



Universitat de Lleida

Estudi del TGF- β en processos de tumorogènesi i avaluació de la Metformina com a potencial fàrmac anticancerígen

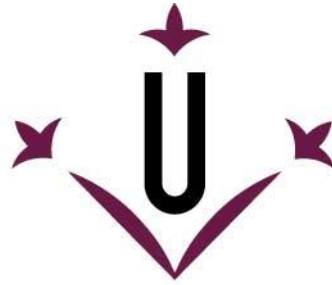
Anna Ruiz Mitjana

<http://hdl.handle.net/10803/689116>

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

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

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



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Estudi del TGF- β en processos de tumorogènesi i avaluació de la Metformina com a potencial fàrmac anticancerígen

Anna Ruiz Mitjana

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

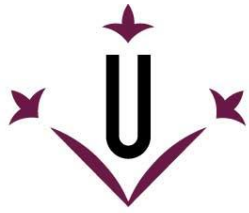
Director/a

Dr. Xavier Dolcet Roca

Tutor/a

Dr. Xavier Dolcet Roca

2023

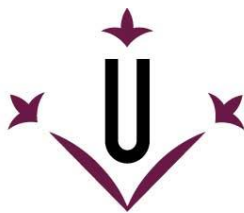


Universitat de Lleida



**Estudi del TGF- β en processos de
tumorogènesi i avaluació de la Metformina com
a potencial fàrmac anticancerígen**

Anna Ruiz Mitjana



Universitat de Lleida

El Dr. Xavier Dolcet Roca, catedràtic d'Anatomia Patològica de la Universitat de Lleida,

CERTIFICA

Que la tesi doctoral que porta com a títol “Estudi del TGF- β en processos de tumorigènesi i avaluació de la Metformina com a potencial fàrmac anticancerígen” desenvolupada i presentada per l'Anna Ruiz Mitjana per tal d'optar al títol de Doctor per la Universitat de Lleida, ha estat realitzada sota la seva supervisió i direcció, complint amb tots els requisits necessaris per a ser defensada davant del tribunal d'avaluació corresponent.

I signa la tesi a efectes oportuns a Lleida, 30 de maig de 2023

**Director i tutor
Dr. Dolcet Roca**

*Per a tu, papa
que m'has ensenyat a mirar el món*

“Tenemos que estar en movimiento, trabajar,
soñar cosas a las que dirigimos a toda prisa;
la pobreza de la vida sin sueños
es demasiado horrible de imaginar:
ese tipo de locura es la peor”

Sylvia Plath

Agraïments

Agraïments

“Si sólo hubiera más gente mágica
para ayudarnos a vivir
esta vida extraña...”

Charles Bukowski

El camí de la tesi doctoral no comença el dia que per primera vegada trepitges el laboratori que t’haurà d’acollir durant anys. El camí comença molt abans, amb la curiositat, les ganes, la passió, el buscar-te una beca, un projecte que t’estimuli i un grup que t’aculli. I aquest camí a vegades es va omplint d’entrebancs.

Jo vaig trucar a moltes portes abans de trobar al **Xavi Dolcet**. En aquell moment jo portava molts mesos buscant fer una tesi i ja tenia la frustració molt enquistada a dins meu, però sempre tenia en ment la frase d’una persona important que un dia em va dir: “Anna, paciència y perseverancia son claves de éxito”. Ara, amb la perspectiva que et dona el temps, la veig com una frase una mica cursi. Però en el fons em va ajudar. Així que finalment vaig conèixer al Xavi, i em va acollir al seu laboratori. Realment no tinc paraules Xavi per agrair-te que decidissis apostar per mi aquell dia i que canviessis el rumb de la meva vida. M’has ensenyat el valor de la recerca, de la inquietud, el qüestionar-s’ho tot. Sempre m’has dit que amb la literatura científica es pot demostrar tot, per això l’important és tenir criteri propi. M’has ensenyat a estimar la ciència i m’has donat l’oportunitat de poder investigar lliure, donant forma a les meves idees pròpies, per molt estranyes que fossin, durant un temps en el camp que més m’apassiona que és el de l’oncologia. Gràcies, de veritat.

Poc a poc s’inicia la feina del laboratori i van apareixent persones que t’ajuden, t’aconsellen, et donen altres perspectives i qui acaben formant part de la teva família “no genètica”.

Gràcies **Maria**, companya de laboratori des del primer dia, i amiga. M’has acompanyat durant tots aquests anys. M’agradaria pensar que he après de tu, de la teva bondat, la teva generositat, sempre disposada a ajudar. M’has acompanyat en molts moments personals difícils, i m’has donat un lloc sempre perquè pogués parlar i desfogar-me de les coses que em feien patir. M’has alegrat el dia a dia a la feina! M’has donat ciència i amistat. Gràcies de tot cor.

Gracias **Raúl**, mi otro gran compañero de laboratorio. Gracias por tus ideas, por tu perseverancia. Por enseñarme al mantenimiento de las colonias de ratones, a hacer inyecciones retro orbitales, subcutanias, a hacer cultivos 3D... La lista es infinita.

Gracias por transmitir esa pasión en el trabajo. Vas a ser siempre un gran amigo para mí.

Gracias **Cris**, por ser el perejil de todas las salsas. Una persona cañera, fiestera, ambiciosa, trabajadora, leal. Un buen cóctel. Me acordaré siempre de todo esto de ti y espero que nuestros caminos se crucen de nuevo, de veras!!!

Gràcies **Pol**, ets un bon amic, amb uns bons valors, sempre disposat a ajudar. M'ho he passat molt bé compartint mil i un esmorzars, dinars, sopars... Espero que la vida ens torni a creuar aviat! Ets el pròxim en llegir, junt amb la Gisela i la Inés i em fa molta il·lusió poder arribar junts a la meta!!!

Gràcies **Manel, Lolito!** Dels últims en arribar però que ja s'ha fet un lloc immens al grup. Ets un noi genial, ple d'inquietuts, seràs un bon científic no en tinc cap dubte.

Gracias **Inés**, por las conversaciones de todo tipo, por formar parte de este grupo patonc, que creo llevaremos todos siempre en el corazón. **Cristopher**, de los últimos en llegar, espero que tengas una buena tesis y que consigas todo lo que te propongas, gracias por todo!

Gràcies al vell grup "Patonc". Gràcies **Anna** i gràcies **Núria**. Anna, per haver acceptat ser tribunal de la meva tesi. Em fa una il·lusió eterna perquè confio molt en tu i sé que em faràs pensar moltes possibles noves línies de recerca amb els meus resultats. Gràcies per acollir-me sempre, a l'IRB, a Guimerà. **Núria**, gràcies per fer-me pensar!!! Et considero una persona molt intel·ligent i amb les idees molt clares. Amb tu crec que he tingut converses molt bones. M'has ajudat sempre amb mil i un assumptes. Gràcies de tot cor.

Gràcies a les **MEMitas: Aida**, la alegria de la huerta! Ets una persona genial, atenta, amable, curiosa i generosa. Gràcies per seguir fent créixer la família IRB.

Gràcies **Gisela** pels teus consells i la teva manera de veure la vida. Ets una noia intel·ligent i autèntica que arribarà molt lluny. Gràcies **Anna** per entrar al grup de MEM, per deixar-te conèixer i seguir aprenent amb tu.

Gracias **Carlitos** por las risas, los buenos ratos en cultivos, haciendo siempre bromas como tu hábitat natural y por convertirte pronto en mi amigo.

Gràcies **Andrée** por ser una amiga y por enseñarme a hacer ciencia. Gracias por las infinites conversaciones de mil temas, por la experiència por los buenos consejos.

Gracias **Izaskun**. Nos conocimos des del principio que yo empecé la tesis y más tarde nos hicimos vecinas, encontrándonos mil días por el barrio. Hemos compartido conversaciones de todo tipo y de veras he aprendido mucho de ti. Has sido muy buena amiga y tienes una familia maravillosa. Gracias por todo, todo,

todo. No puedo acabar tu dedicatoria sin antes decirte que me voy siendo fan absoluta de tu frase “Si van a hacer cosas malas, háganlas bien” ;P!!!

Gràcies **Marta** per ajudar-nos a tots amb les mil i una coses que t’hem demanat al llarg de tot aquest temps i per ser una tècnica fantàstica!!

Gracias **Lía**. Mi amiga lectora!! Gracias por tu amistad, por compartir ciencia y libros, por acompañarme a *Poetry Slams* Lleida, por acompañarme en más de una de mis extensas mudanzas por Lleida jaja, por formar parte de mi grupo de amigas. Gracias por tu mente siempre inquieta y por tener siempre la predisposición para estar ahí. Gracias amiga! Te llevo conmigo siempre como tant@s otr@s.

Gracias **Luis** por convertirte en mi amigo en tan poco tiempo. Eres un chico fuerte y una suerte de amigo para tus amigos. Me has escuchado sieeeeeeeeempre y me has dado un espacio seguro donde hablar. Te aprecio mucho ya lo sabes y no quiero perderte nunca.

Gràcies a l'**Isidre** que va ser dels primers en ensenyar-me les tècniques i la manera de funcionar.

Gràcies al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova. A l'**Andrea**, l'**Elisabeth** i la **María Santacana** per tota l'atenció i la feina, per tot el processat de mostres i immunohistoquímiques. Gràcies al **Xavier Matías** i la **Judith Pallarés** per l'avaluació patològica de les mostres.

Gràcies al grup de Neuro: la **Sara**, la **Coral**, l'**Amèlia**, la **Cris**, l'**Ares**, la **Leila**, la **Faridé**. Per compartir laboratori i moments, per aprendre de vosaltres en un àmbit científic diferent. **Sara** ets una científica de cap a peus i ens has portat alegria cada matí que has entrat al lab. **Coral** i **Cris** gràcies per les bones converses de tota mena i per ajudar-me sempre. **Ares**, i **Amèlia**, de les últimes en arribar a neuro, espero que la tesi sigui una època que sapigueu exprimir al màxim i que un cop passeu 'els primers moments crítics', us porti grans records a la memòria sempre. No en tinc cap dubte que teniu tot el necessari perquè sigui així. **Leila** gràcies per ser tan alegre, generosa y divertida. Gràcies **Faridé** per la teva amabilitat i bona companyia a totes hores.

