16) (8 µg/ml) y D) cuantificación del índice de invasión de estas glándulas en el Matrigel. Barra de escala: 25 µm. n.s. (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,005$ . AU, unidad arbitraria. EV, vector vacío.

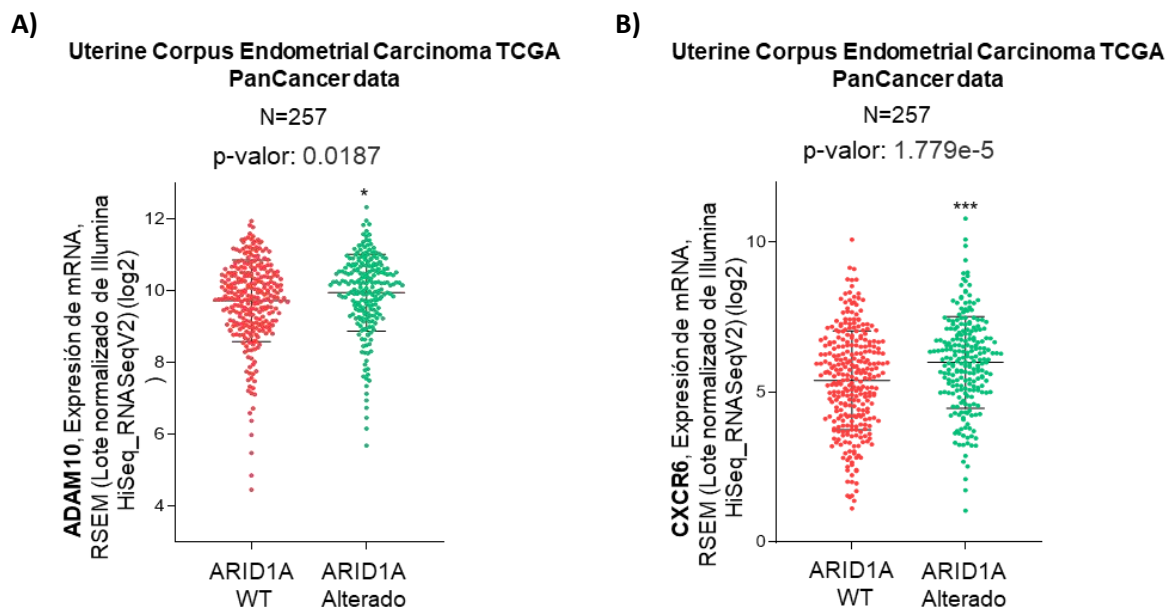
Con el fin de corroborar si estos resultados se reproducían *in vivo*, se decidió analizar por medio de ensayos de inmunofluorescencia el estado de expresión de los marcadores de actividad estromal típicos del fenotipo CAF ( $\alpha$ -SMA y FAP), en los tumores subcutáneos de los ratones del experimento de la figura 122. Los resultados mostraron que, aquellos tumores que estaban formados por células de CE MFE-296 sgRNA ARID1A-3 infectadas con shRNA contra CXCL16, expresaban menores niveles tanto de  $\alpha$ -SMA como de FAP, respecto de los que estaban formados por células MFE sgRNA ARID1A-3 con expresión salvaje de CXCL16 (figura 136 A-B). En concordancia con estos resultados, al analizar los niveles de deposición del colágeno fibrilar tumoral mediante la tinción tricrómica de Mason, se apreció que aquellos tumores constituidos por células MFE-296 con alteraciones en la expresión tanto de ARID1A como de CXCL16, presentaban una menor deposición de colágeno fibrilar tumoral respecto de aquellos tumores constituidos por células MFE-296 sgRNA ARID1A-3, que presentaban una expresión salvaje de CXCL16 (figura 136 C-D). Estos resultados, en conjunto, sugieren que las células tumorales de CE con pérdida de ARID1A promueven el reclutamiento y activación de las ESC, generando tumores más reactivos, a través de CXCL16.



**Figura 136. La disminución de los niveles de expresión de CXCL16 revierte las capacidades de las células de CEE con pérdida de expresión de ARID1A de promover el reclutamiento y la activación estromal en tumores subcutáneos *in vivo*.** Células MFE-296 con expresión salvaje de ARID1A, o con expresión alterada de ARID1A infectadas con partículas lentivirales que contienen shRNA-CXCL16 o control, fueron inyectadas subcutáneamente y se dejaron crecer durante 3 semanas. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra  $\alpha$ -SMA y FAP en secciones consecutivas de los tumores subcutáneos indicados y B) cuantificación de los niveles de expresión. La vimentina y el Hoechst fueron usadas como marcadores de fibroblastos y núcleo respectivamente. Barra de escala= 100 $\mu$ m. C) Imágenes representativas de tinción tricrómica de Mason en secciones consecutivas de los tumores subcutáneos indicados y B) cuantificación de los niveles de expresión. Barra de escala= 100 $\mu$ m. n.s (no significativo,  $P \geq 0,05$ ); \*\*  $P \leq 0,01$  \*\*\*  $P \leq 0,001$ . EV, vector vacío.

#### **2.4. Análisis del efecto de la activación del eje CXCR6/CXCL16 en muestras de pacientes con CE endometriode con expresión de ARID1A alterada.**

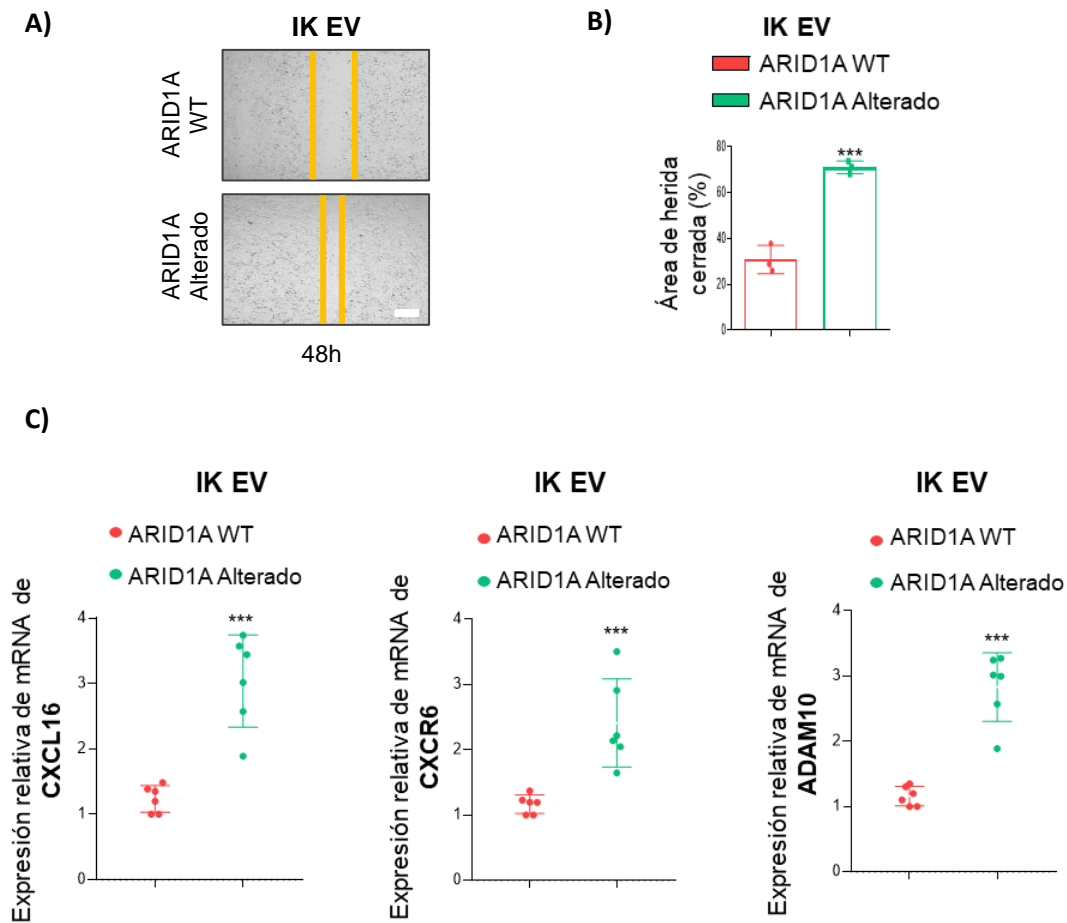
Finalmente, se puso como objetivo examinar si los cambios observados inducidos por CXCL16 en el microambiente tumoral de nuestras líneas celulares y modelos murinos de CE, se replicaban en muestras de pacientes con CE con expresión alterada de ARID1A. Con este propósito, lo primero de todo, se realizó un análisis bioinformático de la base de CE TCGA\_UCEC. Específicamente, y en base a las observaciones de que las mutaciones de *ARID1A* se encuentran mayoritariamente enriquecidas en los tumores endometriales de tipo I, el análisis se focalizó en los tumores de histología endometriode. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de un incremento significativo tanto de la expresión de *CXCR6* (figura 137 A) como de la de *ADAM10* (figura 137 B) (dos de los más importantes efectores de la vía CXCR6/CXCL16<sup>113,114</sup>) en los tumores endometriales con expresión alterada de ARID1A en comparación a los que tenían la expresión de ARID1A conservada.



**Figura 137. Los tumores de CEE humano con alteraciones de ARID1A, presentan mayores niveles de expresión de mRNA de CXCR6 y ADAM10.** A) Gráficos representativos de los niveles normalizados de expresión de mRNA de CXCR6 y ADAM10 en muestras de CEE humanas con expresión alterada o salvaje de ARID1A. Los datos y el análisis fueron obtenidos de la plataforma web cBioportal, a partir de la base de datos TCGA\_UCEC; n=257. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . WT, salvaje.

Con tal de indagar más en esta hipótesis, células humanas de CEE IK, con expresión salvaje de ARID1A, fueron tratadas con muestras de aspirados uterinos procedentes de pacientes con CEE con expresión alterada o conservada de ARID1A. Primero, se decidió evaluar los efectos que estos tratamientos habían podido causar en las capacidades migratorias e invasivas de dichas células. Los ensayos de migración de wound healing (figura 138 A-B), demostraron que los aspirados uterinos procedentes de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A, promovían en las células IK EV las capacidades migratorias, en comparación con los tratamientos con aspirados uterinos de pacientes con CEE con expresión salvaje de ARID1A. Además, ensayos de RT-qPCR contra CXCL16, CXCR6 y ADAM10 corroboraron que este incremento de las capacidades migratorias iba acompañado de una mayor activación de la vía CXCR6/CXCL16, observándose una mayor expresión de los tres marcadores en las células IK tratadas con aspirados uterinos de pacientes con expresión alterada de ARID1A, en comparación con sus controles (figura 138 C).



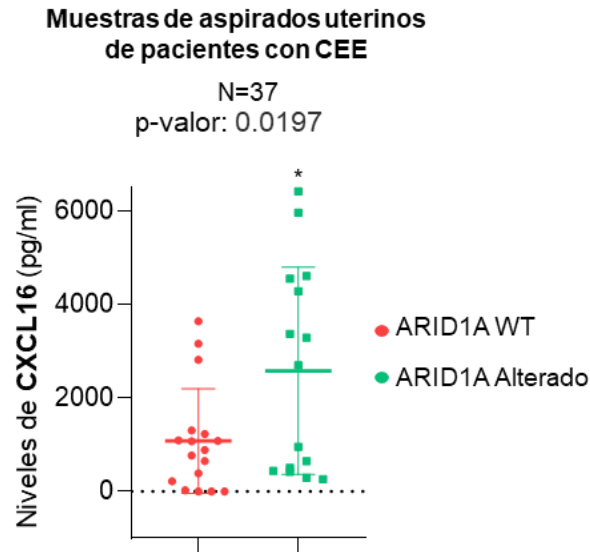


**Figura 138.** Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A promueven la migración y la activación del eje CXCR6/CXCL16 en las células de CEE con expresión conservada de ARID1A. A) Imágenes representativas a tiempo 0 y 48 horas después de la herida del ensayo de wound healing llevado a cabo en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas con aspirados uterinos de pacientes con CEE con expresión alterada (n=3) o conservada (n=3) de ARID1A y B) la cuantificación del porcentaje de herida cerrada transcurridas las 48 horas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. C) Imágenes representativas del análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 en células IK infectadas con lentivirus portadores del vector vacío tratadas durante 48h con aspirados uterinos de pacientes con CEE con expresión alterada (n=6) o conservada (n=6) de ARID1A. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . WT, salvaje. EV, vector vacío.

Para corroborar que efectivamente la pérdida de ARID1A causaba un incremento de los niveles de CXCL16 en las pacientes con CEE, se decidió evaluar por medio de un ensayo Elisa los niveles de CXCL16 que se encontraban secretados en muestras de aspirados uterinos procedentes de pacientes con CEE con expresión alterada o conservada de ARID1A. Como puede apreciarse en la figura 139, los resultados mostraron que los niveles de CXCL16 se encontraban significativamente incrementados en las muestras de los pacientes con alteraciones en la expresión de ARID1A respecto a los pacientes con expresión salvaje de ARID1A.

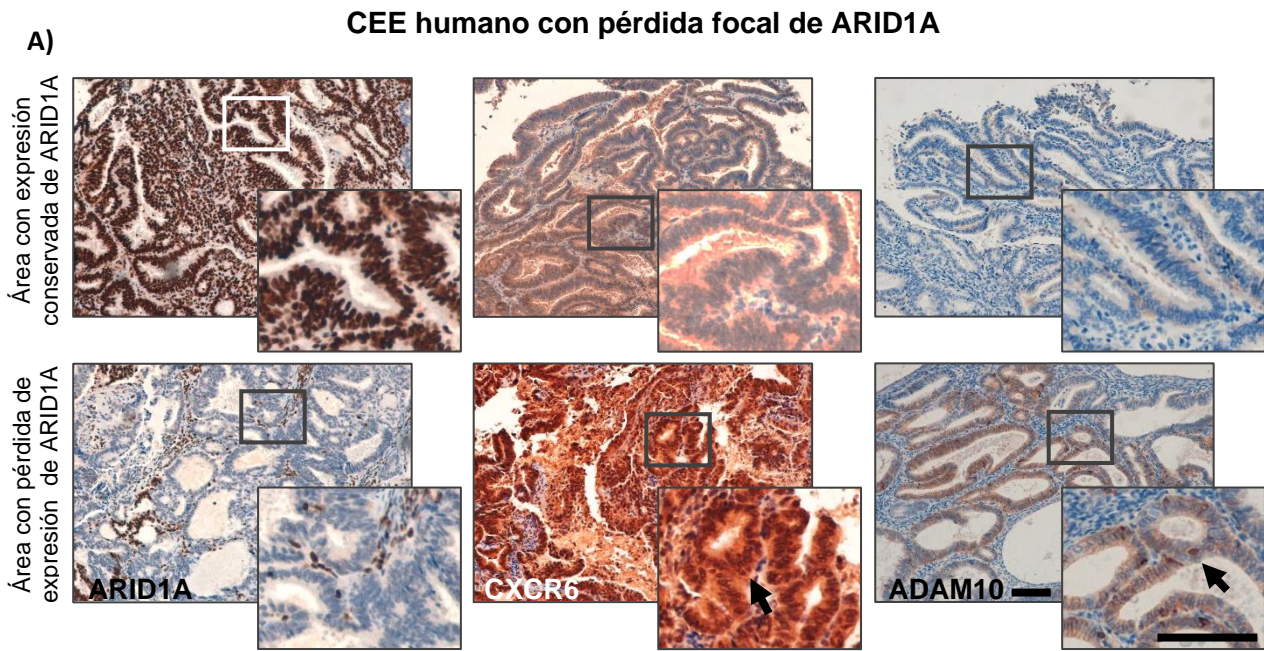


A)

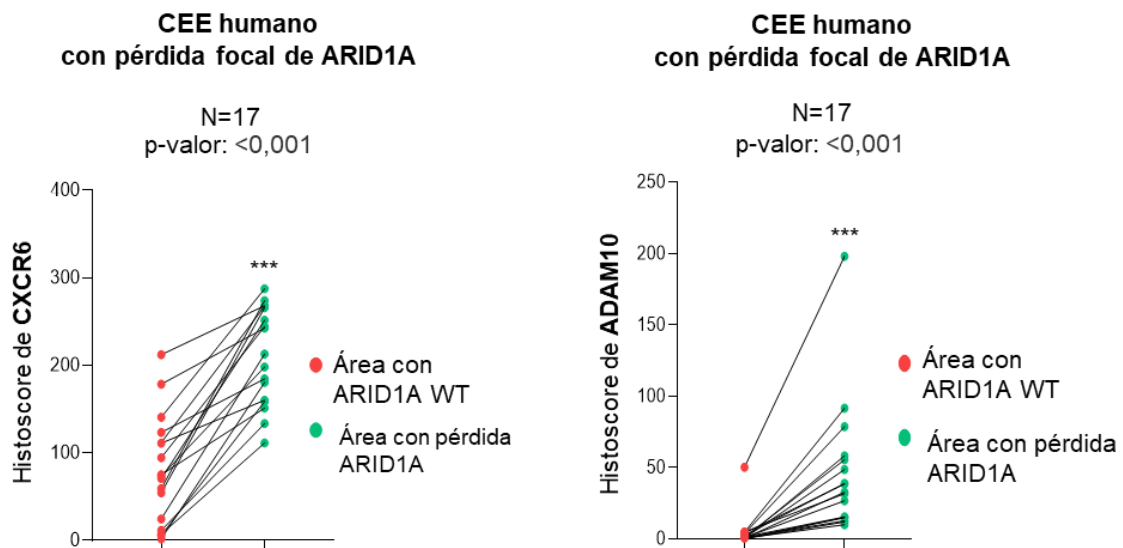


**Figura 139. Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A poseen mayores niveles de CXCL16.** A) Gráficos representativos de los niveles de CXCL16 presente en muestras de aspirados uterinos de pacientes con CEE con expresión alterada o salvaje de ARID1A. n=37. \*  $P \leq 0,05$ ; WT, salvaje.