Gràcies a tots els serveis, en especial el servei de Microscopia (**Anaïs**) i el de l'Estabulari. Gràcies **Leti** i **Marc**. Gràcies **Jèssica** per cuidar dels meus ratolins millor que ningú, per totes les converses que hem anat tenint i per escoltar-me sempre.

Gràcies a la meva gran amiga **Elsa**, qui ha viscut amb mi l'experiència de viure a Lleida durant 4 anys. M'has donat un milió de bons moments, amb la teva alegria en estat pur, has sigut i ets com una germana per mi.

I gràcies a la meva altra amiga **Cèlia** per donar-me consells, per escoltar-me, per aportar un punt crític a les coses i fer-me saber què era l'amistat més desinteressada. Espero mantenir aquesta amistat amb vosaltres tota la vida.

Gràcies a la **Vika** i a la **Bárbara**, les primeres companyes de pis que vaig tenir a Lleida. Veniem les tres de fora de Lleida i això va fer que ràpid ens fèssim amigues. Vam viure en un pis senzill però li veiem totes les gràcies del món i on sempre tothom i era benvingut. Durant èpoques em vaig sentir en el “segon Erasmus”!!! Després cadascuna va fer el seu camí però crec que aquell pis el guardarem sempre al cor.

Gràcies **Nando** per facilitar la meva adaptació a Lleida, per ajudar-me amb coses “domèstiques”, per integrar-me als teus grups socials i per poder parlar de TOT amb tu. Aquesta vivència aquí ha sigut mil vegades més fàcil i acollidora gràcies a tu.

Gràcies a la meva amiga **Cris**, amb qui comparteixo professió. Una dona valenta i lluitadora sense límits. T'admiro molt, ja ho saps.

Gràcies **Edu**, que sempre va creure en mi. Diuen que no has de tractar les persones com realment són, sinó com tot el que poden arribar a ser. Gràcies per mirar-me sempre així.

Gràcies **Oriol** per haver acceptat formar part d'aquest tribunal. Recordo quan vas ser professor meu al màster i recordo que sempre m'animaves a fer recerca. T'ho agrairé sempre perquè en part gràcies a tu, no vaig deixar mai de buscar.

Rebeca, tuve la suerte de que nos conociéramos con el programa ASEICA. Me hiciste de 'mentora', me enseñaste una parte de la ciencia que no conocía, hablamos de mil y una cosa y te cogí cariño muy pronto. Gracias por todo lo que has hecho por mí. Y sobretodo gracias por aceptar ser tribunal de mi tesis. Me hace una ilusión inmensa!!! Espero no defraudarte!! ;P

Gràcies **Gemma G.** per acompanyar-me en aquest camí ple d'altibaixos, bifurcacions, dreceres i alguns paranys. M'has donat molta pau.

Gràcies **Laura**, la meva bessona i part essencial del meu món. Vam arribar juntes a la vida i des de llavors diria que no m'has fallat mai. Gràcies per ser tan diferent de mi i a la vegada tan igual. Això m'ha fet aprendre de tu a la mateixa vegada que sabia que mai em sentiria sola i que les meves pors i les meves penes amb tu pesaven la meitat. Hem compartit tant... He après de tu, el teu amor per la teva professió, les teves ganes de lluitar, la teva sensibilitat i empatia innata, la teva alegria, la teva fam de viure. A la meitat del doctorat vas venir de Barcelona a viure amb mi, va ser una època molt esbojarrada, vam discutir més que mai, però també vam fer moltes coses que ja mai més fariem i ens vam cuidar molt.

Vam triar un pis petit amb una terrassa desmesuradament gran i indigna però érem felices amb el sol al dematí i les cerveses al vespre. Des d'aquella terrassa somiàvem i la vida se'ns obria al davant. Això era la felicitat i la sort és que ens en vam adonar a temps.

Ja saps que sempre et dic que ja t'ho he dit tot en aquesta vida, perquè quan estàs tan unit a algú, tot el que diguis resulta redundant. Senzillament gràcies, t'estimo amb bogeria.

Gràcies **Oscar**. Per haver caminat en paral·lel en aquest camí. Una de les infinites coses bones que m'ha portat la tesi és haver-te conegut. Tu fent la residència i jo la tesi. Una fase de les nostres vides finita però que ha acabat desencadenant moltes coses màgiques. Has aguantat moltes fases difícils, i m'has aguantat les últimes setmanes d'escriptura que han estat caòtiques i saturantíssimes. Saps de sobres que has sigut el meu ancoratge a tot quan el món trontollava. Ens hem cuidat. No m'has fallat mai, i per això i tantes altres coses sé que ets la persona amb qui vull compartir la vida. T'estimo en tots els temps verbals, ja ho saps. Ets el meu nínxol.

Gràcies al meus **germans**. Perquè aquest últim any hem passat una època tremendament difícil. Però malgrat les nostres diferències eternes, m'han ensenyat el valor de la paraula família, hem fet pinya i i ens hem anat recomposant. Gràcies a que la família construeix aquesta xarxa invisible, un no cau mai del tot. Gracias **Nieves** por ser una mujer tan fuerte, por tu resiliència y por ayudarnos siempre a todos. Eres increíble.

Gràcies **Júlia**, la meva cosineta. Gràcies per tot el compartit durant aquesta tesi i durant tots aquests anys. T'aprecio i t'estimo molt. Gràcies per ajudar-me amb aquest llibre i fer la portada de la tesi i posar la 'guinda' al pastel, m'ha fet una il·lusió boja.

Finalment, volia acabar dedicant aquesta tesi doctoral als meus dos referents.

Gràcies **Mama**, què puc dir aquí que ja no sàpigues? Els meus últims mesos de tesi han coincidit amb la teva jubilació i retorn al poble. Hem tingut la sort de tenir-nos a prop. M'has ajudat en tantes coses... En veure les coses amb perspectiva, en relativitzar, en canalitzar la por, en tenir eines per la vida. M'has escoltat i t'has interessat per la meva tesi sempre. Has fet sentir que importo i això no té preu. M'has donat un espai segur on poder créixer i anar madurant. Saps que et considero una "súper mama" que ha cuidat d'una família nombrosa i que ha tingut una professió preciosa que és la medicina i que has defensat sempre. M'he vist moltes vegades projectada en tu perquè ets una dona molt especial de qui tothom té bones paraules. Vagis on vagis tothom t'acaba coneixent i apreciament perquè tens un do per la gent i per la vida en general. Gràcies per haver fet possible que estudiés Farmàcia, que pogués triar un camí, per no jutjar-me. Recordes quan volies que fes el màster d'assajos clínics? Tu em deies, és un màster segur, tindràs feina assegurada.

I jo et vaig dir, mama, jo no vull una feina assegurada. Si no puc fer ara, amb 23 anys, el que vull, quan ho faré?

I tu ho vas entendre i vas donar ales a la meva llibertat, com havies fet sempre. Gràcies per, igual que el papa, ser el meu pilar a la terra i estimar-nos tant malgrat totes les nostres arestes ;P.

I finalment, gràcies **Papa**, que sempre m'has fet veure que quan tot fracasa, sempre queda el llenguatge. Recordaré sempre que em vas animar a fer Farmàcia, quan jo encara no sabia pràcticament ni que era això de la investigació. Em vas dir: "si un dia trobes alguna petita cosa investigant, podràs ajudar a molta gent". No sé ben bé què va passar després, però sé que vaig acabar fent Farmàcia i vaig acabar buscant la recerca com a camí. Tinc claríssim que haver arribat aquí, podent escriure uns agraïments en la meva tesi doctoral, no hauria estat possible si no t'hagués tingut de pare. M'has donat una lliçó de vida i penso que probablement m'has convertit en una dona valenta.

T'he admirat i t'admiraré sempre, passi el que passi. Ara, quan no ens podem comunicar sempre amb el llenguatge convencional, jo sempre et dic, Papa, a partir d'ara ens comunicarem amb el llenguatge de l'amor. I continuaré fent-ho cada dia, perquè és el llenguatge universal.

El dia que vaig saber que rebria una beca per fer la tesi doctoral, vaig tenir la necessitat de córrer eufòrica pel passadís del pis de Barcelona i us asseguro que vaig notar que flotava uns metres per sobre del terra. Quan fa pocs dies, definitivament vaig tancar la tesi i vaig enviar els papers, de sobte em vaig adonar que tornava a flotar. El cercle es tanca.

Gràcies a tots els que heu estat, us hagueu quedat o no. Aquests quatre anys he sigut molt feliç. Fer aquesta tesi doctoral m'ha robat molt de temps però m'ha allargat la vida, n'estic segura.