Finalmente, con el fin de validar estos resultados, se decidió evaluar mediante la realización de tinciones de inmunohistoquímica los niveles de expresión de CXCR6 y ADAM10 en muestras de 17 pacientes con CEE que presentaban áreas con pérdidas focales de ARID1A. Se observó que en las áreas con pérdidas focales de expresión de ARID1A, existían niveles de tinción de CXCR6 y ADAM10 significativamente más elevados que en aquellas áreas del mismo tumor, en las que la expresión de ARID1A se mantenía intacta (figura 140). Estos resultados demostraban, una vez más, que la pérdida de ARID1A promueve el incremento de los niveles de CXCL16 a través de la sobre activación de la vía CXCR6/CXCL16.



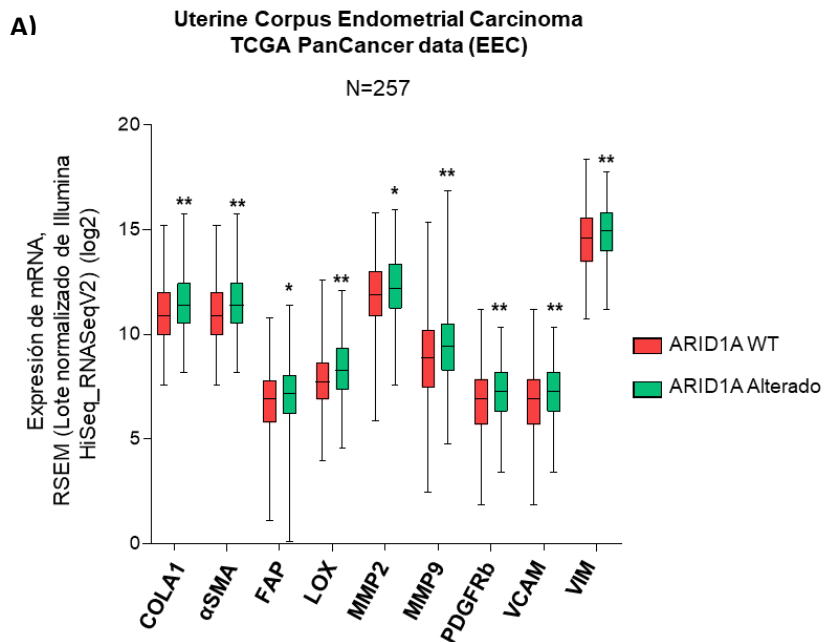
**B)**



**Figura 140. Los niveles de CXCR6 y ADAM10 se encuentra incrementados en las áreas de tumores de CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A.** A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra CXCR6 y ADAM10 en secciones consecutivas de úteros de pacientes con CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A y B) cuantificación de los niveles de expresión en el área con expresión conservada de ARID1A, respecto al área con pérdida focal de ARID1A. Barra de escala= 100µm. n= 17. \*\*\* P≤0,001. WT, salvaje.

Además, en paralelo a todos estos resultados, se decidió realizar de nuevo un análisis bioinformático de la base de datos de CE humano TCGA\_UCEC, pero esta vez analizando el estado de la expresión de mRNA de varios marcadores típicos de activación estromal, focalizando dicho análisis de nuevo en los tumores endometriales con histología endometriode. Los resultados del análisis revelaron que los casos de CEE con alteraciones en la expresión de

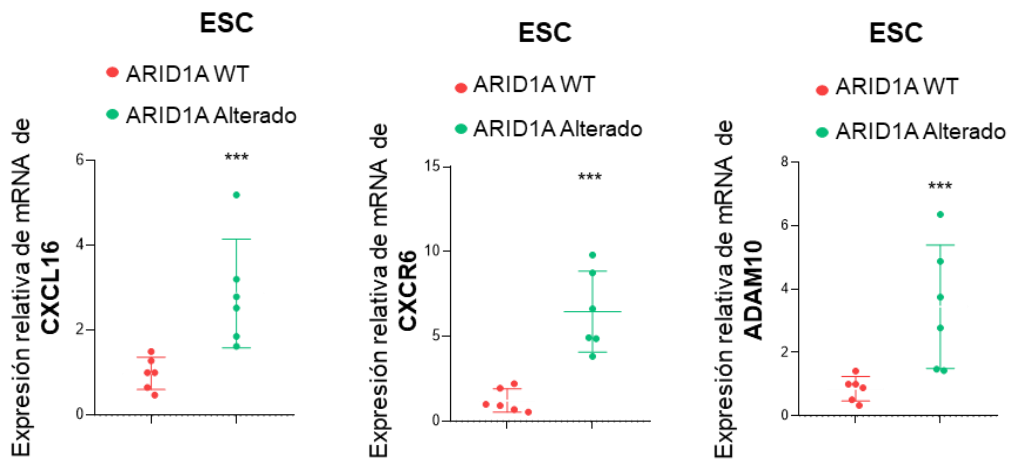
ARID1A expresaban, de manera significativa, mayores niveles de los marcadores típicos de activación estromal, COL1A,  $\alpha$ SMA, FAP, LOX, MMP2, MMP9, PDGFRa, VCAM y VIM, respecto a aquellos casos de CEE con expresión conservada de ARID1A (figura 141).



**Figura 141. Los tumores de CEE humano con alteraciones de ARID1A, presentan mayores niveles de expresión de mRNA de marcadores de activación estromal.** A) Gráficos representativos de los niveles normalizados de expresión de mRNA de COL1A,  $\alpha$ SMA, FAP, LOX, MMP2, MMP9, PDGFRa, VCAM y VIM, en muestras de CEE humanas con expresión alterada o salvaje de ARID1A. Los datos y el análisis fueron obtenidos de la plataforma web cBioportal, a partir de la base de datos TCGA\_UCEC; n=257. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ . WT, salvaje.

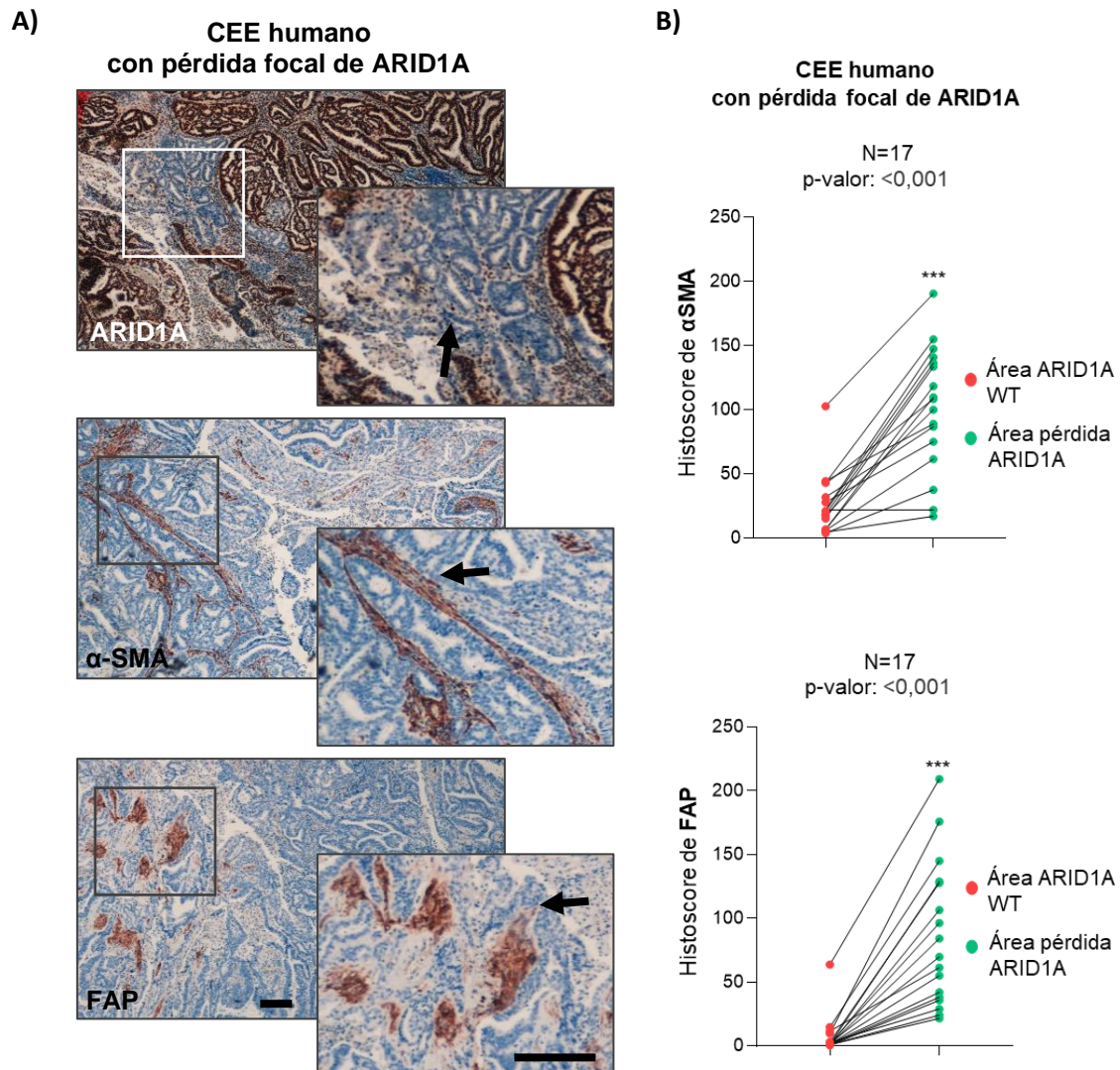
Dada la demostrada implicación de la pérdida de ARID1A en las células de CE, en la activación de las ESC a través de la señalización por CXCL16, se decidió analizar si el observado incremento de CXCL16 en los aspirados uterinos de las pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A era capaz de producir la activación del eje CXCR6/CXCL16 en las ESC. Ensayos de RT-qPCR mostraron que las ESC que habían sido tratadas con aspirados uterinos de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A poseían una mayor expresión de los efectores principales del eje CXCR6/CXCL16 (CXCL16, CXCR6 y ADAM10) respecto a los que habían sido tratados con los aspirados procedentes de pacientes con CEE con expresión conservada de ARID1A (figura 142).

A)



**Figura 142. Las muestras de aspirados uterino de pacientes con CEE con alteraciones de ARID1A promueven activación del eje CXCR6/CXCL16 en ESC.** A) Imágenes representativas del análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10 en ESC, tratadas durante 48h con aspirados uterinos de pacientes con CEE con expresión alterada (n=6) o conservada (n=6) de ARID1A. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . WT, salvaje. EV, vector vacío.

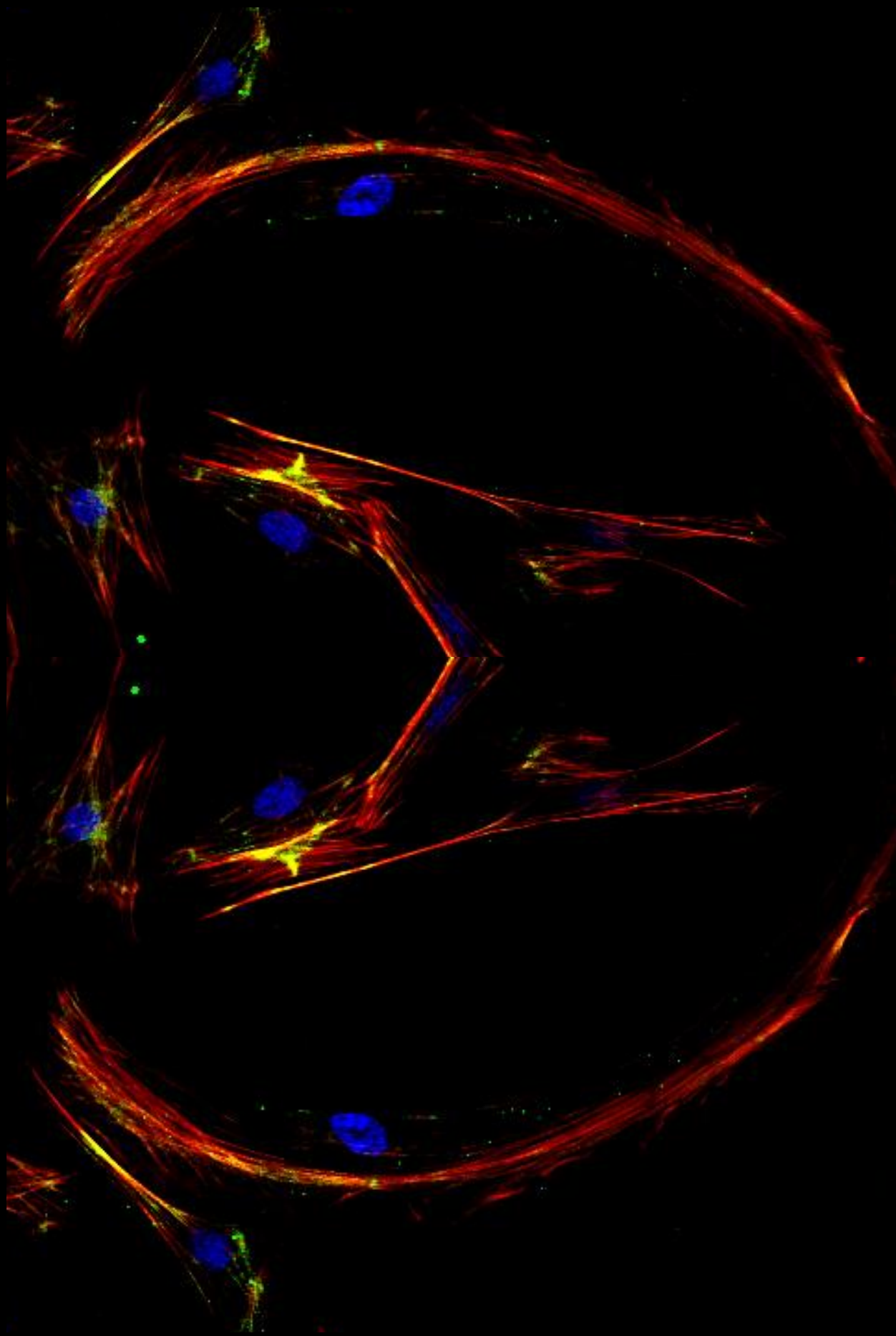
Para finalizar, se realizaron análisis por inmunohistoquímica de los marcadores típicos de fenotipos CAF,  $\alpha$ -SMA y FAP, en las 17 muestras de CEE humanas con pérdida focal de expresión de ARID1A. Los resultados mostraron que aquellas áreas donde se producía la pérdida focal de expresión de ARID1A, estaban asociadas con niveles de expresión significativamente más elevados de FAP y  $\alpha$ -SMA, ratificando la asociación entre la pérdida de ARID1A y la activación estromal y aparición de fenotipos CAF en las pacientes con CEE (figura 143).



**Figura 143. Los niveles de  $\alpha$ -SMA y FAP se encuentran incrementados en las áreas de tumores de CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A.** A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra  $\alpha$ -SMA y FAP en secciones consecutivas de úteros de pacientes con CEE con pérdida focal de expresión de ARID1A y B) cuantificación de los niveles de expresión en el área con expresión conservada de ARID1A, respecto al área con pérdida focal de ARID1A. Barra de escala= 100 $\mu$ m. n= 23. WT, salvaje.









## 5. DISCUSIÓN

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”*

**Marie Curie**



## 5.1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE ARID1A EN EL INICIO Y LA PROGRESIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO.

ARID1A se encuentra mutado con elevada frecuencia en un amplio espectro de tumores, encontrándose una especial incidencia mutagénica en tumores de ovario y endometrio<sup>83</sup>. Estas mutaciones en general conducen a la pérdida de función de la proteína y se ha demostrado que tienen un gran impacto en numerosas vías de señalización importantes para los procesos de oncogénesis, por lo que ha sido postulado como un gen supresor tumoral<sup>80,83,87</sup>. Sin embargo, recientes investigaciones han identificado un papel más complejo para ARID1A dentro del proceso de la tumorigénesis, jugando diversas funciones específicas en función del contexto en el que se encuentre<sup>80</sup>.

Pese que algunos estudios han descrito que ARID1A puede actuar como gen driver en algunas neoplasias como la de colon<sup>155</sup> o pancreas<sup>156</sup>, nuestro estudio revela que la depleción de ARID1A no es suficiente *per se* para iniciar la tumorigénesis endometrial. El análisis de la pérdida de ARID1A en un contexto normal de epitelio endometrial fue evaluado tanto *in vitro*, con cultivos 3D de células epiteliales en las que se había inducido la pérdida de ARID1A, como *in vivo*, mediante el empleo de ratones *Cre:ERT; Arid1a<sup>f/+</sup>* o *Cre:ERT; Arid1a<sup>ff</sup>*, y en ninguno de los casos fueron observadas grandes diferencias en términos de las ratios de proliferación celular, la expresión de las diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular o cambios a nivel histológico. Estos resultados corroboran varios recientes estudios realizados en carcinomas de ovario<sup>157</sup>, hígado<sup>90</sup> o de células escamosas<sup>158</sup>, en los la pérdida de *Arid1a* es analizada en diversos modelos murinos. Dichos estudios revelan que la capacidad de ARID1A para la promoción del desarrollo de la tumorigénesis, necesita la presencia de mutaciones adicionales simultáneas que colaboren con la inactivación de *Arid1a* en la transformación neoplásica. De hecho, se ha visto que en el caso de la endometriosis (una enfermedad en el tejido endometrial inflamatoria y hormono dependiente), las fracciones de endometrio con endometriosis presentan recurrentes alteraciones de ARID1A en comparación con el epitelio sano. Teniendo en cuenta el hecho de que muy rara vez la endometriosis progresa a cáncer, estos resultados ponen de nuevo de manifiesto que las alteraciones de ARID1A podrían no ser suficientes para conducir a la transformación neoplásica<sup>97</sup>. Por ello no es de extrañar el hecho de que haya sido reportado que las mutaciones de ARID1A suelen ir frecuentemente ligadas a mutaciones en PTEN o PIK3CA, en varios tipos de tumores humanos<sup>157</sup>. Algunos estudios incluso van más allá, postulando que, en estados tempranos de la tumorigénesis y bajo condiciones específicas, ARID1A podría incluso tener una función pro-tumorigénica, promoviendo el crecimiento tumoral<sup>80</sup> (suceso que en nuestro estudio este suceso no ha sido observado). Por ejemplo, Zhai Y et al. describieron en modelos murinos transgénicos, que en estadios tempranos de la formación tumoral y bajo la inactivación de *Pten* y *Apc*, la pérdida de *Arid1a* retrasaba la aparición de cáncer de ovario<sup>93</sup>. Más recientemente, un estudio de Sun et al. demostró, en múltiples modelos murinos de carcinoma hepático, la existencia de un papel pro-tumoral durante las fases más iniciales de la transformación maligna<sup>90</sup>. Todo ello sugiere que ARID1A podría tener un rol oncogénico dependiente de contexto, y subraya la importancia de considerar el contexto de dosis, estado y tejido a la hora de evaluar la función de ARID1A y contemplar una opción terapéutica.