Lleida, Maig de 2023

RESUM-RESUMEN-ABSTRACT

Resum

Les vies de senyalització intracel·lular TGF- β /Smads, PI3K/AKT/mTOR i de les MAPK ERK i p38 són essencials en l'homeòstasi cel·lular. És per això que alteracions en aquestes vies estan altament relacionades amb processos de carcinogènesi. S'ha descrit que en cèl·lules normals o pre-cancerígenes el TGF- β té funcions de supressió tumoral i, per contra, en cèl·lules tumorals el TGF- β té funcions de promoció tumoral. La via PI3K/AKT és una de les principals reguladores de la proliferació cel·lular amb un important regulador negatiu que és el supressor tumoral *Pten*. Mutacions en aquesta via - ja sigui per algun guany de funció o degut a la pèrdua de *Pten*- adquireixen gran rellevància en el desenvolupament d'un procés tumoral. Finalment, la via de les MAPK ERK està principalment implicada en processos de creixement i proliferació, mentre que la MAPK p38 està principalment implicada en la transducció de senyals d'estrès. En la primera part d'aquesta tesi s'han estudiat les funcions del TGF- β en cèl·lules epitelials d'endometri en funció de la polaritat cel·lular provocada per la matriu extracel·lular. S'ha determinat que el TGF- β canvia el seu rol de supressor tumoral a promotor tumoral quan es perd la polaritat cel·lular. En la segona part de la tesi s'ha avaluat la Metformina com a potencial anticancerígen enfront tres entitats tumorals: càncer d'endometri, pròstata i tiroide. La Metformina és un fàrmac utilitzat mundialment que té el gran avantatge d'haver demostrat un perfil de seguretat molt bo amb dècades d'ús. Tot i que la seva acció antineoplàsica està ben documentada, els mecanismes moleculars i cel·lulars de l'acció anticancerígena de la Metformina encara són controvertits. En aquesta tesi s'ha estudiat i caracteritzat la Metformina en diferents models, abordant els mecanismes cel·lulars i moleculars de l'activitat antineoplàsica *in vitro* i *in vivo*. Per una banda, s'han utilitzat línies cel·lulars de càncer i, per altra banda, s'ha utilitzat el model de ratolí deficient en *Pten* que desencadena neoplàsies d'endometri, pròstata i tiroide. Finalment, en la tercera part de la tesi s'han estudiat les funcions de SMAD2/3 en endometri i pròstata deficientes en *Pten*. Avui en dia està àmpliament descrit que en cèl·lules epitelials normals l'activació de les SMADs desencadenada pel TGF- β és una via de supressió tumoral. En aquesta tesi s'ha caracteritzat SMAD2/3 com a supressor tumoral en organoides d'endometri i en teixits de pròstata.

En resum, aquesta tesi s'ha centrat en la caracterització de la via **TGF- β /Smads** en relació a la polaritat cel·lular i a processos neoplàsics i en la **Metformina** com a agent antitumoral.

Resumen

Las vías de señalización intracelular TGF- β /Smads, PI3K/AKT/mTOR y de las MAPK ERK y p38 son esenciales en la homeostasis celular. Por ello, alteraciones en estas vías están altamente relacionadas con procesos de carcinogénesis. Se ha descrito que en células normales o precancerígenas el TGF- β tiene funciones de supresión tumoral y, por el contrario, en células tumorales el TGF- β tiene funciones de promoción tumoral. La vía PI3K/AKT es una de las principales reguladoras de la proliferación celular cuyo importante regulador negativo es el supresor tumoral *Pten*. Mutaciones en esta vía -ya sea por alguna ganancia de función o debido a la pérdida de *Pten*- adquieren gran relevancia en el desarrollo de un proceso tumoral. Por último, la vía de las MAPK ERK está principalmente implicada en procesos de crecimiento y proliferación, mientras que la MAPK p38 está principalmente implicada en la transducción de señales de estrés. En la primera parte de esta tesis se han estudiado las funciones del TGF- β en células epiteliales de endometrio en función de la polaridad celular provocada por la matriz extracelular. Se ha determinado que el TGF- β cambia su rol de supresor tumoral a promotor tumoral cuando se pierde la polaridad celular. En la segunda parte de la tesis se ha evaluado la Metformina como potencial anticancerígeno frente a tres entidades tumorales: cáncer de endometrio, próstata y tiroides. La Metformina es un fármaco utilizado mundialmente que tiene la gran ventaja de haber demostrado un perfil de seguridad muy bueno con décadas de uso. Aunque su acción antineoplásica está bien documentada, los mecanismos moleculares y celulares de la acción anticancerígena de la Metformina son todavía controvertidos. En esta tesis se ha estudiado y caracterizado la Metformina en distintos modelos, abordando los mecanismos celulares y moleculares de la actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo*. Por una parte se han utilizado líneas celulares de cáncer y por otra parte, se ha utilizado el modelo de ratón deficiente en *Pten* que desencadena neoplasias de endometrio, próstata y tiroides. En la tercera y última parte de esta tesis se han estudiado las funciones de SMAD2/3 en endometrio y próstata deficientes en *Pten*. Hoy en día está ampliamente descrito que en células epiteliales normales la activación de las SMAD desencadenada por el TGF- β es una vía de supresión tumoral. En esta tesis se ha caracterizado a SMAD2/3 como supresor tumoral en organoides de endometrio y en tejidos de próstata.

En resumen, esta tesis se ha centrado en la caracterización de la vía **TGF- β /Smads** en relación a la polaridad celular y procesos neoplásicos y en la **Metformina** como agente antitumoral.

Abstract

The TGF- β /Smads, PI3K/AKT/mTOR and MAPK ERK and p38 signalling pathways are essential in cellular homeostasis. Therefore, alterations in these pathways are highly related to carcinogenesis processes. It has been described that in normal or precancerous cells TGF- β has tumor suppressive functions and, by contrast, in tumor cells TGF- β has tumor promoting functions. The PI3K/AKT pathway is one of the main regulators of cell proliferation with an important negative regulator: the tumor suppressor *Pten*. Due to this, mutations in this pathway -either due to some gain of function or due to *Pten* loss- acquire great relevance in the development of a tumor process. Finally, the MAPK ERK pathway is mainly involved in growth and proliferation processes, while MAPK p38 is mainly involved in the transduction of stress signals.

In the first part of this thesis, the functions of TGF- β in endometrial epithelial cells have been studied depending on the cell polarity caused by the extracellular matrix. It has been determined that TGF- β changes its role from tumor suppressor to tumor promoter when cell polarity is lost. In the second part of this thesis Metformin has been evaluated as a potential anticancer agent against three tumor entities: endometrial, prostate and thyroid cancer. Metformin is a drug used worldwide that has the great advantage of having demonstrated a safety profile with decades of use. Although its anti-neoplastic action is well documented, the molecular and cellular mechanisms of Metformin's anticancer action are still controversial. In this thesis Metformin has been studied and characterized in different models, addressing the cellular and molecular mechanisms of the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. On one hand, cancer cell lines have been used. On the other, a *Pten*-deficient mouse model that triggers endometrial, prostate and thyroid neoplasias has been used to test Metformin. In the third and last part of this thesis, the functions of SMAD2/3 in *Pten*-deficient endometrium and prostate have been studied. Today it is widely described that in normal epithelial cells the activation of SMADs triggered by TGF- β is a tumor suppression mechanism. In this thesis, SMAD2/3 have been characterized as tumor suppressor in endometrial organoids and prostate tissues.

In summary, this thesis has focused on the characterization of the **TGF- β /Smads** pathway in relation to cell polarity and neoplastic processes and on **Metformin** as an antitumor drug.

ÍNDEX

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	43
1. El càncer d'endometri	43
1.1. Anatomia de l'úter i l'endometri humans	43
1.2. Anatomia i histologia de l'úter i l'endometri murins.....	44
1.3. Incidència, classificació i tractament del càncer d'endometri.....	45
2. El càncer de pròstata	52
2.1. Anatomia de la pròstata humana	52
2.2. Anatomia i histologia de la pròstata murina.....	53
2.3. Incidència, classificació i tractament del càncer de pròstata.....	53
3. El càncer de tiroide	57
3.1. Anatomia de la tiroide humana.....	57
3.2. Anatomia i histologia de la tiroide murina	57
3.3. Incidència, classificació i tractament del càncer de tiroide.....	58
4. Propietats de les cèl·lules canceroses i polaritat cel·lular	61
5. El TGF- β	63
5.1. Via canònica (SMADs).....	64
5.2. Via no canònica	65
5.3. El TGF- β i el càncer	67
6. El gen supressor tumoral <i>PTEN</i> i la via PI3K/AKT en el càncer	68
6.1. <i>PTEN</i> i càncer d'endometri, pròstata i tiroide	70
7. Les MAPK i el seu paper en processos neoplàsics	71
7.1. ERK	72
7.2. p38.....	73
8. La Transició Epiteli-Mesènquima (EMT)	76
8.1. EMT i càncer.....	77
8.2. Senyalització del TGF- β dependent/independent de SMADs en EMT.....	79
9. La Metformina.....	81
9.1. Estructura de la Metformina	81
9.2. Història de la Metformina	82
9.3. Ús de la Metformina.....	83
9.4. Mecanismes d'acció de la Metformina	84
9.5. Farmacodinàmica i farmacocinètica de la Metformina.....	84
9.6. La Metformina i altres dianes terapèutiques.....	85
10. Reposicionament de fàrmacs.....	90

HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	97
1. Estudiar la pèrdua de polaritat en cèl·lules epitelials d'endometri	97
2. Estudiar els efectes del fàrmac Metformina en processos tumorals	97
3. Estudiar la implicació de SMAD2 i SMAD3 en processos tumorals induïts per la pèrdua de <i>Pten</i>	98
MATERIALS I MÈTODES	103
1. Animals d'experimentació	103
2. Tècniques de biologia cel·lular.....	108
3. Tècniques histològiques	116
4. Tècniques bioquímiques	117
RESULTATS.....	125
1. ESTUDI DE LA PÈRDUA DE POLARITAT EN CÈL·LULES EPITELIALS D'ENDOMETRI	125
1.1. Estudi dels efectes cel·lulars de l'absència de polaritat i matriu extracel·lular en la resposta al TGF- β	127
Resum gràfic del bloc 1.1:.....	137
1.2. Estudi dels mecanismes moleculars i les vies de senyalització regulades per la polaritat cel·lular	138
Resum gràfic del bloc 1.2:.....	147
2. ESTUDI DELS EFECTES DEL FÀRMAC METFORMINA EN PROCESSOS TUMORALS	148
2.1. Estudi <i>in vitro</i> de la Metformina en cèl·lules d'endometri i tiroide, la seva implicació en la resposta del TGF- β i els seus mecanismes moleculars de supressió tumoral	148
2.2. Estudi <i>in vivo</i> de la Metformina en tumors d'endometri, tiroide i pròstata deficients per <i>Pten</i> en ratolí	174
Resum gràfic del bloc 2:.....	186
3. ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DE SMAD2 I SMAD3 EN PROCESSOS TUMORALS INDUÏTS PER LA PÈRDUA DE <i>Pten</i>	187
3.1. Estudi <i>in vitro</i> de la implicació de SMAD2 i SMAD3 en cèl·lules d'endometri ...	188
3.2. Estudi <i>in vivo</i> de la implicació de SMAD2 i SMAD3 en endometri i pròstata.....	191
Resum gràfic del bloc 3:.....	198
DISCUSSIÓ	203
CONCLUSIONS	219
BIBLIOGRAFIA.....	225
ANNEX	249

ABREVIATURES

Abreviatures

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

A: Adenine

ADN: Àcid desoxirribonucleic

Alk5: *Activating receptor-like kinase 5*

AMPK: *5' AMP-activated protein kinase*

ARID1A: *AT-rich interaction domain 1A*

ARN: Àcid ribonucleic

BMPs: *bone morphogenetic proteins*

BPH: *Benign prostatic hyperplasia*

BrdU: *Bromodeoxyuridine*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

C: Cytosine

CE: Càncer d'endometri

CEE: Càncer d'endometri endometriode

CENE: Càncer d'endometri no endometriode

CK8: Citoqueratina 8

CP: Càncer de pròstata

Cre: Recombinasa Cre

CT: Càncer de tiroide

CTNNB1: *Catenin beta 1*

DCC: *Dextran Coated Charcoal*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfòxid

dKO: Doble *Knock Out*

ECM: *Extracellular Matrix*

EGF: *Epithelial Growth Factor*

EIN: *Endometrial intraepithelial neoplasia*

EMT: *Epithelial to mesenchymal transition*

ER: *Estrogen Receptor*

ERK: *Extracellular-signal-regulated-kinase*

EUA: Estats Units d'Amèrica

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FBXW7: *F-box/WD repeat-containing protein 7*

G: Guanine

h: Hores

H&E: Hematoxilina&Eosina

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

IHC: Immunohistoquímica

ITS: *Insulin Transferrin Selenium*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KO: *Knock Out*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

MEM-NA: *Modified Eagle Medium-Non essential amino acids*

Min: minuts

mRNA: *Messenger RNA*

MSI: *Microsatellite instability*

mTORC1: *Mammalian target of rapamycin complex 1*

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

OCT: *Organic Cationic Transporter*

OMS: Organització Mundial de la Salut

ON: *Overnight*

OS: *Overall Survival*

p38: *Mitogen-activated protein kinase 38*

p70S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta 1

PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

PDK1: Pyruvate dehydrogenase kinase 1

PFA: Paraformaldehyd

PHTS: PTEN hamartoma tumors síndromes

PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase

PIN: Prostate intraepithelial neoplasia intraepithelial

PIP₂: Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate

PIP₃: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

POLE: DNA polymerase epsilon catalytic subunit protein

Pten: Phosphatase and tensin homolog 10 (gen en ratolí)

PTEN: Phosphatase and tensin homolog 10 (proteïna en ratolí)

PTEN: Phosphatase and tensin homolog 10 (gen en humà)

q.s.p. quantitat suficient per a

RE: receptors d'estrògens

RFS: Relapse-Free Survival

RT: Room Temperature

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

S.E.M.: Standard error of the mean

SDS: Sodium dodecyl sulphate

Smad: Suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous

Smad2: Suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous 2 (gen en ratolí)

Smad3: Suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous 3 (gen en ratolí)

SMAD2: Suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous 2 (proteïna en ratolí)

SMAD3: Suppressor of mothers against decapentaplegic miscellaneous 3 (proteïna en ratolí)

SNAI1: Snail Family Transcriptional Repressor 1

T: Thymine

TβR: Transforming growth factor receptor

TBS: Tris-buffered saline

TGF-β: Transforming growth factor beta

tKO: triple Knock Out

TNM: Tumor Node Metastasis

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

TWIST1: Twist family bHLH transcription factor 1

VEGFA: Vascular endothelial growth factor A

WT: Wild type

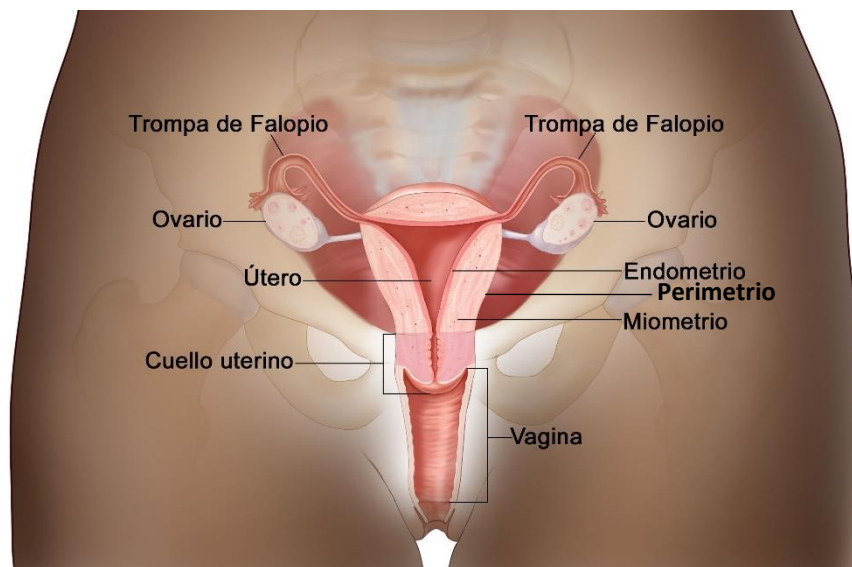
ZEB1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. El càncer d'endometri

1.1. Anatomia de l'úter i l'endometri humans



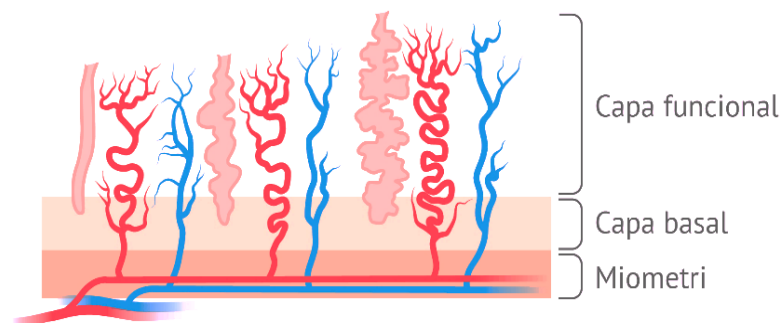
Il·lustració 1: Anatomia del sistema reproductor femení. Font: *Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.* (Adaptació)

El sistema reproductor femení està format per les trompes de Falopi, els ovaris, l'úter i la vagina. L'úter està format per dues estructures: el **cos del úter** que és la zona més ampla formada per una paret gruixuda i, el cèrvix, també anomenat **coll uterí**, que és la zona més estreta i que fa de nexa amb la vagina i el cos de l'úter.

La paret de l'úter a la seva vegada consta de tres capes anomenades a continuació des de més externa a més interna:

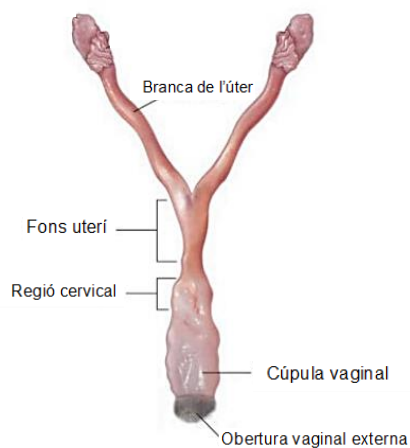
- **Perimetri o túnica serosa:** és la capa més externa. Està formada per peritoneu i teixit connectiu que recobreix l'úter, en concret la capa longitudinal següent que és el miometri. Connecta l'úter amb la cavitat pèlvica.
- **Miometri o túnica muscular:** és la capa intermèdia. Està formada per teixit muscular, vasos sanguinis i nervis i es considera la paret més gruixuda de l'úter.
- **Endometri o túnica mucosa:** és la capa més interna. Està formada per cèl·lules epitelials endometrials que s'organitzen en forma de glàndules (altament secretores) i cèl·lules estromals. Tota aquesta estructura es troba connectada a teixit connectiu on a

més a més, conviuen una àmplia gamma de cèl·lules del sistema immunitari. L'endometri és una capa vascularitzada i en si mateix i està format per dues subcapes: la **capa funcional** superficial i la **capa basal**. La capa funcional és adjacent al lumen uterí i està integrada per epitelí cilíndric amb glàndules secretores que són sensibles a canvis hormonals i és, per tant la capa de cèl·lules que s'expulsa i es reconstrueix durant la menstruació. La capa basal – la més pròxima al miometri –reconstrueix la capa funcional superficial després de cada cicle menstrual (Ross, 2020).



II-lustració 2: Capes de l'endometri. Font: WMA (Web Mèdica Acreditada), Col·legi de Metges de Barcelona.

1.2. Anatomia i histologia de l'úter i l'endometri murins



II-lustració 3: Anatomia de l'úter murí. Font: Treuting et al., 2018. (Adaptació)



II-lustració 4: Histologia de l'endometri murí. Es mostra l'epitelí columnar simple (**fletxes**) que s'estén fins a les glàndules de l'estroma (**asteriscs**). La **I** i la **O** mostren les capes llises del miometri (interior i externa respectivament). Font: Treuting et al., 2018. (Adaptació)

Els ratolins tenen un úter bicorn format per dues branques que s'uneixen distalment en un sol cos anomenat fons uterí. A la part inferior està la regió cervical i després tenim la

cúpula vaginal i l'obertura vaginal externa. L'endometri està disposat dins dels plecs de l'úter i és irrigat per vasos sanguinis, limfàtics i nervis. L'epiteli de la mucosa de l'endometri consisteix en cèl·lules columnars que s'estenen fins a les glàndules tubulars que formen l'estroma endometrial. El miometri està disposat de forma adjacent i està formada per fibres de musculatura llisa i teixit connectiu vascularitzat (Treuting, 2018).

L'Hematoxilina & Eosina (**H&E**) de la il·lustració 4 mostra les zones de l'úter.