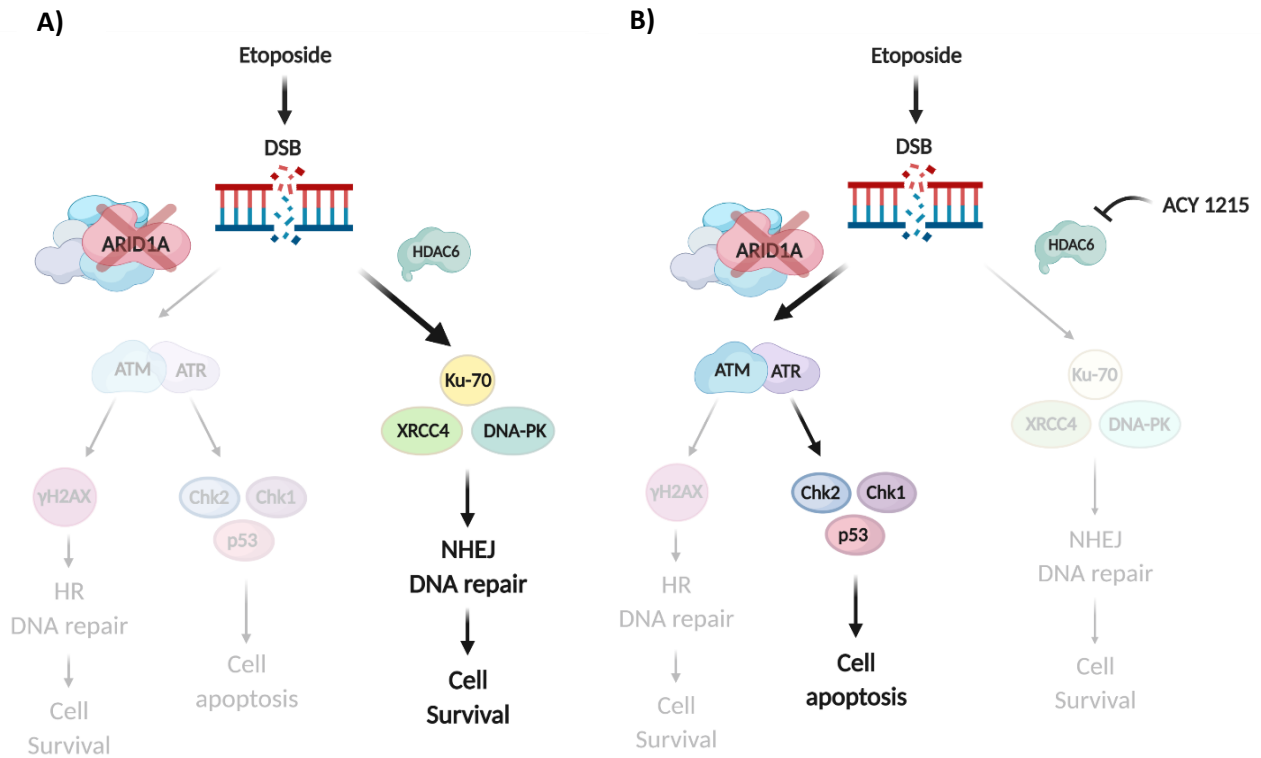
Sin embargo, las mutaciones de ARID1A desencadenan habitualmente en una pérdida de función<sup>88</sup>. Además, ha sido demostrado que ARID1A es capaz de reprimir la proliferación celular en una gran variedad de tipos tumorales<sup>82</sup>. Por ello, *ARID1A* ha sido postulado como un gen supresor tumoral “portero” (*gatekeeper*) capaz de regular la proliferación celular, mediante la regulación del ciclo celular o por medio de la promoción de la apoptosis<sup>82</sup>. Pese a no ver diferencias tras la pérdida de *Arid1a* en contextos de tejidos endometriales normales, debido a las claras implicaciones que se han descrito para ARID1A en la promoción de la progresión tumoral<sup>80</sup>, se decidió analizar el efecto de la pérdida de ARID1A bajo un contexto tumoral previamente establecido. Nuestros estudios funcionales sobre el rol de ARID1A en la proliferación tumoral, demuestran que la pérdida de ARID1A desencadenaba un incremento de la proliferación en las células de CE, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, estos resultados sugieren que el efecto observado con respecto al incremento de la proliferación, es debido a un importante defecto en la activación temprana del punto de control del ciclo celular G2/M, en un contexto tumoral. Dicho defecto conduce a las células de CE con alteraciones en ARID1A a evadir el arresto del ciclo celular inducido por el estrés genotóxico, consiguiendo evitar la salida del ciclo celular y la inducción de la apoptosis celular, continuando así con su supervivencia y proliferación. Además, en diversos cánceres ginecológicos (entre los que se encuentra el CE) estudios de análisis de expresión han identificado varias dianas por debajo de ARID1A que se encuentran estrechamente relacionadas con p53 (uno de los mayores efectores de la parada del ciclo celular), así como una mutua exclusión entre las mutaciones de ambos genes. Evidenciándose así la estrecha relación entre ARID1A y p53 para la regulación del ciclo celular, y poniendo de manifiesto la implicación de ARID1A en dicha regulación<sup>83</sup>.

Estos resultados plantean la idea de que ARID1A podría estar actuando también como un gen supresor tumoral “cuidador” (*caretaker*), manteniendo la estabilidad genómica. Sugiriendo así la participación de ARID1A en la activación y estabilización del punto de control mediado por ATM/ATR, tras la aparición de daño DSB del DNA, y decidiendo el destino de las células tras este daño al DNA. De hecho, en algunos tipos tumorales ha sido postulado que ARID1A podría actuar de *caretaker*, mediante interacciones directas con la proteína TOP2a (asegurando así la segregación correcta de los cromosomas) y la promoción de la activación del complejo ATM/p-γH2aX (facilitando así la reparación del daño al DNA DSB)<sup>82</sup>. Además, en concordancia con esta línea, también ha sido descrita una correlación entre defectos en el MMR debido a la MSI y la pérdida de función de ARID1A, en tumores gástricos y endometriales<sup>82</sup>. Estos fallos observados en la parada del ciclo celular, por una incorrecta activación del punto del control G2/M del ciclo celular, junto con los defectos en la reparación del daño al DNA, estarían alimentando un “fenotipo mutante” que conlleva a una acumulación de aberraciones genómicas pro-tumorales adicionales. La sucesiva acumulación de dichas aberraciones, podrían estar confiriendo a estas células defectuosas para ARID1A, la adquisición de fenotipos de mayor agresividad tumoral.

Las células de mamíferos emplean para la reparación del daño DSB del DNA dos grandes vías, la vía de RH (mediada por ATM) y la vía de NHEJ (mediada por PKcs), y cada una de ellas tiene un conjunto de proteínas único para realizar esa función<sup>34</sup>. El balance entre ambas vías es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica, y la desregulación de este equilibrio pueden conducir a la generación de la carcinogénesis<sup>34</sup>. Ha sido descrito que el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF tiene un importante papel en las vías del DDR, participando en fases tempranas de la reparación del daño DSB del DNA, mediante la rápida ocupación de las zonas

que presentan el daño DSB. En este punto, ARID1A actúa despejando la ocupación de los nucleosomas y facilitando, por interacciones físicas, el reclutamiento de diversas encimas de reparación del daño a DNA y otros moduladores<sup>82</sup>. Como se indica en el modelo propuesto (figura 145), los resultados obtenidos sugieren que ARID1A, en el CE, es necesario para la activación temprana del punto de control del ciclo celular G2/M. El cual se activa tanto en presencia de daño DSB del DNA generado tanto por el estrés genotóxico tumoral, como por la presencia de agentes inductores de daño DSB del DNA (como es el etopósido). Normalmente, en presencia de este daño DSB, las células inician la reparación del DNA vía HR y dependiendo de la magnitud del daño existente, si éste no puede resolverse, la célula entra en senescencia o apoptosis celular. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que en las células deficientes para ARID1A la vía de reparación HR no se activa correctamente, y es la vía NHEJ la que sirve de apoyo para reparar el daño a DNA. Así, las células tumorales con expresión alterada de ARID1A son capaces de evadir el exceso de estrés genotóxico, permitiéndose su supervivencia.

En concordancia con otros modelos tumorales, los resultados presentados en esta tesis muestran que la deficiencia de expresión de ARID1A promueve la sobreexpresión de la deacetilasa HDAC6<sup>100,159,160</sup>. HDAC6 directamente deacetila la Lys373/382 de p53, contribuyendo así también a la evasión de la apoptosis celular<sup>145</sup>. Además, HDAC6 ha sido directamente relacionada con la activación de la vía de DDR de NHEJ, manteniendo en un estado de deacetilación de la proteína Ku70<sup>107</sup> (componente clave de la vía NHEJ), y contribuyendo así a la activación de la vía NHEJ, de reparación del daño DSB del DNA. Además, la sobreexpresión de HDAC6 en tumores deficientes de ARID1A ha sido relacionada con factores de quimioresistencia<sup>160</sup>. Teniendo en cuenta estas observaciones, se podría especular que en las células de CE deficientes de ARID1A, los tratamientos inductores de daños DSB del DNA son reparados por la vía alternativa a la vía de HR (la vía de NHEJ). Así, estas células tumorales deficientes para ARID1A, asegurarían su supervivencia frente a este tipo de fármacos por medio de la sobreexpresión de HDAC6. Por ello, se cuestionó si al inhibir HDAC6, se reduciría la actividad de la vía NHEJ, volviendo susceptibles a las mencionadas terapias genotóxicas, a las células de CE deficientes para ARID1A. En base a esta hipótesis, decidimos evaluar si la inhibición de HDAC6 en las células de CE deficientes para ARID1A, podría restaurar el equilibrio entre ambas vías de DDR, conduciendo a la apoptosis celular en presencia de tratamientos con etopósido (figura 144). Los resultados expuestos en esta tesis muestran que la activación de la vía NHEJ, tras la inducción del daño DSB, es dependiente de la actividad de HDAC6 en las células deficientes para ARID1A. Así, la inhibición de HDAC6 promueve selectivamente la apoptosis de las células deficientes para ARID1A tratadas con etopósido.



**Figura 144. Modelo esquemático propuesto para la respuesta a los tratamientos con etoposido y el papel de HDAC6, en células de CE con alteraciones de ARID1A.** Esquema propuesto de la vía de actuación, en células donde la deficiencia de ARID1A causa la compensación de las vías de reparación del daño al DNA, involucrando a HDAC6 en la reparación de los daños DSB del DNA inducidos por etoposido. A) Células deficientes para ARID1A en presencia de tratamientos con etoposido y B) células deficientes para ARID1A en presencia de tratamientos con etoposido y el inhibidor de HDAC6 (ACY 1215). Creado con BioRender.com

Estos hallazgos sugieren la existencia de una dependencia de las células de CE con alteraciones en ARID1A de la vía de NHEJ para su supervivencia, la cual es liderada por la sobreexpresión de HDAC6. Abriéndose así una nueva oportunidad terapéutica, basada en una inhibición de HDAC6, la cual genera la acumulación excesiva de daño DSB del DNA, y consecuentemente induce la apoptosis en las células deficientes de ARID1A. Remarcándose así, que ARID1A genera en las células de CE una dependencia de HDAC6 frente a los quimioterapéuticos genotóxicos. Por lo que, en este escenario, otros agentes genotóxicos inductores de daño DSB del DNA deberían, de igual modo, mostrar sinergias con la inhibición de HDAC6 en tumores deficientes para ARID1A. Esta estrategia de aprovechamiento, de los defectos de las vías de DDR para terapias personalizadas, también se emplea en contextos similares. Por ejemplo, en células deficientes para ATM, se ha observado una dependencia de la vía de NHEJ para su supervivencia, de manera similar a estas células con alteraciones de ARID1A. De esta manera, los inhibidores de DNA-PK (otro elemento clave de la vía de reparación al DNA NHEJ) son un tratamiento diana para células humanas cancerígenas con depleción de ATM en diversos tipos de tumores como el de pulmón o el melanoma<sup>37</sup>. De hecho, también en un contexto de células endometriales tumorales deficientes para ARID1A, recientes estudios han demostrado que los inhibidores de PARP (otra

vía de DDR) actúan sinérgicamente con tratamientos de irradiación, potenciando su citotoxicidad<sup>146</sup>. En el mismo sentido, en diversos tumores sólidos entre los que se encuentra el CE, también se ha observado una letalidad sintética entre ATR y ARID1A, apreciándose una mayor respuesta a los tratamientos con inhibidores de ATR en las células deficientes para ARID1A, gracias a la inestabilidad genética causada por la falta de ARID1A<sup>161</sup>. Además, actualmente, se encuentra en marcha un ensayo clínico en fase II, en el que se intenta evaluar la sinergia entre la eficacia observada con los inhibidores de ATR (ceralasterib) y los inhibidores de PARP (olaparib) en pacientes con tumores ginecológicos (entre los que se encuentran pacientes con CE) con deficiencia o no de ARID1A<sup>162</sup>. Estudios han demostrado que, en pacientes con CE recurrente, tratamientos con baja dosis con etopósido generan modestas mejoras sin mostrar toxicidad<sup>163-165</sup>. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, junto con el hecho de que ya existen inhibidores específicos de HDAC6 seguros en ensayos clínicos<sup>166</sup>, en este estudio se postula que los tratamientos combinatorios de inhibidores de HDAC6 y etopósido, podrían ser una potencial y prometedora diana terapéutica para el tratamiento de CE con alteraciones de ARID1A. De igual manera, este concepto abre camino al descubrimiento y aprovechamiento de una amplia posibilidad de terapias combinatorias para el tratamiento de los tumores de CE con alteraciones de ARID1A.

Recientes estudios, en los que por medio de secuenciación del exoma completo se ha conseguido describir el ambiente genómico tanto de tumores primarios de CE como de su progresión y sus metástasis pareadas, han postulado que las mutaciones tanto en *ARID1A* como en otros componentes del complejo SWI/SNF, más que promover la formación de estos tumores primarios, alteran el ambiente epigenético de los tumores primarios de CE ya establecidos, potenciando su agresividad<sup>98</sup>. Además, datos existentes demuestran una clara implicación de ARID1A en la preservación de la identidad epitelial y la regulación de proceso de EMT, en múltiples tipos de cánceres como el gástrico, el neuroblastoma, el de hígado, mama, páncreas o el de colon<sup>80</sup>. Observándose, que la alteración de ARID1A promueve la expresión de marcadores de tipo mesenquimal como la vimentina o la N-cadherina, así como la expresión de metaloproteasas como la MMP2 o la MMP9, e inhibe la expresión de marcadores epiteliales como la E-cadherina<sup>80</sup>. En concordancia con todos estos datos, los resultados presentados en esta tesis muestran que las células de CE con expresión defectiva de ARID1A también presentan incrementados estos programas de EMT.

Los programas de EMT, en estado parcial o total, han sido relacionados con fenotipos migratorios e invasivos en carcinomas endometriales. Así, este proceso de EMT permite a las células de CE moverse a través de su comunidad de células epiteliales e integrarse en el tejido estromal de alrededor, hasta alcanzar localizaciones remotas<sup>167</sup>. Estas observaciones se reproducen en los resultados expuestos en esta tesis, donde se demuestra que las células de CE con expresiones alteradas de ARID1A adquieren fenotipos de EMT que se traducen en la dotación de mayores capacidades migratorias e invasivas. Esto contribuye a la adquisición de malignidad fenotípica y a la diseminación metastática, tanto en modelos *in vitro* como modelos murinos *in vivo*.

Una de las vías de señalización más importantes, involucradas en la progresión tumoral, es la vía de las MAPK. Esta vía, a través de sus efectores, ha sido descrito en la contribución, promoción y regulación de los procesos de EMT, potenciando las propiedades de migración e invasión de



las células tumorales<sup>168</sup>. Por lo que, no es de sorprender que esta vía se encuentre hiperactivada en diversos tipos tumorales. El análisis de las células de CE deficientes para ARID1A, evidencia una correlación positiva entre la promoción del proceso de EMT y los procesos de la migración e invasión celular, con la hiperactivación de algunas de las quinasas que actúan como efectores centrales de la vía (como son ERK1/2, JNK o p38). Indicando que alteraciones en ARID1A promueven la adquisición de fenotipos más agresivos y pro-metastáticos, por medio de la hiperactivación de la vía de las MAPK.

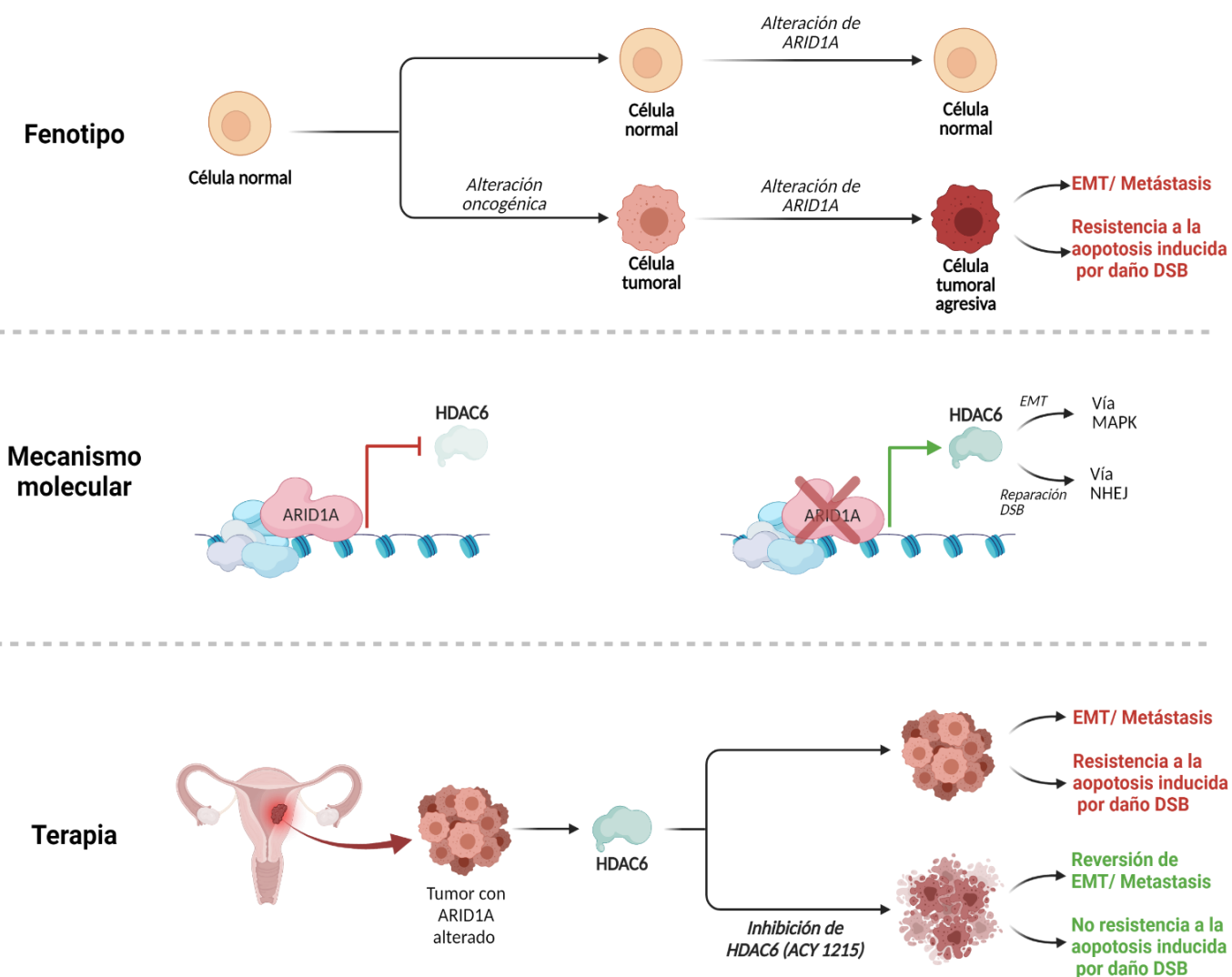
Clásicamente, HDAC6 ha sido relacionada con la promoción de la migración celular, mediante la deacetilación de la  $\alpha$ -tubulina, por medio de mecanismos no transcripcionales. Sin embargo, recientes estudios han descrito un papel nuclear directo para HDAC6, en el cual, mediante la unión a diversos promotores, conduce a la inhibición de varios genes que codifican para proteínas de uniones delgadas (*tight functions*). De tal manera, HDAC6 actuaría promoviendo los procesos de EMT y regulando la migración celular de una manera transcripcional<sup>106</sup>. Además, HDAC6 ha sido clara e íntimamente relacionada con la hiperactivación de la vía de las MAPK<sup>169</sup>. En este estudio, al analizar la localización de HDAC6, se observa que en las células de CE con regulación a la baja de ARID1A, además de existir una mayor expresión de HDAC6, la localización de esta deacetilasa es principalmente nuclear. Este hecho, junto con la clara hiperactivación de la vía de las MAPK en las células deficientes de ARID1A, planteó la hipótesis de que los efectos en la promoción de programas de EMT, migración e invasión, observados en las células de CE con alteraciones de ARID1A, podían ser consecuencia del incremento de HDAC6 producido tras la pérdida de ARID1A. Los resultados obtenidos desvelan que en presencia del inhibidor selectivo de HDAC6, ACY1215, las células de CE con alteración de ARID1A revertían el proceso de EMT. Observándose así, un restablecimiento de la expresión de los marcadores epiteliales y una disminución de los marcadores mesenquimales, que a su vez desencadena en una disminución de las capacidades migratorias e invasivas de dichas células. Además, también se demuestra que la inhibición de la expresión de HDAC6 en células de CE con alteraciones de ARID1A, reduce drásticamente la capacidad de diseminación celular *in vivo*. Todos estos resultados en conjunto, sugieren que HDAC6 modula la identidad celular epitelial de las células endometriales tumorales por medio de la regulación de la actividad transcripcional de genes involucrados en la promoción de los procesos de EMT. En este sentido, el fenotipo mesenquimal podría ser mantenido hasta la colonización de sitios distales metastáticos, donde una vez allí, podría volver a regularse hacia estados de EMT más parciales y propicios para la colonización y crecimiento del tumor secundario metastático en la zona donde se alojará. En otras palabras, ARID1A, a través de la regulación de la expresión de HDAC6, podría estar desajustando la plasticidad de las células endometriales, limitando la capacidad de transdiferenciación de las células epiteliales y previniendo de tal manera la aparición de metástasis.

Como resultado, la inhibición de la actividad de HDAC6 representa una nueva posibilidad terapéutica prometedora para el tratamiento de CE de alto grado, metastáticos o recurrentes que presenten mutaciones de ARID1A. Este hecho puede ser de relevante importancia, puesto que las metástasis y recurrencias son la principal causa de mortalidad del CE y las alteraciones de ARID1A son ampliamente detectadas en CE de alto grado.

En resumen, todos estos resultados presentados en el primer objetivo de la presente tesis, demuestran que la deficiencia de ARID1A en células tumorales de CE, acelera la transición del

ciclo celular, promueve la adquisición de malignidad tumoral y permite la resistencia apoptótica a terapias genotóxicas por medio de la sobreexpresión de HDAC6 (figura 145). En consecuencia, el uso de inhibidores de HDAC6, podría representar una prometedora estrategia terapéutica para las pacientes con CE que presenten alteraciones de ARID1A, haciendo que dichos tumores sean más susceptibles a otros tratamientos basados en la inducción de daño genotóxico. Además, estos tratamientos pueden ser capaces de evitar o reducir la diseminación y consecuente formación de metástasis, y aparición de recurrencias de dichos tumores. Notablemente, ha sido clínicamente demostrado que los inhibidores de HDAC6, como ACY1215, son bien tolerados y presentan toxicidades mínimas en los pacientes<sup>102</sup>. Así, el estudio aquí mostrado provee una científica y racional propuesta de la traslación clínica de estos descubrimientos, proponiendo la aplicabilidad clínica de los inhibidores selectivos de HDAC6 para las pacientes diagnosticadas en estados avanzados de CE con mutaciones en ARID1A, para las cuales actualmente no existen terapias exitosas.

A)



**Figura 145. Resumen gráfico del modelo propuesto en el bloque de objetivos 1.** Esquema propuesto de las consecuencias causadas por las alteraciones de ARID1A en las células epiteliales endometriales y el tratamiento postulado frente a los tumores con deficiencia de ARID1A mediante el uso de inhibidores de HDAC6. A) Fenotipo propuesto de las consecuencias de las alteraciones de ARID1A en un contexto normal o tumoral de las células epiteliales endometriales. B) Mecanismo molecular por el que la pérdida de ARID1A promueve los fenotipos en las células tumorales debido a la sobreexpresión de HDAC6. C) Terapia propuesta para los tumores con alteraciones de ARID1A, empleando inhibidores de HDAC6. Creado con BioRender.com

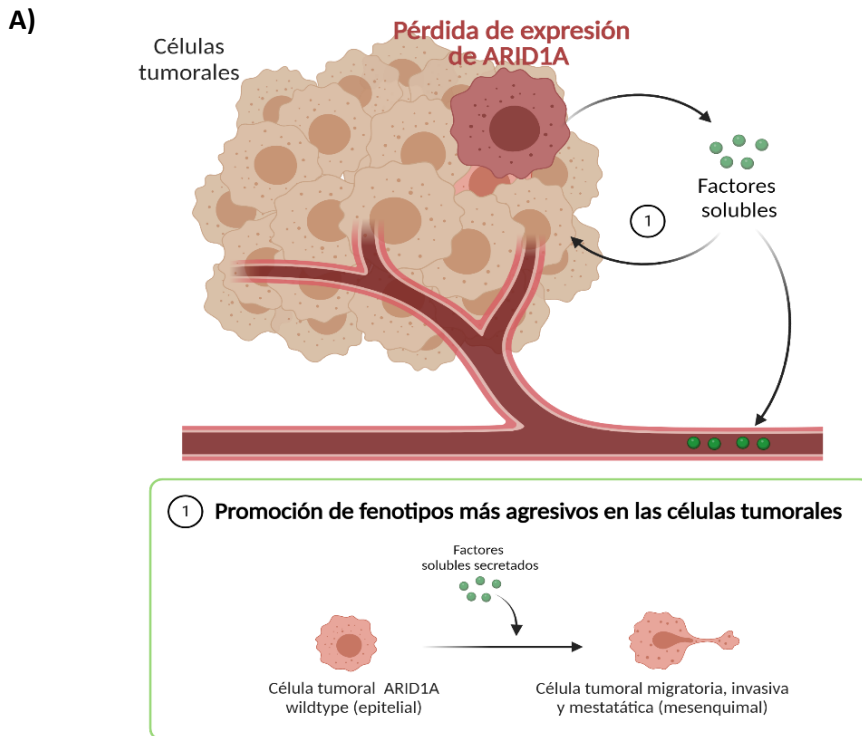
## 5.2. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE ARID1A EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO.

---

Actualmente, se sabe que los tumores consisten en un complejo microambiente formado no solo por las células tumorales, sino también por células estromales e inmunes, así como factores solubles y componentes de la ECM<sup>65</sup>. Dentro de este TME, existe una interacción recíproca entre las células y con los componentes que forman parte del TME, la cual juega un rol fundamental en las diferentes fases del desarrollo y progresión tumoral. Estas interacciones se pueden dar de diferentes maneras, pudiendo realizarse directamente por medio de contactos célula-célula, mediante la secreción de moléculas (como citoquinas, etc.) o mediante exosomas<sup>148</sup>.

La diseminación local del tumor primario a través del tejido normal adyacente es el paso inicial de la metástasis tumoral, y los componentes secretados al medio por las células tumorales juegan un papel fundamental en esta diseminación<sup>148</sup>. Varios son los estudios que describen que dentro del tumor primario, las células tumorales con fenotipos de mayor agresividad son capaces de promover estos fenotipos en las células tumorales de alrededor con fenotipos menos agresivos, por medio de la secreción de diversos factores solubles, que promueven de forma autocrina-paracrina la progresión y diseminación tumoral o la adquisición de resistencia a terapias antitumorales<sup>147</sup>. Por un lado, Celia-Terrasa et al. describieron que dentro de un mismo tumor, las células que poseían activados los programas de EMT y las capacidades de diseminación, eran capaces no solo de mantener sostenidas estas capacidades de manera autocrina, sino también de promover los programas de EMT y la competencia metastática de las células tumorales de alrededor, a través de la secreción de TGF- $\beta$ <sup>170</sup>. Por otro lado, Obenautf et al. demostraron que algunas células tumorales resistentes a terapias antitumorales, en presencia de dichas terapias, secretaban una serie de factores solubles que estimulaban el crecimiento, diseminación y metástasis de las células tumorales resistentes. Los autores vieron que estas células, además, promovían la adquisición de resistencia a dichas terapias, en células tumorales adyacentes que previamente eran sensibles, contribuyendo así a una incompleta regresión tumoral<sup>147</sup>.

En base a estos datos, y considerando que en resultados anteriores se observó que, en las células de CE, la pérdida de ARID1A promovía la activación de los programas de EMT y la adquisición de propiedades metastáticas, se decidió indagar en la posibilidad de que las células de CE con expresión de ARID1A alterada fueran capaces de promover la adquisición de estas capacidades de mayor agresividad tumoral, en las células de CE de alrededor con expresión salvaje de ARID1A. Mediante el empleo de CM y la generación de co-cultivos, en el presente estudio se demuestra que las células de CE con alteraciones de ARID1A son capaces de promover la activación de programas de EMT y la adquisición de capacidades migratorias e invasivas en las células vecinas de CE con expresión salvaje de ARID1A, principalmente mediante la secreción de factores solubles. Sugiriendo que la pérdida de ARID1A, no solo promueve la activación de programas EMT y la adquisición de capacidades migratorias e invasivas en las mismas células que poseen alterada la expresión de ARID1A, sino también en las células vecinas de CE con expresión salvaje de ARID1A, mediante la promoción de señales paracrinas a nivel local (figura 146).



**Figura 146. Modelo esquemático propuesto del efecto de las células de CE con ARID1A alterado, en las células de CE vecinas con expresión salvaje de ARID1A.** A) Esquema propuesto de la vía de actuación en células, donde la deficiencia de ARID1A en células de CE promueve la adquisición de fenotipos más agresivos en las células tumorales con expresión normal de ARID1A de alrededor, además de extrapolar los factores solubles al torrente sanguíneo. Creado con BioRender.com

Los factores solubles secretados por las células tumorales, juegan un papel fundamental en las fases más tempranas de la cascada metastática, favoreciendo la diseminación e invasión local del tumor primario. Estos factores también desempeñan una función primordial en fases más avanzadas de la cascada metastática, favoreciendo tanto la intravasación, circulación y extravasación, como la formación de un microambiente favorecedor del crecimiento tumoral en los órganos distales (denominado nicho pre-metastático) y el establecimiento de focos metastáticos<sup>148</sup>. En concordancia con estas funciones, los resultados de esta tesis demuestran, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, que las células de CE con pérdida de expresión de ARID1A son capaces de expandir la descrita señalización paracrina local, a nivel distal por medio del torrente sanguíneo. Estos resultados revelan que la pérdida de ARID1A en células de CE del tumor primario, es capaz de inducir una señalización paracrina al torrente sanguíneo, que favorece las capacidades invasivas y metastáticas de las células de CE con expresión conservada de ARID1A. Sugiriendo que la extrapolación de estas señales más allá del microambiente del tumor primario, posiblemente permitan la formación de nichos pre-metastáticos en órganos secundarios, favoreciendo así la diseminación metastática de las células del tumor de CE primario.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los tumores envuelven un ecosistema multicelular, en donde los CAFs son las células más comunes del componente estromal. Estos CAFs juegan un papel fundamental en la interacción de las células tumorales con su TME, que afecta directamente a la heterogeneidad, progresión y metástasis tumoral<sup>65</sup>. Está ampliamente

aceptado que las células tumorales modulan directamente la activación y funciones de los CAFs, mediante la señalización paracrina, secretando factores solubles como SHH, LIF, TGF $\beta$  o IL1. Estos CAFs, una vez activados, producen también una amplia variedad de citoquinas que, por medio de la activación de diversas vías de señalización, conducen a la activación de programas de EMT y la adquisición de capacidades migratorias e invasivas, generándose así una interrelación recíproca entre las células tumorales y los CAFs<sup>148,149</sup>. Concretamente en el endometrio, donde el componente estromal es muy abundante y se encuentra rodeando a las glándulas epiteliales, las células estromales juegan un papel muy importante en el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales adyacentes, tanto por contacto directo célula-células como por la liberación de factores solubles al medio<sup>171</sup>. Por ello, teniendo en cuenta los resultados previamente expuestos, se hipotetizó que los factores solubles secretados por estas células alteradas, además de estar modificando las células tumorales vecinas, también podrían estar promoviendo la activación de las células estromales del TME. En el presente estudio se demuestra, mediante ensayos *in vitro* y el empleo de CM de células tumorales, que las células de CE con alteraciones de ARID1A poseen una mayor capacidad de promover la activación de las células estromales endometriales. Además, mediante el empleo de modelos murinos xenógrafos y el modelo transgénico *Cre:ERT; Pten<sup>ff</sup>; Arid1a<sup>ff</sup>*, también se demuestra que, *in vivo*, las células de CE con alteraciones de ARID1A poseen una mayor capacidad de reclutamiento y activación de las células estromales a CAFs, en comparación con los tumores con expresión de ARID1A intacta. Resultados similares son obtenidos en muestras de pacientes con CEE, avalando así esta hipótesis.

Los CAFs comprometen a una población celular muy heterogénea, y aun no se conoce con exactitud las funciones y propiedades exactas que presentan los diferentes subtipos o estados de CAFs durante la tumorigénesis<sup>71</sup>. Se sabe que los CAFs son altamente plásticos y fácilmente son capaces de adoptar muy diversas características, pero generalizadamente han sido postulados dos principales subtipos, o estados transcripcionales intercambiables, de CAFs. Por un lado, los myCAF, que se caracterizan por poseer elevadas capacidades de contractibilidad, remodelación de la ECM y expresión de  $\alpha$ -SMA; y por otro lado los iCAF, que se caracterizan por producir citoquinas inflamatorias pro-tumorigénicas tales como IL1, IL6 o CCL2<sup>68</sup>. Los resultados presentados demuestran que la observada activación estromal conduce a estados de fenotipos CAFs intermedios entre myCAF y iCAF. Ya que, en ambos modelos, las células estromales que previamente habían sido activadas por células tumorales con alteración de ARID1A, presentan incrementados tanto de marcadores típicos generales de activación estromal (como FAP), como propiedades y marcadores característicos de estos dos subtipos de CAFs. Por un lado, se observa que estos CAFs poseen mayores capacidades de degradación, deposición y contractibilidad de la ECM y tienen incrementada la expresión de marcadores como TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA o COL1, lo cual es típico de los fenotipos de myCAF. Pero, por otro lado, estos CAFs también muestran un incremento de marcadores típicos de los iCAF, como son la IL6 y la activación de la vía NF $\kappa$ B. Así, los resultados presentados demuestran que la pérdida de ARID1A en las células tumorales de CE, promueve el reclutamiento y activación de las células estromales a CAFs con fenotipos plásticos mixtos.