1.3. Incidència, classificació i tractament del càncer d'endometri

Epidemiologia

El càncer d'endometri (CE) es considera a avui en dia el segon càncer més freqüent quant a càncers ginecològics, per darrere del càncer de cèrvix. No obstant això, entre el 2014 i el 2018, va ser considerat el segon càncer més prevalent entre les dones, per darrere del càncer de mama, amb una mitjana de 63 anys (Howlader N, 2020).

Per tal de fer-se una idea general de l'impacte d'aquesta malaltia, cal mencionar que durant el 2022 es van diagnosticar **417.367** casos i van morir **97.370** dones **arreu del món** per aquesta malaltia (Sung et al., 2021). Es calcula que durant el 2023 només als Estats Units es diagnosticaran 65,950 nous casos de càncer d'endometri i moriran 12,550 dones (Siegel et al., 2022).

Si parlem de supervivència, 891.560 dones van sobreviure al càncer d'endometri durant el 2021 (Miller et al., 2022). Si estratifiquem la malaltia per edats, el major percentatge -al voltant del 56%- correspon a dones d'entre 65 i 84 anys, seguit de 24% de dones entre 50 i 64 anys, 16% de dones de més de 85 anys i finalment un 4% de dones menors de 50 anys. D'aquestes últimes dones, el 29% no viurà més de 5 anys des del moment del diagnòstic.

A **Catalunya** cada any unes **800** dones són diagnosticades de càncer d'endometri (també anomenat cos uterí) i es registren al voltant de **100** defuncions (Idescat, 2021).

A **Espanya** aquestes xifres s'eleven al voltant de **7.000** dones diagnosticades i **700** defuncions anuals (SEOM, 2022).

Respecte mitjans dels anys 1970, la supervivència dels càncers més freqüents ha augmentat, però ha deixat de banda al càncer d'endometri i el de cèrvix, precisament els que encapçalen el llistat de càncers ginecològics més freqüents (Jemal et al., 2017) i, això posa de manifest una urgent necessitat en posar el focus de la recerca en aquests càncers.

Estadiatge

L'estadiatge de tots els càncers sòlids es basa en directrius molts semblants. En el cas del càncer d'endometri, aquestes directrius es va establir i matissar a través de dos organismes: la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetria (FIGO) i el sistema de TNM (*Tumor Node Metastasis*) de l'*American Joint Committee on Cancer*.

Ambdós organismes tenen en compte 3 factors:

- **T:** tumor. Té en compte la mesura del tumor. *Quina mida té el tumor? Envaeix teixits adjacents o arriba a òrgans propers?*
- **N:** nòduls limfàtics. Té en compte l'extensió a ganglis limfàtics propers. *S'ha estès el tumor?*
- **M:** metàstasi. Té en compte la presència o no de metàstasi. *S'ha estès el tumor a òrgans distants del cos?*

Per ampliar la informació que donen aquests tres paràmetres, al costat de cada lletra va acompanyat un número o lletra que proporciona més detalls. Tota aquesta informació és proporcionada o bé a través d'exàmens físics, biòpsies i proves d'imatge, o bé directament a través d'un tros del teixit extirpat si ha tingut lloc la cirurgia.

Estadiatge	Grup estadiatge	Grau FIGO	Descripció
I	T1, N0, M0	I	El càncer està dins de la cavitat de l'úter.
IA	T1a, N0, M0	IA	El càncer està a l'endometri i pot haver crescut a menys de la meitat de la capa muscular subjacent de l'úter (el miometri).
IB	T1b, N0, M0	IB	El càncer ha crescut de l'endometri al miometri. Ha crescut més de la meitat del miometri, però no s'ha estès més enllà del cos de l'úter.
II	T2, N0, M0	II	El càncer s'ha estès des del cos de l'úter cap al teixit connectiu de suport del coll uterí (anomenat estroma cervical), però no s'ha estès fora de l'úter.
III	T3, N0, M0	III	El càncer s'ha estès fora de l'úter, però no s'ha estès al revestiment intern del recte o de la bufeta urinària.
IIIA	T3a, N0, M0	IIIA	El càncer s'ha estès a la superfície exterior de l'úter (anomenada capa serosa) i/o a les trompes de Fal·lopi o als ovaris.
IIIB	T3b, N0, M0	IIIB	El càncer s'ha estès a la vagina o als teixits circumdants de l'úter (capa del perimetri).
IIIC1	T1-T3 N1, N1mi o N1a M0	IIIC1	El càncer ha començat a créixer fora del cos uterí. Pot haver-se estès a alguns teixits propers, però no creix a l'interior de la bufeta o el recte. També s'ha estès als ganglis limfàtics pèlvics.
IIIC2	T1-T3, N2, N2mi o N2a, M0	IIIC2	El càncer s'ha estès als ganglis limfàtics al voltant de l'aorta (ganglis para aòrtics).
IVA	T4, No s'especifica N, M0	IVA	El càncer s'ha estès al revestiment intern del recte o la bufeta urinària (anomenada mucosa). Pot haver-se estès o no als ganglis limfàtics propers.
IVB	No s'especifica T ni N, M1	IVB	Aquest és l'escenari més avançat. El càncer s'ha estès als ganglis limfàtics inguinals (engonals), a la part superior de l'abdomen o ha metastatitzats a òrgans allunyats de l'úter, com ara els pulmons, el fetge o els ossos. El càncer pot ser de qualsevol mida (qualsevol T) i podria haver-se estès o no a altres ganglis limfàtics (qualsevol N).

Taula 1: Estadiatge del càncer d'endometri segons el TNM. Font: *American Joint Committee on Cancer. Corpus Uteri-Carcinoma and Carcinosarcoma. AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:661-669. **N0**: el càncer no s'ha estès als ganglis limfàtics propers. **M0**: el càncer no s'ha estès a llocs distants. (Adaptació)

Classificació

Durant els anys s'han desenvolupat diverses classificacions del CE, prenent com a premisses diferents característiques; des de la clínica del pacient i la histologia del tumor, fins a factors més complexos com la genòmica i les alteracions moleculars d'aquest.

Aquí detallarem les 3 classificacions més rellevants:

➤ Classificació tradicional

La classificació més tradicional (Murali et al., 2014) divideix el CE en dos grans grups: els **càncers d'endometri tipus I** (o endometroides) i els **càncers d'endometri tipus II** (o no endometroides). Les diferències entre uns i altres resideix en el següent:

CÀNCER D'ENDOMETRI TIPUS I o ENDOMETRIOIDE (CEE)	CÀNCER D'ENDOMETRI TIPUS II o NO ENDOMETRIOIDE (CENE)
Dona pre o peri-menopàusica	Dona post-menopàusica
80-90% prevalença	10-20% prevalença
Dependent d'estrògens	Independent d'estrògens
Progressió lenta	Progressió ràpida
Bon pronòstic	Mal pronòstic
Supervivència als 5 anys: 86%	Supervivència als 5 anys: 59%
Mutacions en <i>PTEN</i> : 52-78%	Mutacions en <i>PTEN</i> : 1-11%

Taula 2: Classificació tradicional del càncer d'endometri. Font: *Murali et al., 2014.* (Adaptació)

➤ Classificació histològica

Si ens basem en el perfil histològic del càncer d'endometri, la classificació s'eixampla i estratifica els càncers en aquests grups més freqüents (Masood & Singh, 2021):

- **Carcinoma endometrioide**

El carcinoma endometrioide és, amb diferència, el tumor epitelial uterí maligne més freqüent i representa aproximadament el 80-90% dels casos. Es caracteritza per ser un carcinoma amb arquitectura variable que pot ser glandular, papil·lar o sòlid, d'estructura semblant a un endometri sa. Això cursa en un context cel·lular d'hiperplàsia atípica.

També es caracteritza per una atípia nuclear lleu o moderada i la diferenciació escamosa, és a dir, de cèl·lules epitelials escamoses més primes i aplanades, és freqüent.

- **Carcinoma serós**

El carcinoma escamós es considera el segon càncer d'endometri més freqüent i representa aproximadament un 10% dels casos. Aquest es caracteritza per un patró de pleomorfisme nuclear difús (els nuclis presenten diferents formes) i creixement de tipus papil·lars i/o glandulars, tot i que es pot trobar una arquitectura sòlida. Normalment, cursen en un context d'atròfia cel·lular i alguns casos poden ser confinats a l'epiteli, però en d'altres hi ha potencial de metàstasi.

- **Carcinoma de cèl·lula clara**

El carcinoma de cèl·lula clara es caracteritza per pleomorfisme cel·lular (les cèl·lules presenten diferents formes) amb cèl·lules poligonals, cuboidals i/o planes. Les cèl·lules es poden disposar en patrons arquitectònics papil·lars, tubuloquistics i/o sòlids. Acostumen a presentar també atípia nuclear i alt índex mitòtic.

- **Carcinoma indiferenciat i desdiferenciat**

Els carcinomes d'endometri indiferenciats o desdiferenciats són clínicament molt agressius. Aquests tumors es defineixen com tumors epitelials que no mostren cap diferenciació de llinatge específica i són caracteritzats per una població de cèl·lules tumorals de mida petita-mitjana disposades en làmines sòlides. Sovint presenten necrosi i alt índex mitòtic.

- **Carcinoma mixte**

Els carcinomes mixtos són aquells que mostren dos tipus histològics simultanis, almenys un dels quals és serós o de cèl·lules clares. Aquests representen menys del 10% de tots els CE, i el seu comportament està generalment determinat pel pitjor component histològic.