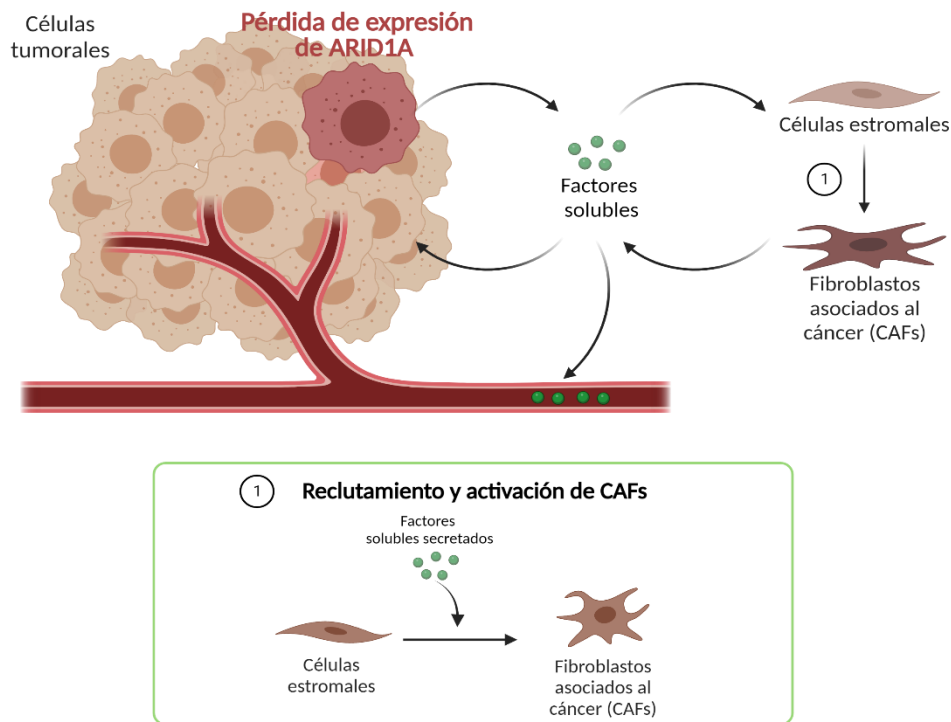
Además, los resultados en esta tesis expuestos demuestran que los CAFs activados por señales paracrinias inducidas por células de CE con expresión alterada de ARID1A, son capaces de seguir

manteniendo esta activación *in vitro*, pese a dejar de estar en contacto con dichas células tumorales ni con los estímulos procedentes de ellas. De tal manera, estos resultados sugieren que, una vez activadas por las señales de las células tumorales, estos CAFs son capaces de mantener un bucle de retroalimentación positiva (por medio de señalización autocrina), que les permite sostener ese estado de activación fibroblástica. Además, estos resultados corroboran que dicha activación de las ESC, desencadena también en una mayor función pro-tumoral por parte de éstas. Demostrándose, que las ESC activadas por células de CE con expresión alterada de ARID1A, poseen la capacidad de promover los programas de EMT, la migración y la invasión en las células tumorales vecinas de CE con expresión salvaje de ARID1A. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el importante papel que juegan los CAFs en el microambiente tumoral de los carcinomas endometriales, promoviendo la agresividad tumoral. Muy recientemente, resultados similares han sido descritos en otros tipos de tumores sólidos como mama<sup>151,172</sup>, colon<sup>173,174</sup>, páncreas<sup>149,175</sup> o hígado<sup>176</sup>. En ellos, se ha descrito que células tumorales que presentan una mayor malignidad dentro del tumor, por medio de señales autocrinas y paracrinas, son capaces de regular la activación del microambiente tumoral. Dichas señales conducen a que el TME soporte el desarrollo tumoral, mediante la promoción de programas de EMT, la metástasis o la evasión del sistema inmune<sup>67</sup>.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que en los tumores endometriales con alteraciones de ARID1A, existen un mayor número de CAFs con fenotipos híbridos, que presentan simultáneamente características de myCAF y iCAF. Estos CAFs, por medio de señalización paracrina, conducen a la formación de un nicho estromal que da soporte a la progresión de procesos de EMT, así como a la promoción de la migración e invasión de las células tumorales de alrededor (figura 147). Mientras las células tumorales emplean una gran variedad de cambios genéticos ilícitos a la tumorigénesis, los cambios en el microambiente tumoral están más conservados entre diferentes tipos tumorales, por lo que actualmente las nuevas estrategias terapéuticas basadas en TME están en auge. El estudio y descubrimiento de relevantes nuevos marcadores, así como de dianas terapéuticas, es necesario para tratamientos más personalizados. Además, debido a la amplia funcionalidad que poseen los CAFs, actualmente existen estrategias basadas en estos CAFs que están siendo probadas tanto en estudios pre-clínicos como clínicos<sup>71</sup>. Por ello, actualmente las terapias basadas en la “normalización” de la función de los CAFs a fenotipos antitumorales, son de elevado interés y se encuentran actualmente en auge<sup>71-73</sup>. Estos hechos, junto con los resultados aquí mostrados, sugieren que las terapias basadas en el TME podrían tener una gran importancia para el tratamiento de los tumores con pérdida de ARID1A, y concretamente para los de CE.



A)



**Figura 147. Modelo esquemático propuesto del efecto de las células de CE con ARID1A alterado, en las células estromales del TME.** A) Esquema propuesto de la vía de actuación en células, donde la deficiencia de ARID1A en células de CE promueve el reclutamiento y activación de células estromales de diferentes orígenes, adquiriendo fenotipos CAFs que a su vez al activarse secretan también estos factores solubles, generándose así un bucle de retroalimentación positivo de actuación autocrina y paracrina que promociona un nicho estromal pro-tumoral, además de extrapolar estas señales al torrente sanguíneo. Creado con BioRender.com

En línea con estos resultados, en esta tesis también se demuestra que las células estromales endometriales pueden ser activadas de igual manera, tanto por los CAFs que previamente han sido activados por células tumorales deficientes para ARID1A, como por el plasma de los ratones que poseen tumores endometriales deficientes para ARID1A. De tal modo, estos resultados corroboran que la pérdida de ARID1A en las células del CE promueve la activación y el mantenimiento de un bucle de retroalimentación positiva, mediante señales paracrinas y autocrinas. Este bucle, no solo da lugar a la generación y mantenimiento de un nicho estromal pro-tumorigénico en el tumor primario, sino que también secreta factores que van al torrente sanguíneo, extrapolándose estas señales más allá del tumor primario, y seguramente promoviendo las capacidades de diseminación de las células tumorales del tumor primario. Por lo que, en conjunto, los presentes resultados apoyan la hipótesis de que la pérdida de ARID1A en el tumor primario podría estar tanto promoviendo la activación del TME a nivel local, como extrapolando la señalización y favoreciendo a su vez la formación de nichos pre-metastáticos (figura 147).

Las citoquinas, y concretamente las quimioquinas, juegan un papel fundamental en los mecanismos llevados a cabo durante la progresión tumoral, tanto por parte de las células tumorales, como por el resto de células que componen el TME<sup>148</sup>. De manera que las quimioquinas son cruciales para las cascadas de señalización autocrinas y paracrinas dadas durante la progresión tumoral, con especial importancia en los procesos de diseminación y colonización metastática. Por ello, el conocimiento sobre las vías de señalización activadas en cada TME puede ser de vital importancia, y el empleo de estrategias terapéuticas basadas en el bloqueo de las vías de señalización vinculadas a dichas quimioquinas está ganando cada vez más atención<sup>148</sup>. En base a los resultados obtenidos, que claramente indican un perfil de secreción de factores solubles alterado por parte de las células tumorales con alteración de ARID1A, se decidió examinar el perfil de secreción tanto en los CM de las células de CE, como en los plasmas de los modelos murinos y en muestras de aspirados uterinos de pacientes con CEE, con alteración o no de ARID1A. Los resultados obtenidos corroboran que, efectivamente, la pérdida de expresión de ARID1A promueve un aumento de la secreción de quimioquinas a nivel general. Además, los datos mostrados en esta tesis revelan que, de entre todas las quimioquinas analizadas, existe un destacado y significativo aumento de los niveles de la quimioquina CXCL16, identificándose así a CXCL16 como un nuevo factor secretado por las células de CE con alteraciones de ARID1A.

Además, los resultados presentados en esta tesis muestran que este aumento de sCXCL16, detectado tanto a nivel local de TME como a nivel sanguíneo, coincide con un aumento de los niveles celulares de expresión, tanto a nivel proteico como de mRNA, de CXCL16. Este aumento de CXCL16, también coincide con un aumento de expresión de su receptor único CXCR6 y de la metaloproteasa asociada a la liberación de la forma soluble de CXCL16, ADAM10. Estos resultados se reproducen tanto en las células de CE, como en los modelos murinos y en muestras de pacientes con CE. Además, los resultados obtenidos demuestran que esta sobreexpresión de CXCL16, CXCR6 y ADAM10, se da tanto en las células tumorales como en los CAFs, sugiriendo que el bucle de retroalimentación positiva, previamente descrito en los TME de los tumores de CE con alteraciones de ARID1A, podría ser inducido por la secreción de sCXCL16 y la consecuente hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16.

Recientes estudios han demostrado la implicación de CXCL16, y la consecuente hiperactivación del eje CXCR6/CXCL16, en la inducción de nichos pre-metastáticos que facilitan la diseminación de las células tumorales y formación de las metástasis en órganos secundarios<sup>177</sup>. Por otro lado, los niveles de CXCL16 en plasma, ya han sido indicados como un posible marcador diagnóstico o pronóstico útil en algunos tipos de carcinomas sólidos como pulmón o riñón<sup>116</sup>. Por ello, en este trabajo se postula a CXCL16 como una importante diana terapéutica para el tratamiento de las pacientes con CE con mutaciones de *ARID1A*, con el fin de prevenir o reducir la diseminación celular, así como la formación de focos metastáticos en órganos distales. Además, los resultados aquí presentados también proponen a CXCL16 como un prometedor marcador para el diagnóstico o progresión de los pacientes con CE con mutaciones en *ARID1A*.

La importante implicación de CXCL16 y CXCR6 en los procesos de diseminación y metástasis, ha sido descrita en una amplia gama de tumores sólidos, tales como próstata, mama, pulmón o estómago<sup>113</sup>. De hecho, muy recientemente, varios estudios han determinado una sólida

relación entre el eje CXCR6/CXCL16 y la decidualización de las células estromales del endometrio durante el embarazo. Así, se ha visto que durante este proceso, los trofoblastos son capaces de secretar elevadas cantidades de CXCL16 que interactúan con las células estromales endometriales, favoreciendo su decidualización<sup>178</sup>. Este papel descrito para CXCL16 en la decidualización endometrial, que es un proceso por el cual las células estromales endometriales sufren cambios morfológicos y funcionales para permitir la invasión de las células trofoblásticas embrionarias en el útero, soporta la hipótesis de que en el CE la señalización por vía CXCL16 por parte de las células tumorales deficientes para ARID1A, pueda reclutar y promover la activación estromal y coordinar un TME pro-tumoral que favorezca la invasión y diseminación de las células tumorales. De hecho, la función de CXCL16 en la activación de las células estromales y la promoción de los fenotipos CAF, se encuentra sólidamente demostrada por varios estudios<sup>120,172,176,177</sup>. Incluso, ha sido descrito un rol fundamental en el establecimiento de nichos pre-metastáticos para el eje CXCR6/CXCL16. Postulándose, que la secreción de CXCL16 llega al órgano secundario mediante el torrente sanguíneo, donde, por medio de la generación de un bucle de retroalimentación positiva basada en el eje CXCR6/CXCL16, reprograma los CAFs y favorece la diseminación y metástasis hasta dicho órgano secundario<sup>177,179</sup>. Por ello, estas observaciones sugieren un papel para CXCL16, como elemento central en la interconexión entre epitelio y estroma en los CE con alteraciones de ARID1A, clave para la progresión tumoral y diseminación metastática.

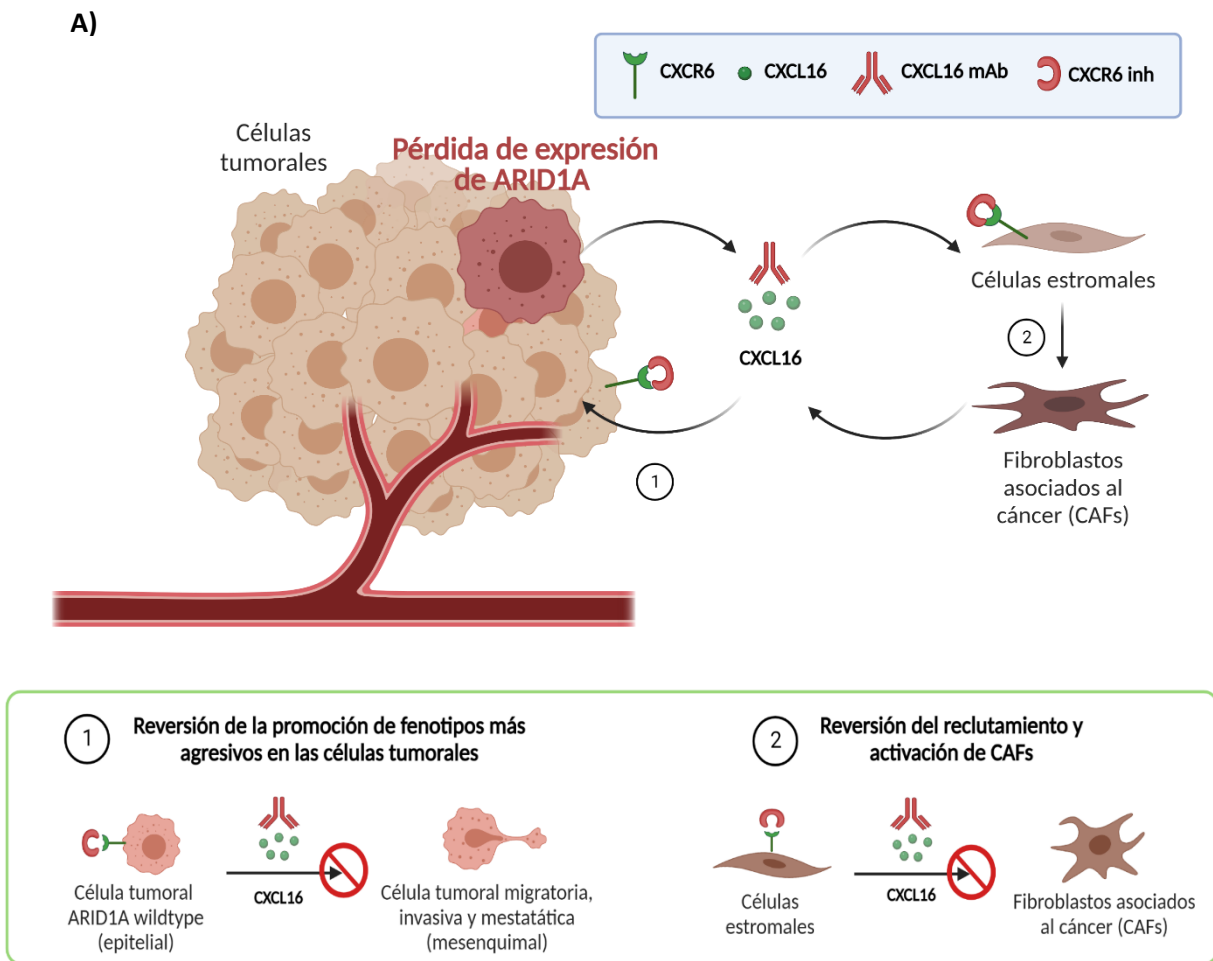
Los datos presentados en esta tesis también demuestran que el empleo tanto de anticuerpos neutralizantes contra CXCL16, como del inhibidor selectivo de CXCR6, ML-339, revierten significativamente todos los efectos observados causados por la señalización de las células de CE con alteraciones de ARID1A, tanto en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A como en las ESC. Así mismo, el silenciamiento de CXCL16 mediante el empleo de shRNAs también revertiría los efectos en el TME y la diseminación tumoral causados por las células de CE con alteraciones de ARID1A. Todos estos resultados avalan la idea de que, es la secreción de CXCL16 por parte de las células de CE deficientes en ARID1A, la que por medio de la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16, promueve la activación y generación de un TME pro-tumorogénico capaz de favorecer la invasión y diseminación tumoral del CE.

Los resultados expuestos en este trabajo indican un rol en la señalización de la vía CXCR6/CXCL16, entre las células tumorales con expresión alterada de ARID1A y las células tumorales con expresión salvaje de ARID1A, o con las células estromales contiguas. Aun así, debido a la clara implicación del resto de componentes del TME tienen sobre el desarrollo y progresión tumoral<sup>67</sup>, futuros estudios deberían ser realizados para acabar de establecer si otras poblaciones celulares del TME podrían tener funciones adicionales en la progresión y malignidad de los CE con alteraciones de ARID1A. De hecho, está descrito que una amplia gama de células del sistema inmune presentan elevados niveles de CXCR6<sup>113</sup>, e incluso recientemente Allaoui, et al. han demostrado la implicación de CXCL16 en la atracción de células mieloides, a través de la activación del eje CXCR6/CXCL16 en CAFs<sup>180</sup>. Además, datos preliminares no mostrados en esta tesis, muestran la existencia de una mayor expresión de PDL1 tras la pérdida de ARID1A en las células de CE, y que además los CM de estas células tumorales, promueven la polarización de las células mieloides a macrófagos de tipo M2 (pro-tumorales). Todas estas observaciones, sugieren que ARID1A podría tener una importante implicación en la inmunomodulación tumoral, mediante la regulación del eje CXCR6/CXCL16. Por ello, estudios que profundicen sobre la

implicación de ARID1A en la inmunomodulación del TME del CE, podrían ser de gran importancia para llevar a cabo una mejor caracterización de la función de ARID1A en el TME.

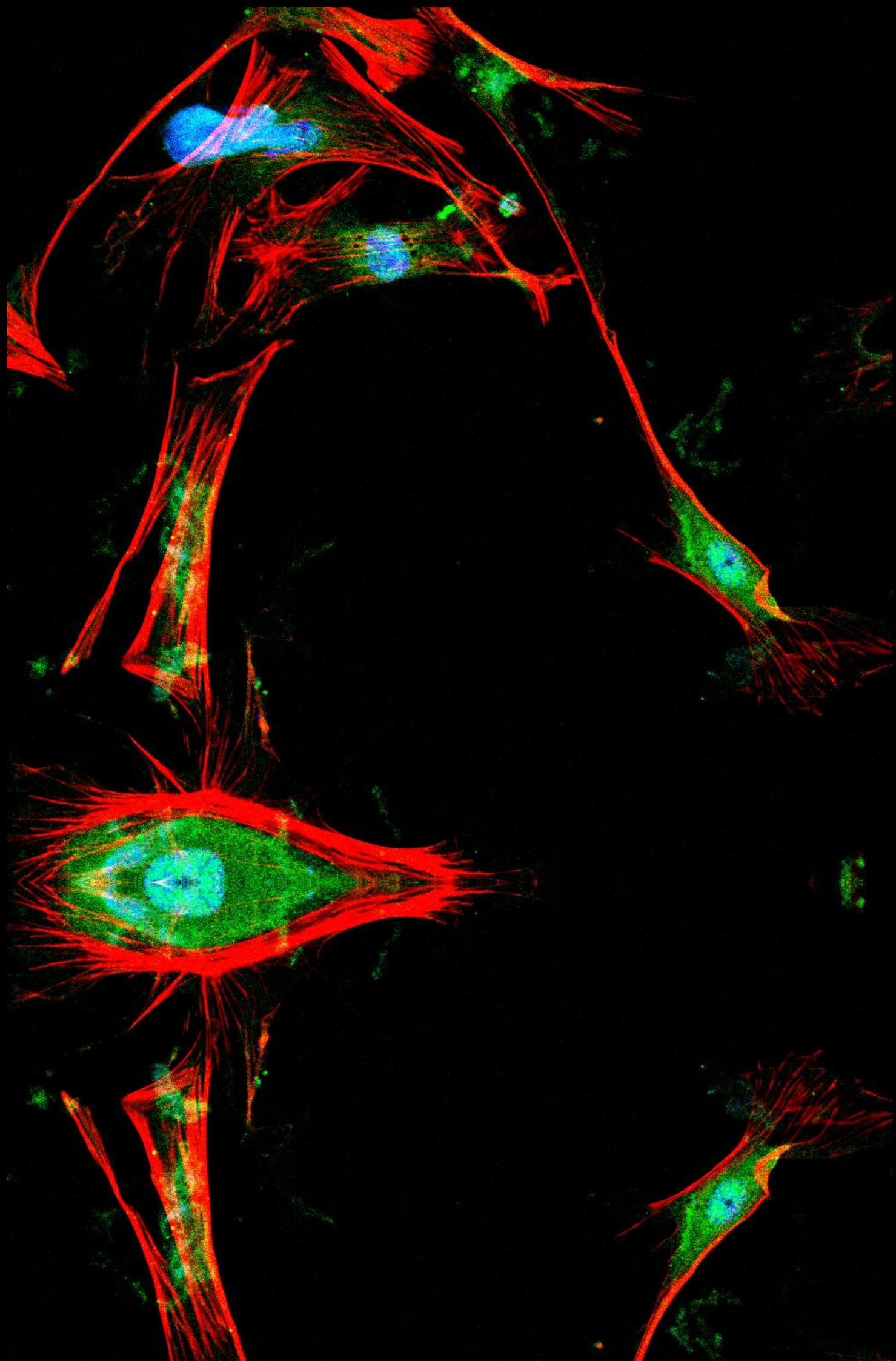
Para determinar los mecanismos moleculares implicados en las funciones biológicas causadas por activación del eje CXCR6/CXCL16, nos focalizamos principalmente en el eje ERK1/2, ya que, además de haber sido demostrado en los resultados del objetivo 1 que dicha vía tiene una implicación en la adquisición de los fenotipos migratorios e invasivos de las células de CE con alteraciones de ARID1A, otros estudios han demostrado que esta vía posee una clara implicación en las funciones biológicas causadas por CXCL16<sup>116</sup>. Los resultados presentados demuestran que, la vía de las MAPK se ve incrementada bajo las señales del eje CXCR6/CXCL16. La vía de las MAPK tiene una estrecha y directa relación con la modulación y contractibilidad de los filamentos de actina y la formación de adhesiones focales, desencadenando por medio de la vía FAK en la acumulación nuclear del factor YAP<sup>118,181</sup>. Recientes estudios han demostrado la relación entre la translocación nuclear de YAP y la secreción de CXCL16, por parte de células tumorales de hígado<sup>120</sup>. Además, Chang et al. propusieron en 2018 que ARID1A funciona como inhibidor de el factor pro-oncogénico YAP, de manera que la ausencia de ARID1A se traduce en la acumulación nuclear de YAP<sup>182</sup>. Teniendo en cuenta que el empleo de la vía YAP por parte de los tumores, para generación de bucles de retroalimentación positiva y la estabilización de los fenotipos CAFs y del TME, ya ha sido descrito con anterioridad por otros grupos<sup>117,118</sup>, se hipotetizó sobre la idea de que la pérdida de ARID1A promoviese la secreción de CXCL16 y la activación de un bucle de retroalimentación positiva a través de la vía ERK/pax-FAK-Scr/YAP (Figura 17). Los resultados muestran que efectivamente, tanto la neutralización de CXCL16 como la inhibición del CXCR6, lidera una disminución de la activación de toda esta cascada de señalización, que acababa desencadenando en la reversión de los efectos observados, causados por la hiperactivación de la vía CXCR6/CXCL16. Demostrándose así un rol para CXCL16 en las células de CE con ARID1A alterado, por el cual, a través del eje CXCR6/CXCL16 y la vía molecular ERK/pax-FAK/YAP, generan un bucle de retroalimentación positiva que da lugar al establecimiento de microambientes pro-tumorigénicos estables, en el CE. Resultados similares han sido observados en tumores de mama y próstata<sup>183</sup>, demostrándose la importancia biológica y clínica del eje CXCR6/CXCL16 en la activación de mecanismos moleculares involucrados en la progresión tumoral del CE (figura 148).

En general, en este trabajo se demuestra que, tanto el bloqueo de CXCL16 como la inhibición de CXCR6, desembocan en una reversión de los fenotipos agresivos causados por las células de CE con alteraciones de ARID1A (tanto en células tumorales con expresión salvaje de ARID1A como en las células estromales). Por ello, en esta tesis se propone que la disrupción del eje CXCR6/CXCL16 podría ser una prometedora estrategia terapéutica para los tumores de CE con mutaciones de *ARID1A*, que aborde a la vez tanto a las mismas células tumorales como al TME. Señalándose así el eje CXCR6/CXCL16 como una putativa diana terapéutica para el CE con mutaciones para *ARID1A*.



**Figura 148. Resumen gráfico del modelo propuesto en el bloque de objetivos 2.** A) Esquema propuesto de las consecuencias de bloquear la actividad del eje CXCR6/CXCL16 mediante la neutralización de CXCL16 o mediante la inhibición de CXCR6, en el TME de los CE con pérdida de ARID1A. Creado con BioRender.com





# 6. CONCLUSIONES

*“Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo”*

**Aristóteles**





- **Primera**

La pérdida de ARID1A per se no es suficiente para promover la iniciación del carcinoma endometrial.

- **Segunda**

La pérdida de ARID1A en un contexto oncogénico endometrial previamente establecido, promueve el incremento de la proliferación celular y la evasión apoptótica, debido a la evasión del punto de control del ciclo celular G2/M.

- **Tercera**

La pérdida de ARID1A en un contexto oncogénico endometrial previamente establecido, promueve en las células epiteliales endometriales la adquisición de fenotipos más mesenquimales, promoviendo un aumento de las capacidades migratorias e invasivas por medio de la hiperactivación de la vía de las ERK/MAPK.

- **Cuarta**

La pérdida de ARID1A en un contexto oncogénico endometrial previamente establecido, promueve la evasión de la muerte apoptótica inducida por el daño en DNA de rotura de doble cadena, generado por los tratamientos con etopósido, por medio de la evasión de la vía de detección del daño al DNA ATM/ATR.

- **Quinta**

La pérdida de ARID1A en un contexto oncogénico endometrial previamente establecido, promueve el incremento de expresión de HDAC6, el cual es el responsable de la adquisición de programas de EMT.

- **Sexta**

El incremento de expresión de HDAC6 producido en las células tumorales endometriales con alteraciones de ARID1A es el responsable de la resistencia a la apoptosis inducida por daño DBS del DNA.



- **Séptima**

Las células de CE con alteraciones de ARID1A promueven, de manera paracrina, la adquisición de programas de EMT y capacidades migratorias, invasivas y metastáticas en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.

- **Octava**

Las células de CE con alteraciones de ARID1A promueven el reclutamiento y la activación de células estromales del TME endometrial modulando sus funciones pro-tumorogénicas.

- **Novena**

Las células de CE con alteraciones de ARID1A poseen un perfil de secreción alterado, mostrando una mayor secreción de quimioquinas entre las que destaca CXCL16.

- **Décima**

Las células de CE con alteraciones de ARID1A poseen hiperactivado el eje CXCR6/CXCL16, y a su vez promueven, de forma paracrina, su activación en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.

- **Undécima**

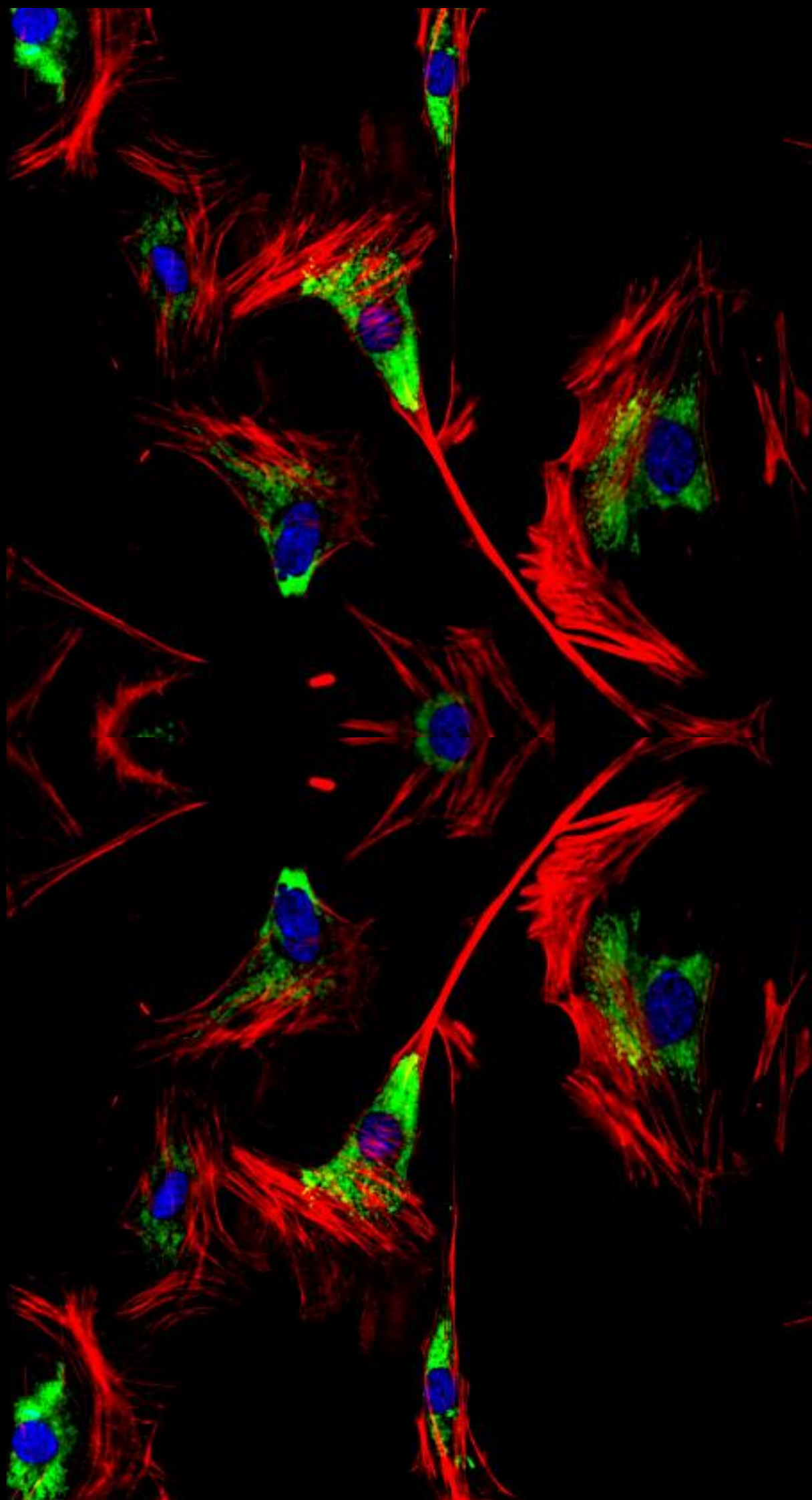
El incremento de la actividad del eje CXCR6/CXCL16 es el responsable de la adquisición de programas de EMT y capacidades migratorias, invasivas y metastáticas en las células de CE con expresión salvaje de ARID1A.

- **Duodécima**

Las células de CE con alteraciones de ARID1A poseen hiperactivado el eje CXCR6/CXCL16 y promueven su activación en las células estromales, generando un bucle de retroalimentación positiva.

- **Decimotercera**

El incremento de la actividad del eje CXCR6/CXCL16 es el responsable del reclutamiento y la activación de células estromales del TME endometrial modulando sus funciones pro-tumorogénicas.



## 7. REFERENCIAS

*“Lo que conocemos es una gota, lo que no conocemos es un océano”*

**Isaac Newton**





1. Pawlina W. *Ross histología : texto y atlas : correlación con biología molecular y celular*. 8ª ed. (Ross MH, ed.). Wolters Kluwer; 2019.
2. Cáncer de endometrio-útero - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Accessed July 3, 2022. [https://seom.org/171-Información al Público - Patologías/cancer-de-endometrio-utero](https://seom.org/171-Información%20al%20Público%20-%20Patologías/cancer-de-endometrio-utero)
3. Útero: Anatomía, vascularización, histología, funciones | Kenhub. Accessed July 3, 2022. <https://www.kenhub.com/es/librariya/anatomia-es/utero-es>
4. Endometrial cancer statistics | World Cancer Research Fund International. Accessed July 3, 2022. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/endometrial-cancer-statistics/>
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/CAAC.21708
6. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15(1):10-17. doi:10.1016/0090-8258(83)90111-7
7. Suarez AA, Felix AS, Cohn DE. Bokhman Redux: Endometrial cancer “types” in the 21st century. *Gynecol Oncol*. 2017;144(2):243-249. doi:10.1016/J.YGYNO.2016.12.010
8. Piulats JM, Guerra E, Gil-Martín M, et al. Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2017;145(1):200-207. doi:10.1016/J.YGYNO.2016.12.015
9. Megino-Luque C, Sisó P, Mota-Martorell N, et al. ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma. *Mol Oncol*. Published online March 2, 2022. doi:10.1002/1878-0261.13193
10. Masood M, Singh N. Endometrial carcinoma: changes to classification (WHO 2020). *Diagnostic Histopathol*. 2021;27(12):493-499. doi:10.1016/J.MPDHP.2021.09.003
11. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73. doi:10.1038/nature12113
12. Soumerai TE, Donoghue MTA, Bandlamudi C, et al. Clinical utility of prospective molecular characterization in advanced endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;24(23):5939-5947. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0412
13. Oza AM, Pignata S, Poveda A, et al. Randomized phase II trial of ridaforolimus in advanced endometrial carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3576-3582. doi:10.1200/JCO.2014.58.8871
14. Treating Endometrial Cancer. Accessed July 10, 2022. <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/treating.html>
15. Advances in Endometrial Cancer Research - NCI. Accessed September 3, 2022. <https://www.cancer.gov/types/uterine/research>
16. Immunotherapy for Uterine (Endometrial) Cancer - Cancer Research Institute (CRI). Accessed September 3, 2022. <https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/cancer-types/uterine-endometrial-cancer>
17. Targeted Therapy for Endometrial

- Cancer. Accessed September 3, 2022.  
<https://www.cancer.org/cancer/en-dometrial-cancer/treating/targeted-therapy.html>
18. Causes of treatment failure in patients with endometrial cancer treated with postoperative radiotherapy. Accessed July 15, 2022.  
<https://www.termedia.pl/Causes-of-treatment-failure-in-patients-with-endometrial-cancer-treated-with-postoperative-radiotherapy,4,14205,1,1.html>
  19. Sahoo SS, Zhang XD, Hondermarck H, Tanwar PS. The Emerging Role of the Microenvironment in Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11).  
doi:10.3390/CANCERS10110408
  20. Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):405-417.  
doi:10.1093/HUMUPD/DMM009
  21. Tratar UL, Horvat S, Cemazar M. Transgenic mouse models in cancer research. *Front Oncol*. 2018;8(JUL):268.  
doi:10.3389/FONC.2018.00268/BIBTEX
  22. Kim H, Kim M, Im S-K, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes Cre-loxP System. *Lab Anim Res*. 2018;34(4):147-159.  
doi:10.5625/lar.2018.34.4.147
  23. Pallares J, Bussaglia E, Martínez-Guitarte JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol* 2005 185. 2004;18(5):719-727.  
doi:10.1038/modpathol.3800347
  24. Mirantes C, Eritja N, Dosil MA, et al. An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *DMM Dis Model Mech*. 2013;6(3):710-720.  
doi:10.1242/DMM.011445/258755/AM/AN-INDUCIBLE-KNOCK-OUT-MOUSE-TO-MODEL-CELL
  25. Maru Y, Hippo Y. Two-Way Development of the Genetic Model for Endometrial Tumorigenesis in Mice: Current and Future Perspectives.  
doi:10.3389/fgene.2021.798628
  26. Matthews HK, Bertoli C, M Bruin RA. Cell cycle control in cancer.  
doi:10.1038/s41580-021-00404-3
  27. Panda SK, Ray S, Nayak SR, Behera S, Bhanja SS, Acharya V. A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer. *J Med Sci*. Published online 2019. doi:10.5005/jp-journals-10045-00138
  28. Library WO, Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *Invit Rev J Pathol J Pathol*. 2012;226:352-364.  
doi:10.1002/path.3022
  29. Ding L, Cao J, Lin W, et al. Molecular Sciences The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer.  
doi:10.3390/ijms21061960
  30. Lin ZP, Zhu YL, Ratner ES. Targeting Cyclin-Dependent Kinases for Treatment of Gynecologic Cancers. *Front Oncol*. 2018;8(AUG).  
doi:10.3389/FONC.2018.00303
  31. Visconti R, Della Monica R, Grieco D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. Published online 2016.