➤ Classificació molecular

Finalment tenim la classificació més actual, basada en el perfil molecular (Murali et al., 2014) i que engloba el càncers d'endometris en els 4 grups que s'esmenen a la següent taula:

	POLE (ultramutat)	MSI (hipermutat)	Baix nombre de còpies	Alt nombre de còpies
Tasa de mutacions	Molt elevada	Alta	Baixa	Baixa
Mutacions més freqüents	<i>POLE</i> (100%) <i>PTEN</i> (94%) <i>FBXW7</i> (82%) <i>ARID1A</i> (76%) <i>PI3KCA</i> (71%)	<i>PTEN</i> (88%) <i>PI3KCA</i> (54%) <i>ARID1A</i> (37%)	<i>PTEN</i> (77%) <i>PI3KCA</i> (53%) <i>ARID1A</i> (42%)	<i>TP53</i> (92%) <i>PI3KCA</i> (47%)
Tipus histològic	Endometrioide	Endometrioide	Endometrioide	Endometrioide i no endometrioides
Grau	Variable 1-3	Variable 1-3	Grau 1 i 2	Grau 3
Progressió lliure de malaltia	Bona	Intermèdia	Intermèdia	Baixa

Taula 3: Classificació molecular del càncer d'endometri. Font: *Murali et al., 2014.* (Adaptació)

Factors de risc

Existeix una regla mnemotècnica en anglès per recordar els factors de risc del càncer d'endometri: **OLD AUNT**. **O**besity, **L**ate menopause, **D**iabetes Mellitus II, **cA**ncer (ovarian, breast, colon), **U**nopposed strogen (Anovulation), **N**uliparity, **T**amoxifen, **ch**ronic use. També el **síndrome de Lynch** està relacionat amb un major risc de desenvolupar càncer d'endometri (*American Cancer Society, n.d.*).

Tractament

Els tractaments que estan instaurats avui a la pràctica clínica diària són els següents (Miller et al., 2022):

En CE en **estadiatge I**, la primera línia de tractament és la **cirurgia sola** i la segona és la **cirurgia combinada amb radioteràpia**.

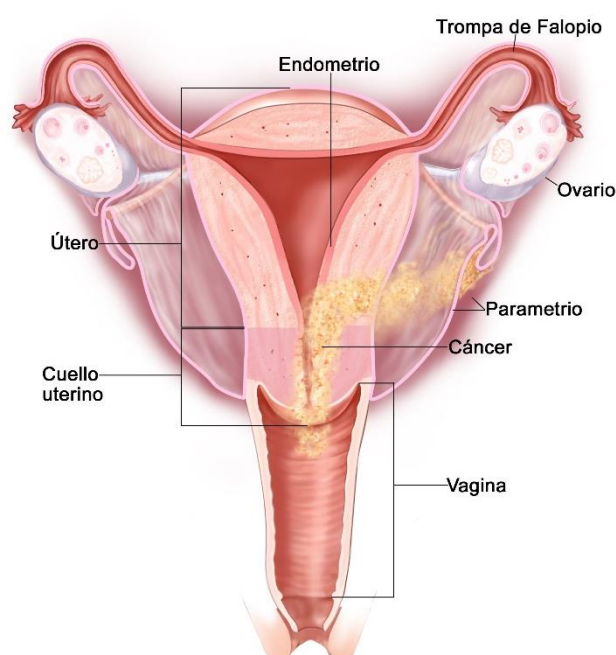
La cirurgia combinada amb **quimioteràpia** i/o **radioteràpia** és una opció poc freqüent. En una freqüència molt residual, hi ha la línia de quimioteràpia i/o radioteràpia soles.

A mesura que avancem en els estadiatges de la malaltia (de **II** a **IV**), aquestes freqüències es van invertint gradualment, i les opcions més recurrents passen a ser la quimioteràpia i/o radioteràpia soles, sense la contemplació o amb la contemplació pràcticament nul·la d'un abordatge quirúrgic, degut a la ja disseminació i pèrdua de localització del tumor.

Ja en l'**estadiatge IV**, fins i tot es contempla l'opció de **no abordatge terapèutic** del càncer pròpiament, sinó més aviat de símptomes derivats del càncer.

En tot cas, desgraciadament encara no hi ha teràpies dirigides estandarditzades i instaurades que s'apliquin en la pràctica clínica diària.

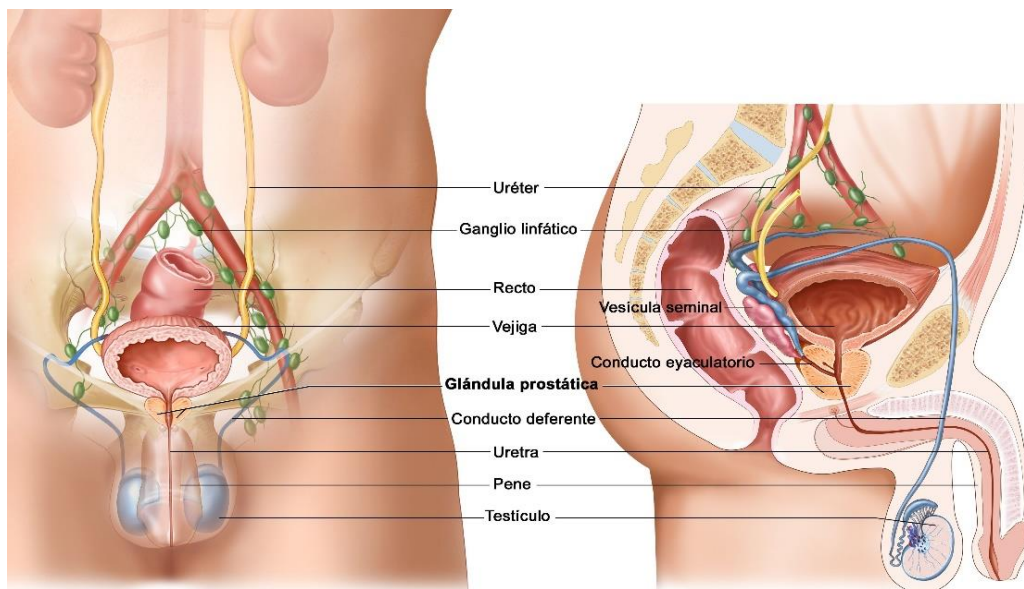
Es considera que el càncer d'endometri és un dels pocs càncers la supervivència dels quals no ha augmentat substancialment des de mitjans dels anys 1970, evidenciant pocs avenços de tractament. No obstant això, més de 2/3 dels pacients amb càncer d'endometri és diagnosticat en estadiatge I i, afortunadament, la supervivència als 5 anys en aquesta fase és del voltant del 95%. Aquest percentatge es redueix al 84% si contemplem tots els estadiatges combinats.



II-lustració 5: Càncer d'endometri en fase III. Font: *Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.*

2. El càncer de pròstata

2.1. Anatomia de la pròstata humana



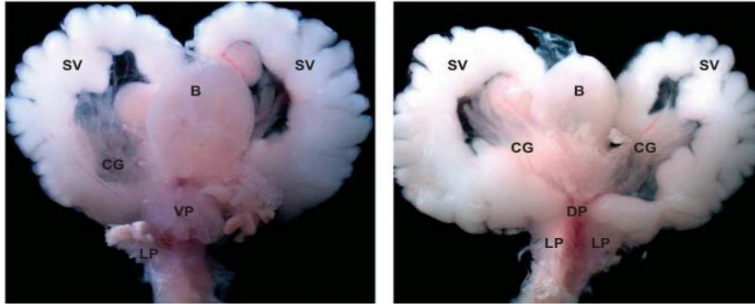
Il·lustració 6: Anatomia del sistema genitoriu masculí. Font: *Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.*

El sistema reproductor masculí està format pels testicles, conductes deferents, **pròstata** o glàndules prostàtiques, glàndules seminals i penis. La pròstata està situada per sota de la bufeta i envoltant la uretra i s'encarrega de la producció de semen, juntament amb els testicles i les vesícules seminals.

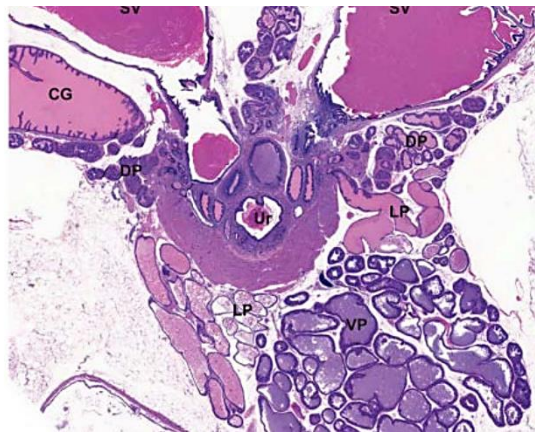
La pròstata engloba tres zones: zona de transició, formada per glàndules mucoses periuretrals, zona central, formada per glàndules submucoses periuretrals i zona perifèrica, formada per les glàndules prostàtiques principals (Ross, 2020).

La pròstata té aproximadament la mida d'un nou i a mesura que s'envelleix, aquesta mida tendeix a augmentar i provocar que la uretra s'aixafi i es disminueix el flux d'orina. Això es coneix com a hiperplàsia de pròstata benigna i moltes vegades és el pas previ al càncer de pròstata.

2.2. Anatomia i histologia de la pròstata murina



Il·lustració 7: Anatomia de la pròstata murina. Font: *Treuting et al., 2018*.



Il·lustració 8: Histologia de la pròstata murina. Font: *Treuting et al., 2018*.

El sistema reproductor masculí murí té els mateixos elements que l'humà. La pròstata de ratolí està unida a la bufeta (es pot veure a la il·lustració 7; **B**) i a la vegada envolta la uretra (es pot veure a la il·lustració 8; **Ur**). La pròstata està dividida en quatre lòbuls tal com es mostra a la il·lustració 7 i a la Il·lustració 8; glàndula anterior o coagulant (**CG**), dorsal (**DP**), ventral (**VP**) i lateral (**LP**). Tots els lòbuls estan separats per una càpsula fina revestida de mesoteli; les glàndules individuals dins de cada lòbul estan envoltades per a estroma de múscul llis connectat per teixit conjuntiu lax (Treuting, 2018).

2.3. Incidència, classificació i tractament del càncer de pròstata

Epidemiologia

El càncer de pròstata (CP) és el segon càncer més freqüent quant a incidència del món, per darrere del càncer de pulmó. En Amèrica i algunes regions d'Àfrica però, ocupa la primera posició.

S'ha reportat que al voltant d'un **milió i mig** de persones van ser diagnosticades d'aquesta malaltia i unes **400.000** van morir a causa d'aquesta durant el 2020 **arreu del món**.