- doi:10.1186/s13046-016-0433-9
32. Anand SK, Sharma A, Singh N, Kakkar P. Entrenching role of cell cycle checkpoints and autophagy for maintenance of genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. 2020;86. doi:10.1016/J.DNAREP.2019.102748
  33. Megino-Luque C, Moiola CP, Molins-Escuder C, et al. Small-molecule inhibitors (Smis) as an effective therapeutic strategy for endometrial cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1-26. doi:10.3390/cancers12102751
  34. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-817. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.015
  35. Kantidze OL, Velichko AK, Luzhin A V., Petrova N V., Razin S V. Synthetically Lethal Interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends in Cancer*. 2018;4(11):755-768. doi:10.1016/j.trecan.2018.09.007
  36. Balmus G, Pilger D, Coates J, et al. ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nat Commun*. 2019;10(1):1-18. doi:10.1038/s41467-018-07729-2
  37. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet*. 2014;30(8):326-339. doi:10.1016/j.tig.2014.06.003
  38. Mhaweche-Fauceglia P, Wang D, Kim G, et al. Expression of DNA repair proteins in endometrial cancer predicts disease outcome. *Gynecol Oncol*. 2014;132(3):593-598. doi:10.1016/J.YGYNO.2014.02.002
  39. Liu J, Jiang P, Chen X, et al. Construction of a nine DNA repair-related gene prognostic classifier to predict prognosis in patients with endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1-15. doi:10.1186/S12885-020-07712-5/FIGURES/11
  40. Gachechiladze M, Skarda J, Bouchalova K, Soltermann A, Joerger M. Predictive and Prognostic Value of DNA Damage Response Associated Kinases in Solid Tumors. *Front Oncol*. 2020;10:2346. doi:10.3389/FONC.2020.581217/BI BTEX
  41. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45. doi:10.1016/J.CELL.2016.06.028
  42. Mirantes C, Espinosa I, Ferrer I, Dolcet X, Prat J, Matias-Guiu X. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(10):1973-1981. doi:10.1016/J.HUMPATH.2013.04.009
  43. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/J.CELL.2009.11.007
  44. Troncoso D, Perpiñan IM, Mancera SAA, et al. Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Medica*. 2017;58(4). doi:10.11144/JAVERIANA.UMED58-4.TEMM
  45. Yeung KT, Yang J, Yang CJ. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. Published online 2016. doi:10.1002/1878-0261.12017
  46. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2019;29(3):212-226. doi:10.1016/J.TCB.2018.12.001
  47. Dongre A, Weinberg RA. New

- insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;20(2):69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
48. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
  49. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
  50. Colas E, Pedrola N, Devis L, et al. The EMT signaling pathways in endometrial carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(10):715-720. doi:10.1007/S12094-012-0866-3
  51. Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective . Accessed July 16, 2022. <https://orca.cardiff.ac.uk/id/eprint/88101/>
  52. Parker AL, Benguigui M, Fornetti J, et al. Current challenges in metastasis research and future innovation for clinical translation. *Clin Exp Metastasis*. 2022;39(2):263-277. doi:10.1007/S10585-021-10144-5
  53. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*. 2019;24(1):65-78. doi:10.1016/J.STEM.2018.11.011
  54. Casquero F. Guía de tumores Ginecológicos. oncológia radioterápica.
  55. Mao W, Wei S, Yang H, et al. Clinicopathological study of organ metastasis in endometrial cancer. *Future Oncol*. 2020;16(10):525-540. doi:10.2217/FON-2020-0017
  56. Kurra V, Krajewski KM, Jagannathan J, Giardino A, Berlin S, Ramaiya N. Typical and atypical metastatic sites of recurrent endometrial carcinoma. *Cancer Imaging*. 2013;13(1):113. doi:10.1102/1470-7330.2013.0011
  57. Brooks RA, Fleming GF, Lastra RR, et al. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(4). doi:10.3322/CAAC.21561
  58. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10023):1094-1108. doi:10.1016/S0140-6736(15)00130-0
  59. Queckbörner S, Syk Lundberg E, Gemzell-Danielsson K, Davies LC. Endometrial stromal cells exhibit a distinct phenotypic and immunomodulatory profile. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-15. doi:10.1186/S13287-019-1496-2/FIGURES/5
  60. Felix AS, Weissfeld J, Edwards R, Linkov F. Future Directions in the Field of Endometrial Cancer Research: The Need to Investigate the Tumor Microenvironment. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(2):139. Accessed July 16, 2022. /pmc/articles/PMC2933750/
  61. Jiménez-Ayala M, Portillo BJ-A. Cytology of the Normal Endometrium – Cycling and Postmenopausal. *Endometrial Adenocarcinoma Prev Early Diagnosis*. 2008;17:32-39. doi:10.1159/000117494
  62. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54. doi:10.1038/35094059
  63. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*.

- 2004;4(11):839-849.  
doi:10.1038/NRC1477
64. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.* 2011;17(3):320-329. doi:10.1038/NM.2328
  65. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol.* 2020;30(16):R921-R925. doi:10.1016/J.CUB.2020.06.081
  66. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013
  67. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* 2021;11(4):933-959. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1808
  68. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 2020 203. 2020;20(3):174-186. doi:10.1038/s41568-019-0238-1
  69. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol* 2021 1812. 2021;18(12):792-804. doi:10.1038/s41571-021-00546-5
  70. Pereira BA, Vennin C, Papanicolaou M, et al. CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer. *Trends in Cancer.* 2019;5(11):724-741. doi:10.1016/J.TRECAN.2019.09.010
  71. Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev.* 2021;101(1):147-176. doi:10.1152/PHYSREV.00048.2019
  72. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174-186. doi:10.1038/s41568-019-0238-1
  73. Hanley C, Bianchini F, Shi S, et al. Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. Published online 2021. doi:10.3389/fcell.2021.655152
  74. Simon T, Salhia B. Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations With Diverse and Dynamic Roles in the Tumor Microenvironment. *Mol Cancer Res.* 2022;20(2):183-192. doi:10.1158/1541-7786.MCR-21-0282
  75. Pradip D, Jennifer A, Nandini D. Cancer-Associated Fibroblasts in Conversation with Tumor Cells in Endometrial Cancers: A Partner in Crime. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). doi:10.3390/IJMS22179121
  76. Teng F, Tian WY, Wang YM, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1). doi:10.1186/S13045-015-0231-4
  77. Tanwar PS, Zhang LH, Roberts DJ, Teixeira JM. Stromal deletion of the APC tumor suppressor in mice triggers development of endometrial cancer. *Cancer Res.* 2011;71(5):1584-1596. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3166
  78. Subramaniam KS, Omar IS, Kwong SC, et al. Cancer-associated fibroblasts promote endometrial cancer growth via activation of interleukin-6/STAT-3/c-Myc pathway. *Am J Cancer Res.* 2016;6(2):200. Accessed July 31, 2022. /pmc/articles/PMC4859653/
  79. Teng F, Tian WY, Wang YM, et al.



- Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):1-15. doi:10.1186/S13045-015-0231-4/TABLES/2
80. Xu S, Tang C. The Role of ARID1A in Tumors: Tumor Initiation or Tumor Suppression? *Front Oncol.* 2021;11:3891. doi:10.3389/FONC.2021.745187/BI BTEX
  81. Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov.* 2013;3(1):35-43. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0361
  82. Wu RC, Wang TL, Shih IM. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):655. doi:10.4161/CBT.28411
  83. Mullen J, Kato S, Sicklick JK, Kurzrock R. Targeting ARID1A mutations in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2021;100:102287. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102287
  84. Lu C, Allis CD. SWI/SNF complex in cancer. *Nat Genet.* 2017;49(2):178-179. doi:10.1038/ng.3779
  85. Wilson BG, Roberts CWM. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev | CANCER.* 2011;11:481. doi:10.1038/nrc3068
  86. Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: Another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov.* 2013;3(1):35-43. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0361
  87. Mathur R. ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacol Ther.* 2018;190:15-23. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2018.05.001
  88. Pavlidou EN, Balis V. Diagnostic significance and prognostic role of the ARID1A gene in cancer outcomes (Review). *World Acad Sci J.* 2020;2(2):49-64. doi:10.3892/WASJ.2020.37/HTML
  89. Guan B, Suryo Rahmanto Y, Wu RC, et al. Roles of deletion of Arid1a, a tumor suppressor, in mouse ovarian tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(7). doi:10.1093/JNCI/DJU146
  90. Sun X, Wang SC, Wei Y, et al. Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2017;32(5):574-589.e6. doi:10.1016/J.CCELL.2017.10.007
  91. Mathur R, Alver BH, San Roman AK, et al. ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice. *Nat Genet.* 2017;49(2):296-302. doi:10.1038/NG.3744
  92. Wilson MR, Reske JJ, Holladay J, et al. ARID1A and PI3-kinase pathway mutations in the endometrium drive epithelial transdifferentiation and collective invasion. *Nat Commun.* Published online 2019. doi:10.1038/s41467-019-11403-6
  93. Zhai Y, Kuick R, Tipton C, et al. Arid1a inactivation in an Apc - and Pten-defective mouse ovarian cancer model enhances epithelial differentiation and prolongs survival. 2016;(September 2015):21-30. doi:10.1002/path.4599
  94. Alldredge JK, Eskander RN. EZH2 inhibition in ARID1A mutated clear cell and endometrioid ovarian and endometrioid endometrial cancers. Published online 2017:1-9. doi:10.1186/s40661-017-0052-y
  95. Toumpeki C, Liberis A, Tsirkas I, et al. The Role of ARID1A in Endometrial Cancer and the Molecular Pathways

- Associated With Pathogenesis and Cancer Progression. *In Vivo (Brooklyn)*. 2019;33(3):659. doi:10.21873/INVIVO.11524
96. Yen TT, Miyamoto T, Asaka S, et al. Loss of ARID1A expression in endometrial samplings is associated with the risk of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2018;150(3):426-431. doi:10.1016/J.YGYNO.2018.06.025
  97. Wijewardhane N, Dressler L, Ciccarelli FD. Normal Somatic Mutations in Cancer Transformation. *Cancer Cell*. 2021;39(2):125-129. doi:10.1016/J.CCELL.2020.11.002
  98. Gibson WJ, Hoivik EA, Halle MK, et al. The genomic landscape and evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis. *Nat Genet*. 2016;48(8):848-855. doi:10.1038/ng.3602
  99. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J*. 2013;280(3):775-793. doi:10.1111/febs.12079
  100. Bitler BG, Wu S, Park PH, et al. ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. *Nat Cell Biol*. 2017;19(8):962-973. doi:10.1038/ncb3582
  101. Zhou B, Liu D, Tan Y. Role of HDAC6 and Its Selective Inhibitors in Gastrointestinal Cancer. doi:10.3389/fcell.2021.719390
  102. Cao J, Lv W, Wang L, et al. Ricolinostat (ACY-1215) suppresses proliferation and promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma via miR-30d/PI3K/AKT/mTOR and ERK pathways. *Cell Death Dis*. 2018;9(8). doi:10.1038/s41419-018-0788-2
  103. Li T, Zhang C, Hassan S, et al. Histone deacetylase 6 in cancer. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1-10. doi:10.1186/S13045-018-0654-9/METRICS
  104. Li T, Zhang C, Hassan S, et al. Histone deacetylase 6 in cancer. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1-10. doi:10.1186/s13045-018-0654-9
  105. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. doi:10.1111/febs.12079
  106. Mobley RJ, Raghu D, Duke LD, et al. MAP3K4 Controls the Chromatin Modifier HDAC6 during Trophoblast Stem Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*. 2017;18(10):2387-2400. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.030
  107. Chaudhary N, Nakka KK, Chavali PL, Chatterjee S, Chattopadhyay S. SMAR1 coordinates HDAC6-induced deacetylation of Ku70 and dictates cell fate upon irradiation. *Cell Death Dis* 2014 510. 2014;5(10):e1447-e1447. doi:10.1038/cddis.2014.397
  108. Megino-Luque C, Sis P, Mota-Martorell N, et al. ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma. *Mol Oncol*. 2022;16:2235. doi:10.1002/1878-0261.13193
  109. Peng X, Li L, Chen J, et al. Discovery of Novel Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors with Enhanced Antitumor Immunity of Anti-PD-L1 Immunotherapy in Melanoma. *Cite This J Med Chem*. 2434;2022. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c01863
  110. Psilopatis I, Pergaris A, Giaginis C, Theocharis S. Histone Deacetylase Inhibitors: A Promising Therapeutic Alternative for Endometrial Carcinoma. Published online 2021. doi:10.1155/2021/7850688
  111. Zheng Y, Yang X, Wang C, et al. HDAC6, modulated by miR-206,



- promotes endometrial cancer progression through the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-12. doi:10.1038/s41598-020-60271-4
112. Xiao G, Wang X, Wang J, et al. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms. *Oncotarget*. 2015;6(16):14165-14178. doi:10.18632/ONCOTARGET.3690
113. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K, Kupnicka P, et al. The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 3490. 2021;22(7):3490. doi:10.3390/IJMS22073490
114. Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H, Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2010;1806(1):42-49. doi:10.1016/J.BBCAN.2010.01.004
115. Shabgah AG, Qasim MT, Mostafavi SM, et al. CXCL16 chemokine ligand 16: a Swiss army knife chemokine in cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2021;23. doi:10.1017/ERM.2021.7
116. Peng Y, Ma J, Lin J. Activation of the CXCL16/CXCR6 Axis by TNF- $\alpha$  Contributes to Ectopic Endometrial Stromal Cells Migration and Invasion. *Reprod Sci*. 2019;26(3):420-427. doi:10.1177/1933719118776797
117. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):637-646. doi:10.1038/ncb2756
118. Wang S, Englund E, Kjellman P, et al. CCM3 is a gatekeeper in focal adhesions regulating mechanotransduction and YAP/TAZ signalling. *Nat Cell Biol* 2021 237. 2021;23(7):758-770. doi:10.1038/s41556-021-00702-0
119. Hsu PC, Yang CT, Jablons DM, You L. The Crosstalk between Src and Hippo/YAP Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancers (Basel)*. 2020;12(6). doi:10.3390/CANCERS12061361
120. Marquard S, Thomann S, Weiler SME, et al. Yes-associated protein (YAP) induces a secretome phenotype and transcriptionally regulates plasminogen activator Inhibitor-1 (PAI-1) expression in hepatocarcinogenesis. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1-15. doi:10.1186/S12964-020-00634-6/FIGURES/7
121. NCBI Blast:gi|154816178. Accessed September 9, 2022. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
122. Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC, Wang Z. ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. Published online 2008. Accessed August 25, 2022. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
123. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W566-W570. doi:10.1093/NAR/GKV468
124. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*. 2018;173(2):291-304.e6. doi:10.1016/J.CELL.2018.03.022
125. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al.

- Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269). doi:10.1126/SCISIGNAL.2004088/SUPPL\_FILE/2004088\_TABLES2.XLS
126. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
127. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* 2020 386. 2020;38(6):675-678. doi:10.1038/s41587-020-0546-8
128. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9
129. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/PNAS.0506580102/SUPPL\_FILE/06580FIG7.JPG
130. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. 2011;27(12):1739-1740. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTR260
131. Desai NN, Kennard EA, Kniss DA, Friedman CI. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil Steril*. 1994;61(4):760-766. doi:10.1016/S0015-0282(16)56659-X
132. Liu G, Xu P, Fu Z, et al. Prognostic and Clinicopathological Significance of. 2017;4525(May):4517-4525. doi:10.1002/jcb.26109
133. Lara-Gonzalez P, Moyle MW, Budrewicz J, Mendoza-Lopez J, Oegema K, Desai A. The G2-to-M Transition Is Ensured by a Dual Mechanism that Protects Cyclin B from Degradation by Cdc20-Activated APC/C. *Dev Cell*. 2019;51(3):313-325.e10. doi:10.1016/J.DEVCEL.2019.09.005
134. Okazaki R, Yamazoe K, Inoue YH. Nuclear Export of Cyclin B Mediated by the Nup62 Complex Is Required for Meiotic Initiation in Drosophila Males. *Cells*. 2020;9(2). doi:10.3390/CELLS9020270
135. Toyoshima F, Moriguchi T, Wada A, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J*. 1998;17(10):2728-2735. doi:10.1093/EMBOJ/17.10.2728
136. Muinelo-Romay L, Colas E, Barbazan J, et al. High-risk endometrial carcinoma profiling identifies TGF- $\beta$ 1 as a key factor in the initiation of tumor invasion. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8):1357-1366. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1019
137. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Sudo S, Sakuragi N. MicroRNA-106b modulates epithelial-mesenchymal transition by targeting TWIST1 in invasive endometrial cancer cell lines. *Mol Carcinog*. 2014;53(5):349-359. doi:10.1002/mc.21983
138. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):102-112.

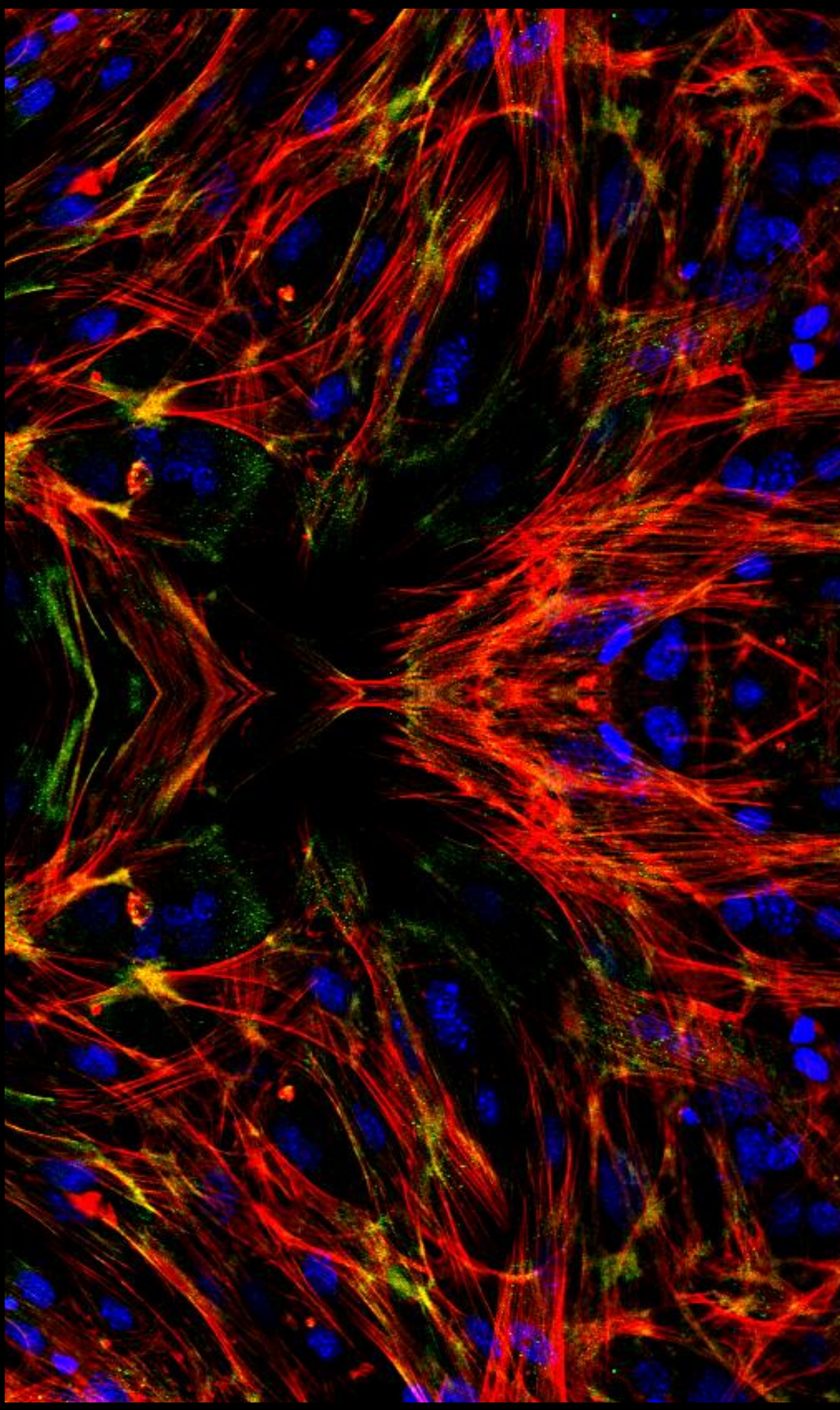
- doi:10.1038/S41556-018-0196-Y
139. Li Y, Che Q, Bian Y, et al. Autocrine motility factor promotes epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer via MAPK signaling pathway. *Int J Oncol.* 2015;47(3):1017-1024. doi:10.3892/IJO.2015.3091
  140. Montserrat N, Mozos A, Llobet D, et al. Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(5):632-643. doi:10.1016/J.HUMPATH.2011.06.021
  141. Eritja N, Chen BJ, Rodríguez-Barrueco R, et al. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer. *Autophagy.* 2017;13(3):608-624. doi:10.1080/15548627.2016.1271512
  142. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004;432(7015):316-323. doi:10.1038/NATURE03097
  143. Sak A, Groneberg M, Stuschke M. DNA-dependent protein kinase: effect on DSB repair, G2/M checkpoint and mode of cell death in NSCLC cell lines. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(9):1205-1219. doi:10.1080/09553002.2019.1642536
  144. Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, et al. Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest.* 2006;116(1):80-89. doi:10.1172/JCI25716
  145. Ryu HW, Shin DH, Lee DH, et al. HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2017;391:162-171. doi:10.1016/J.CANLET.2017.01.033
  146. Park Y, Chui MH, Rahmanto YS, et al. Loss of ARID1A in tumor cells renders selective vulnerability to combined ionizing radiation and PARP inhibitor therapy. *Clin Cancer Res.* 2019;25(18):5584-5593. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-4222
  147. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature.* 2015;520(7547):368-372. doi:10.1038/NATURE14336
  148. Hussain S, Peng B, Cherian M, Song JW, Ahirwar DK, Ganju RK. The Roles of Stroma-Derived Chemokine in Different Stages of Cancer Metastases. *Front Immunol.* 2020;11:1. doi:10.3389/FIMMU.2020.598532
  149. Lee BY, Hogg EKJ, Below CR, et al. Heterocellular OSM-OSMR signalling reprograms fibroblasts to promote pancreatic cancer growth and metastasis. *Nat Commun* 2021 121. 2021;12(1):1-20. doi:10.1038/s41467-021-27607-8
  150. Ferrari N, Ranftl R, Chicherova I, et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-018-07987-0
  151. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-14. doi:10.1038/ncomms10305
  152. Pelon F, Bourachot B, Kieffer Y, et al. Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast

- cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/S41467-019-14134-W
153. Farrugia AJ, Calvo F. Cdc42 regulates Cdc42EP3 function in cancer-associated fibroblasts. *Small GTPases.* 2017;8(1):49-57. doi:10.1080/21541248.2016.1194952
  154. Borst O, Münzer P, Gatidis S, et al. The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositide 3-kinase/Akt signaling. *Circ Res.* 2012;111(10):1297-1307. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.276444
  155. Juric D, Rodon J, Taberero J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase a-selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: Results from the first-in-human study. *J Clin Oncol.* 2018;36(13):1291-1299. doi:10.1200/JCO.2017.72.7107
  156. Wang S, Nassour Ibrahim, Xiao S, et al. SWI/SNF component ARID1A restrains pancreatic neoplasia formation. *Gut.* 2019;68:1259-1270. doi:10.1136/gutjnl-2017-315490
  157. Guan B, Suryo Rahmanto Y, Wu RC, et al. Roles of deletion of Arid1a, a tumor suppressor, in mouse ovarian tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(7). doi:10.1093/JNCI/DJU146
  158. Luo Q, Wu • Xiaowei, Chang W, et al. ARID1A prevents squamous cell carcinoma initiation and chemoresistance by antagonizing pRb/E2F1/c-Myc-mediated cancer stemness. *Cell Death Differ.* 2020;27:1981-1997. doi:10.1038/s41418-019-0475-6
  159. Caumanns JJ, Wisman GBA, Berns K, van der Zee AGJ, de Jong S. ARID1A mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2018;1870(2):176-184. doi:10.1016/j.bbcan.2018.07.005
  160. Yano M, Katoh T, Miyazawa M, et al. Clinicopathological correlation of ARID1A status with HDAC6 and its related factors in ovarian clear cell carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-38653-0
  161. Williamson CT, Miller R, Pemberton HN, et al. ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-13. doi:10.1038/ncomms13837
  162. Banerjee S, Stewart J, Porta N, et al. ATARI trial: ATR inhibitor in combination with olaparib in gynecological cancers with ARID1A loss or no loss (ENGOT/GYN1/NCRI). *Int J Gynecol Cancer.* 2021;31(11):ijgc-2021-002973. doi:10.1136/IJGC-2021-002973
  163. Oral Etoposide Shows Modest Activity, against Recurrent Endometrial Cancer - CancerConnect. Accessed July 25, 2022. <https://news.cancerconnect.com/uterine-cancer/oral-etoposide-shows-modest-activity-against-recurrent-endometrial-cancer>
  164. Poplin EA, Liu PY, Delmore JE, et al. Phase II trial of oral etoposide in recurrent or refractory endometrial adenocarcinoma: A Southwest Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 1999;74(3):432-435. doi:10.1006/GYNO.1999.5461
  165. Nakamura Y, Sanai H, Miwa I. Remarkable response of recurrent endometrial adenocarcinoma to daily oral administration of half-dose etoposide. *SAGE open Med case*

- reports. 2018;6:2050313X1881959. doi:10.1177/2050313X18819599
166. Amengual JE, Lue JK, Ma H, et al. First-in-Class Selective HDAC6 Inhibitor (ACY-1215) Has a Highly Favorable Safety Profile in Patients with Relapsed and Refractory Lymphoma. *Oncologist*. 2021;26(3):184-e366. doi:10.1002/ONCO.13673
  167. Muínelo-Romay L, Colas E, Barbazan J, et al. High-risk endometrial carcinoma profiling identifies TGF- $\beta$ 1 as a key factor in the initiation of tumor invasion. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8):1357-1366. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1019
  168. Olea-Flores M, Daniela Zuñiga-Eulogio M, Mendoza-Catalán MA, et al. Molecular Sciences Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. Published online 2019. doi:10.3390/ijms20122885
  169. Haakenson J, Wu JY, Xiang SY, Williams KA, Bai WL, Zhang XH. HDAC6-Dependent Functions in Tumor Cells: Crossroad with the MAPK Pathways. *Crit Rev Oncog*. 2015;20(1-2):65-81. doi:10.1615/CRITREVONCOG.2014012484
  170. Celià-Terrassa T, Bastian C, Liu D, et al. Hysteresis control of epithelial-mesenchymal transition dynamics conveys a distinct program with enhanced metastatic ability. *Nat Commun* 2018 91. 2018;9(1):1-12. doi:10.1038/s41467-018-07538-7
  171. Casas-Arozamena C, Abal M. Endometrial Tumour Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1296:215-225. doi:10.1007/978-3-030-59038-3\_13
  172. Araujo AM, Abaurrea A, Azcoaga P, et al. Stromal oncostatin M cytokine promotes breast cancer progression by reprogramming the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2022;132(7). doi:10.1172/JCI148667
  173. Kasashima H, Duran A, Martinez-Ordoñez A, et al. Stromal SOX2 Upregulation Promotes Tumorigenesis through the Generation of a SFRP1/2-Expressing Cancer-Associated Fibroblast Population. *Dev Cell*. 2021;56(1):95-110.e10. doi:10.1016/J.DEVCEL.2020.10.014
  174. Nicolas AM, Pesic M, Engel E, et al. Inflammatory fibroblasts mediate resistance to neoadjuvant therapy in rectal cancer. *Cancer Cell*. 2022;40(2):168-184.e13. doi:10.1016/J.CCELL.2022.01.004
  175. Chen Y-I, Chang C-C, Hsu M-F, et al. Homophilic ATP1A1 binding induces activin A secretion to promote EMT of tumor cells and myofibroblast activation. *Nat Commun* 2022 131. 2022;13(1):1-20. doi:10.1038/s41467-022-30638-4
  176. Liu J, Chen S, Wang W, et al. Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- $\beta$  pathways. *Cancer Lett*. 2016;379(1):49-59. doi:10.1016/J.CANLET.2016.05.022
  177. Chung B, Esmaeili AA, Gopalakrishna-Pillai S, et al. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. *npj Breast Cancer* 2017 31. 2017;3(1):1-9. doi:10.1038/s41523-017-0008-8
  178. Mei J, Yan Y, Li SY, et al. CXCL16/CXCR6 interaction promotes endometrial decidualization via the PI3K/AKT pathway. *Reproduction*. 2019;157(3):273-282. doi:10.1530/REP-18-0417

179. Christian LS, Wang L, Lim B, et al. Resident memory T&nbsp;cells in tumor-distant tissues fortify against metastasis formation. *CellReports*. 2021;35:109118. doi:10.1016/j.celrep.2021.109118
180. Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nat Commun* 2016 71. 2016;7(1):1-14. doi:10.1038/ncomms13050
181. Helfman DM, Pawlak G. Myosin light chain kinase and acto-myosin contractility modulate activation of the ERK cascade downstream of oncogenic Ras. *J Cell Biochem*. 2005;95(5):1069-1080. doi:10.1002/JCB.20498
182. Chang L, Azzolin L, Di Biagio D, et al. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nat* 2018 5637730. 2018;563(7730):265-269. doi:10.1038/s41586-018-0658-1
183. Mir H, Kapur N, Gales DN, et al. CXCR6-CXCL16 Axis Promotes Breast Cancer by Inducing Oncogenic Signaling. Published online 2021. doi:10.3390/cancers13143568







## 8. ANEXO

*“Si me lleva cien años, será una pena, pero no dejaré de trabajar mientras viva”*

**Marie Curie**



## 8.1. PUBLICACIONES

---

Metabolomic Analysis Points to Bioactive Lipid Species and Acireductone Dioxygenase 1 (ADI1) as Potential Therapeutic Targets in Poor Prognosis Endometrial Cancer.

Gatius, S., Jove, M., **Megino-luque, C.**, Albertí-valls, M., Yeramian, A., Bonifaci, N., Piñol, M., Santacana, M., Pradas, I., Llobet-navas, D., et al. (2022). Metabolomic Analysis Points to Bioactive Lipid Species and Acireductone Dioxygenase 1 (ADI1) as Potential Therapeutic Targets in Poor Prognosis Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*. 14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14122842>.

M-CSF as a therapeutic target in BRAF V600E melanoma resistant to BRAF inhibitors.

Barceló, C., Sisó, P., de la Rosa, I., **Megino-Luque, C.**, Navaridas, R., Maiques, O., Urdanibia, I., Eritja, N., Soria, X., Potrony, M., et al. (2022). M-CSF as a therapeutic target in BRAF V600E melanoma resistant to BRAF inhibitors. *Br. J. Cancer* 127. <https://doi.org/10.1038/S41416-022-01886-4>.

ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma.

**Megino-Luque, C.**, Sis, P., Mota-Martorell, N., UI Navaridas, R., Es De La Rosa, I., Urdanibia, I., Albert I-Valls, M., Santacana, M., Pinyol, M., Uria Bonifaci, N., et al. (2022). ARID1A-deficient cells require HDAC6 for progression of endometrial carcinoma. *Mol. Oncol.* 16, 2235. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13193>.

ENDOG Impacts on Tumor Cell Proliferation and Tumor Prognosis in the Context of PI3K/PTEN Pathway Status.

Barés, G., Beà, A., Hernández, L., Navaridas, R., Felip, I., **Megino, C.**, Blasco, N., Nadeu, F., Campo, E., Llovera, M., et al. (2021). ENDOG Impacts on Tumor Cell Proliferation and Tumor Prognosis in the Context of PI3K/PTEN Pathway Status. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 3803 13, 3803.

Small-Molecule Inhibitors (SMIs) as an Effective Therapeutic Strategy for Endometrial Cancer.

**Megino-Luque, C.**, Moiola, C.P., Molins-Escuder, C., López-Gil, C., Gil-Moreno, A., Matias-Guiu, X., Colas, E., and Eritja, N. (2020). Small-molecule inhibitors (Smis) as an effective therapeutic strategy for endometrial cancer. *Cancers (Basel)*. 12, 1-26. <https://doi.org/10.3390/cancers12102751>.

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

Felip, I., Moiola, C.P., **Megino-Luque, C.**, Lopez-Gil, C., Cabrera, S., Solé-Sánchez, S., Muñoz-Guardiola, P., Megias-Roda, E., Pérez-Montoyo, H., Alfon, J., et al. (2019). Therapeutic potential of the new TRIB3-mediated cell autophagy anticancer drug ABTL0812 in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 153, 425-435. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.03.002>.

T-Type calcium channels as potential therapeutic targets in vemurafenib-resistant BRAFV600E melanoma: TTCCs are therapy target in BRAFV600E melanoma.

Barceló, C., Sisó, P., Maiques, O., García-Mulero, S., Sanz-Pamplona, R., Navaridas, R., **Megino, C.**, Felip, I., Urdanibia, I., Eritja, N., et al. (2019). T-Type calcium channels as potential therapeutic targets in vemurafenib-resistant BRAFV600E melanoma: TTCCs are therapy target in BRAFV600E melanoma. *J. Invest. Dermatol.* <https://doi.org/10.1016/J.JID.2019.11.014>.

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

Dosil, M.A., Navaridas, R., Mirantes, C., Tarragona, J., Eritja, N., Felip, I., Urdanibia, I., **Megino, C.**, Domingo, M., Santacana, M., et al. (2019). Tumor suppressive function of E2F-1 on PTEN-induced serrated colorectal carcinogenesis. *J. Pathol.* 247, 72-85. <https://doi.org/10.1002/path.5168>.