A **Catalunya** cada any uns **5.000** homes són diagnosticats de càncer de pròstata i es registren al voltant de **800** defuncions (Idescat, 2021).

A **Espanya** aquestes xifres s'eleven al voltant de **29.000** homes diagnosticats i **6.000** defuncions anuals (SEOM, 2022).

No obstant l'elevada incidència del càncer de pròstata, la seva mortalitat no és de les més altes; ocupa la 5a posició en morts de càncer en homes, i la 8a posició respecte les morts per càncer totals (Sung et al., 2021).

La seva baixa mortalitat s'explica en part, perquè generalment és un càncer que es diagnostica en fases molt inicials per la seva simptomatologia i les proves de cribratge com el PSA (*Prostate-Specific Antigen*). Es calcula que aproximadament el 85% dels pacients que es diagnostiquen de càncer de pròstata ho fan en una fase de baix risc de la malaltia (Chang et al., 2014).



Il·lustració 9: Càncer de pròstata en fase II. Font: *Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.*

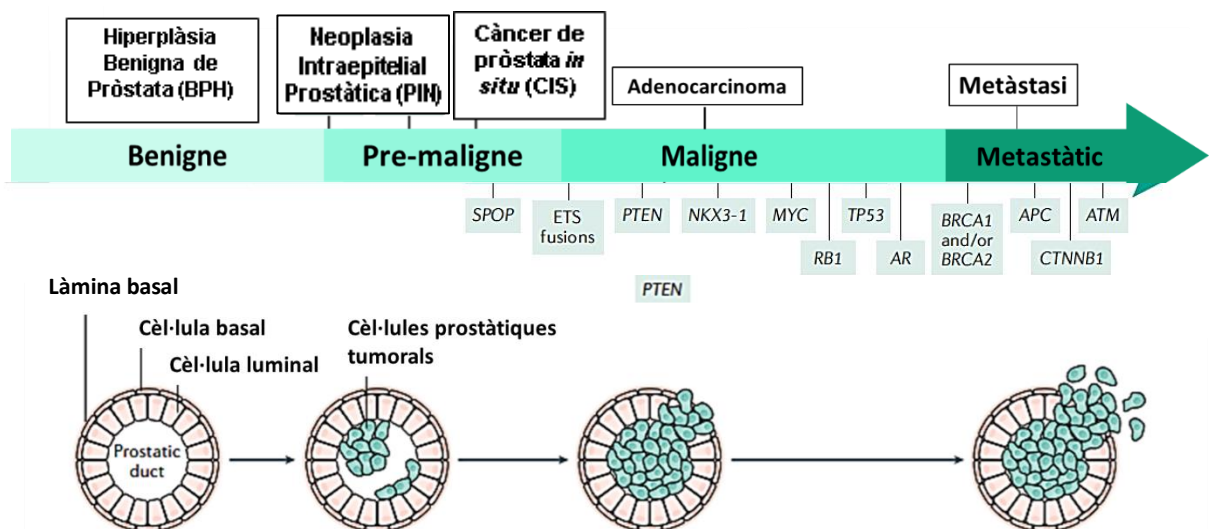
Classificació i estadiatge

Com el CE i la resta de tumors sòlids, el CP pot classificar-se en funció del TMN (Tumor, Metàstasis, Nòduls limfàtics). Una altra estratificació del CP inclou els següents estats (Rebello et al., 2021): BPH (hiperplàsia benigna de pròstata), PIN (*Prostatic intraepithelial neoplàsia*) d'alt i baix grau, CIS (*carcinoma in situ*) i Adenocarcinoma.

Les hiperplàsies cursen amb proliferació descontrolada de cèl·lules normals. Les PIN es caracteritzen per una proliferació intraglandular de cèl·lules epitelials luminals amb reducció o pèrdua de l'epiteli basal. Les cèl·lules luminals del PIN d'alt grau tenen nuclis engrandits amb nuclèols prominents i un augment en l'expressió de marcadors del cicle cel·lular. Les PIN acostumen a ser les precursors d'estats posteriors com el CIS i l'Adenocarcinoma *in situ* i invasiu i finalment la metastasi.

Els adenocarcinomes de pròstata són propis de les glàndules prostàtiques. Es consideren *in situ* quan les cèl·lules es mantenen confinades al teixit prostàtic sense escapar al teixit circumdant i, per contra, ja passarien a considerar-se invasius quan aquestes surten del teixit originari i migren a teixits adjacents.

Si parlem del perfil molecular del CP (Esquema 1), trobem que en la malaltia localitzada les mutacions més freqüents són en SPOP (*Speckle Type BTB/POZ Protein*), en gens de la família d'ETS (*Erythroblast Transformation Specific*), en *PTEN* (la gran majoria delecions o mutacions de truncació de proteïna), *MYC* (*Myelocytomatosis*; amplifcacions), *p53*, receptors d'andrògens (amplifcacions), *BRCA1* i/o *BRCA2* (*BReast CAncer gene*; delecions), *APC* (*Adenomatous polyposis coli*; pèrdua de funció) i β -*CATENINA* (guany de funció) entre d'altres.



Esquema 1: Evolució i mutacions més freqüents en el càncer de pròstata. Font: *Rebello et al., 2021*.

Factors de risc

L'edat és el principal factor de risc en el càncer de pròstata i a partir dels 50 augmenta encara més. També hi ha el factor **racial**: els homes Afroamericans o Caribenys tenen més incidència de càncer de pròstata que altres races.

Després tenim el factor **geogràfic** amb més incidència en Amèrica del Nord i centre Europa, degut probablement a la dieta, per una banda, i un major cribratge poblacional. Finalment, tenim els factors **genètics**: mutacions en BRCA1 o BRCA2. També la **síndrome de Lynch** i **obesitat** estan relacionats amb un major risc de desenvolupar càncer de pròstata (*American Cancer Society*, n.d.).

Tractament

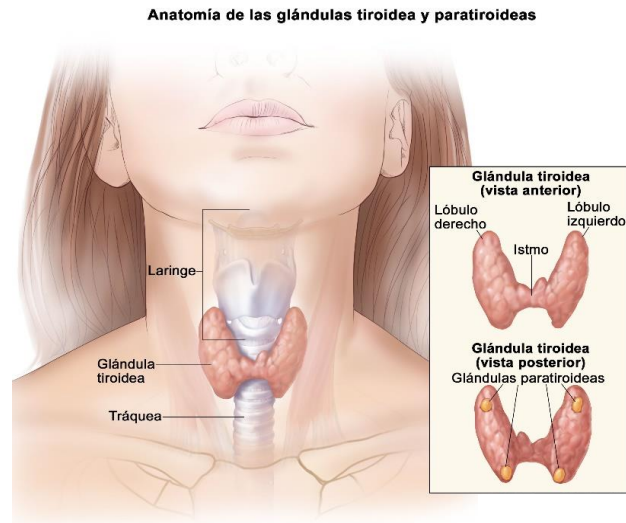
Respecte als tractaments, els que estan instaurats avui en dia a la pràctica clínica diària són els següents (Miller et al., 2022): en general, en carcinomes de pròstata de **baix risc** es tendeix a fer **vigilància activa** abans de fer un tractament immediat. Sobretot si són en pacients molt grans o amb una salut compromesa.

En altres casos, s'opta per fer una **prostatectomia**. En carcinomes **avançats** s'acostuma a fer **teràpia de deprivació androgènica** (ADT), **quimioteràpia** i/o **radioteràpia**. En aquelles formes de càncer resistents a les teràpies més convencionals, es fa una co-adjuvància amb **teràpia hormonal** com l'abiraterona o l'enzalutamida, ambdós antiandrogènics.

Afortunadament però, la majoria dels càncers de pròstata són diagnosticats en l'estadiatge local, la supervivència als 5 anys dels quals acostuma a ser del 100%. En pacients amb malaltia metastàtica aquest percentatge disminueix fins al 30% aproximadament.

3. El càncer de tiroide

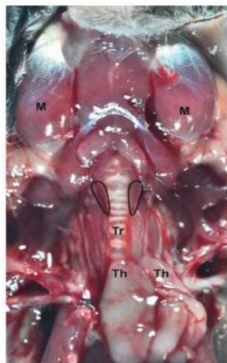
3.1. Anatomia de la tiroide humana



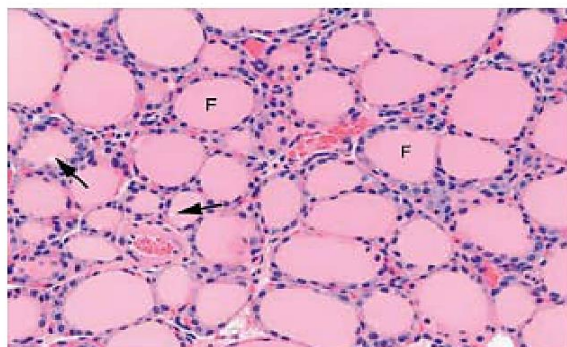
Il·lustració 10: Anatomia de la glàndula tiroide i glàndules paratiroides. Font: *Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.*

La **tiroide** està formada per la glàndula tiroide i les glàndules paratiroides. Les glàndules tiroides estan formades pel lòbul dret i el lòbul esquerre i rodegen la part superior de la tràquea, just per sota dels cartílags que formen la laringe. Des de la part anterior, en la glàndula es pot veure una estructura anomenada istme al centre i lòbuls a banda i banda que normalment són asimètrics. Des de la part posterior es troben quatre glàndules paratiroides (Ross, 2020).

3.2. Anatomia i histologia de la tiroide murina



Il·lustració 11: Anatomia de la tiroide murina. Font: *Treuting et al., 2018.*



Il·lustració 12: Histologia de la tiroide murina. Font: *Treuting et al., 2018.*

Com es mostra a la il·lustració 11, la tiroide murina (Treuting, 2018) està formada per dos lòbuls (delineats) situats al llarg de cada aspecte lateral de la tràquea (**Tr**), que abasten els tres primers o quatre anells de cartílag traqueal. Els lòbuls estan connectats per un istme prim que no és aparent. Els dos lòbuls tímics (**Th**) i els músculs masseters (**M**) s'indiquen.

L'H&E de la il·lustració 12 mostra els fol·licles esfèrics de la glàndula (**F**) i les **fletxes negres** indiquen els col·loides dins dels fol·licles on es produeixen l'alliberament d'hormones tiroïdals. Igual que en la tiroide humana, en la tiroide murina hi són presents les cèl·lules C (també anomenades cèl·lules parafol·liculars) tenyides de color lila que envolten els fol·licles i que s'encarreguen de produir calcitonina.

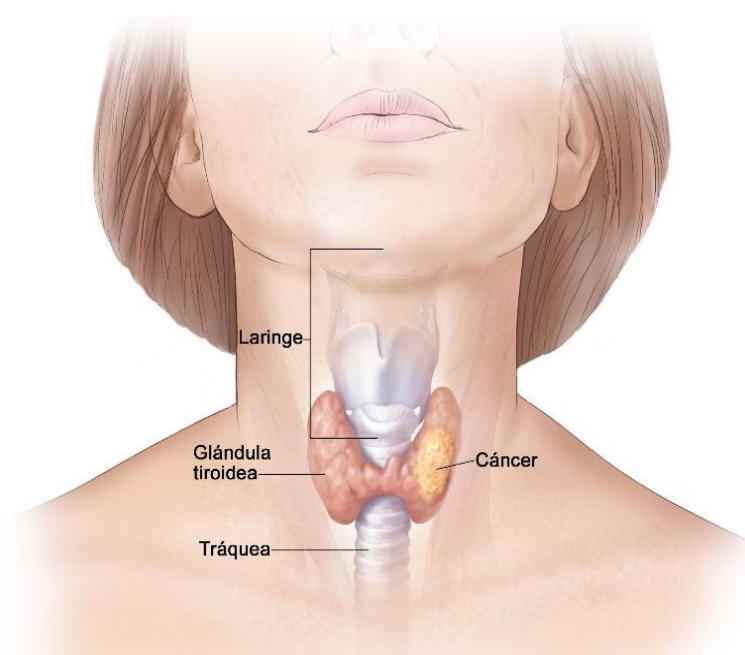
3.3. Incidència, classificació i tractament del càncer de tiroide

Epidemiologia

El càncer de tiroide (CT) va tenir una incidència de **586.202** nous casos i es van reportar **43.646** morts durant el 2020 **arreu del món**. Se situa en la 9a posició quant a incidència, i afecta 3 dones per cada home. Durant els últims anys, el càncer de tiroide ha augmentat la seva incidència, ja sigui en càncers petits i localitzats, com en càncer de major mida; l'augment de detecció dels primers s'explicaria per la millora en les tècniques de diagnòstic per imatge així com eines més sensibles, i l'augment dels segons suggeriria més aviat un augment en els factors de risc com l'obesitat (Kitahara & Schneider, 2022).

A **Catalunya** cada any unes **800** persones són diagnosticades de càncer de tiroide i es registren al voltant de **70** defuncions (Idescat, 2021).

A **Espanya** aquestes xifres s'eleva al voltant de **6.000** persones diagnosticades i **500** defuncions anuals (SEOM, 2022).



Il·lustració 13: Càncer de tiroide papil·lar en fase I. Font: Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration.

Classificació i estadiatge

Els CT, a l'igual que els CE i el CP ja descrits anteriorment, poden classificar-se segons l'estadiatge seguint el TMN. A continuació però, s'il·lustren els càncers de tiroide (Laha et al., 2020) segons la seva naturalesa i etiologia, i es complementa aquesta descripció amb la informació de les seves alteracions moleculars (Pallante et al., 2014), ja que resulta una perspectiva molt interessant per entendre la complexitat del carcinoma de tiroide.

Denominació	Papil·lar (PTC)	Fol·licular (FTC)	Pobrament diferenciat (PDTC)	Medul·lar (MTC)	Anaplàstic (ATC)
Tipus	Ben diferenciat	Ben diferenciat	Poc diferenciat	Variat	No diferenciat
Incidència	80-85%	10-15%	< 2%	< 3%	< 2%
Origen	Cèl·lules fol·liculars	Cèl·lules fol·liculars	PTC o FTC	Cèl·lules C	Carcinoma diferenciat o tumor benigne
Mutacions més recurrents	<i>PI36KCA, PTEN, AKT1, CTNNB1, P53</i>	<i>PI36KCA, CTNNB1, P53</i>	<i>P53, BRAF</i>	<i>RET</i>	<i>P53, BRAF, RAS, PI3K</i>

Taula 4: Classificació dels càncer de tiroide. TC: *thyroid carcinoma*, CTNNB1: β -CATENINA. Font: Laha et al., 2020.

Factors de risc

L'etiologia del CT avui en dia no es coneix amb profunditat. Hi ha un únic factor que ha estat ben establert pel càncer de tiroide i és la **radiació ionitzant**, amb especial importància quan l'exposició es produeix durant la infància. No obstant això, s'han reportat altres factors que tenen un pes rellevant: **obesitat**, **exposicions hormonals**, i altres **contaminant ambientals** (*American Cancer Society*, n.d.).

Tractament

El tractament dels pacients amb càncer de tiroide generalment s'aborda des d'un punt de vista quirúrgic, endocrí i radiològic (Miller et al., 2022). El tractament d'elecció en càncers de tiroides resecables és la **cirurgia**. Quan ja hi ha aparegut la metàstasi, s'acostuma a recomanar la tiroidectomia total amb o sense dissecció dels ganglis limfàtics per tal de facilitar la teràpia amb **iodo radiològic** i reduir així la morbiditat per invasió tumoral, que és una tècnica posterior recurrent. També hi ha l'abordatge posterior que consisteix en la **substitució de l'hormona tiroidal** (després de la resecció quirúrgica) per substituir les hormones endògenes i inhibir el creixement tumoral mantenint un nivell baix de TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) i reduint així el risc de recurrència.

Finalment, existeixen **teràpies dirigides** que actualment estan majoritàriament en assajos clínics; **inhibidors de MAPK** com el Vemurafenib o Dabrafenib entre d'altres, **inhibidors de PI3K/AKT** com Everolimus, antiangiogènics com el Sorafenib i **immunoteràpia** com l'anti-PDL1 Pembrolizumab (Laha et al., 2020).

Tenint en compte tots els estadiatges en global, la supervivència als 5 anys pels pacients amb càncer de tiroide és del 90%. En pacients amb carcinoma anaplàstic però, la supervivència és només del 7% (Miller et al., 2022).

4. Propietats de les cèl·lules canceroses i polaritat cel·lular

L'inici del mil·lenni va ser realment potent en l'àmbit científic del càncer i és que, l'any 2000 (Hanahan & Weinberg, 2000) Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg van descriure per primera vegada 6 capacitats biològiques adquirides durant el desenvolupament dels tumors humans i les va batejar com a *hallmarks of cancer*. Aquest concepte avui en dia forma part de l'imaginari col·lectiu de tots els qui ens dediquem a la ciència del càncer.

Hanahan i Weinberg descriuen que cada *hallmark* o propietat agrupa una sèrie de característiques específiques que doten al càncer d'algun tipus d'avantatge per sobreviure. Aquestes propietats són les següents: **manteniment del senyal proliferatiu**, **evasió dels supressors de creixement**, **resistència a la mort cel·lular**, **immortalitat replicativa**, **inducció de la angiogènesi** i finalment **activació de la invasió i la metàstasi**.

Aquesta llista de *hallmarks* s'ha anat expandint i actualitzant al llarg dels anys.

El 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011) la llista va adquirir els conceptes de: **inflamació generada pel tumor**, **inestabilitat genòmica**, **desregulació del metabolisme energètic** i **evasió de la resposta immunitària**.

I ja recentment, durant el 2022 (Hanahan, 2022), es van afegir els conceptes de **plasticitat fenotípica**, **reprogramació epigenètica no mutacional**, **microbiomes polimòrfics** i finalment implicació de les **cèl·lules senescentes**. En total, avui la llista postula 14 *hallmarks* que defineixen molt bé les estratègies que desenvolupen els càncers per sobreviure.

De totes aquestes capacitats, l'evasió dels supressors de creixement, la resistència a la mort cel·lular, la plasticitat fenotípica i, finalment l'activació de la invasió i la metàstasi són

les que circumden els aspectes centrals d'aquesta tesi doctoral i es descriuran amb més detall a continuació.

La plasticitat fenotípica resideix en el fet que durant l'organogènesi, el desenvolupament i l'organització de les cèl·lules en els teixits, hi ha tota una maquinària cel·lular i de senyalitzacions que ajuda a que les cèl·lules progenitores es diferencien i deixen de fer-ho en el moment adequat. A partir d'aquí les cèl·lules deixen de proliferar de forma fisiològica, sempre respectant els desitjos cel·lulars i en un context adequat d'homeòstasi. Tot això constitueix una barrera clau per evitar la proliferació contínua indispensable per a les neoplàsies. El problema ve quan hi ha un 'desbloqueig' d'aquesta barrera, i les cèl·lules perden el control, sense obeir els senyals fisiològics d'antiproliferació i, començant a seguir senyals pro-proliferatives (Yuan et al., 2019). Aquest nou context és un component crític de la patogènesi del càncer.

La polaritat cel·lular juga un paper important l'homeòstasi cel·lular i, la pèrdua d'estructura de polaritat entre cèl·lules així com la pèrdua d'adhesió a una matriu extracel·lular correcta, poden ser els primers passos per al desenvolupament d'un fenotip de migració, invasió i angiogènesi. L'establiment correcte de la polaritat de les cèl·lules és un procés crític en l'homeòstasi de les cèl·lules epitelials (Coradini et al., 2011). Una pèrdua de polaritat pot donar lloc a canvis fins i tot en les respostes de supressió de creixement de certes substàncies endògenes com seria la citocina TGF- β , i canviar el seu rol de supressor tumoral pel rol de promotor tumoral.

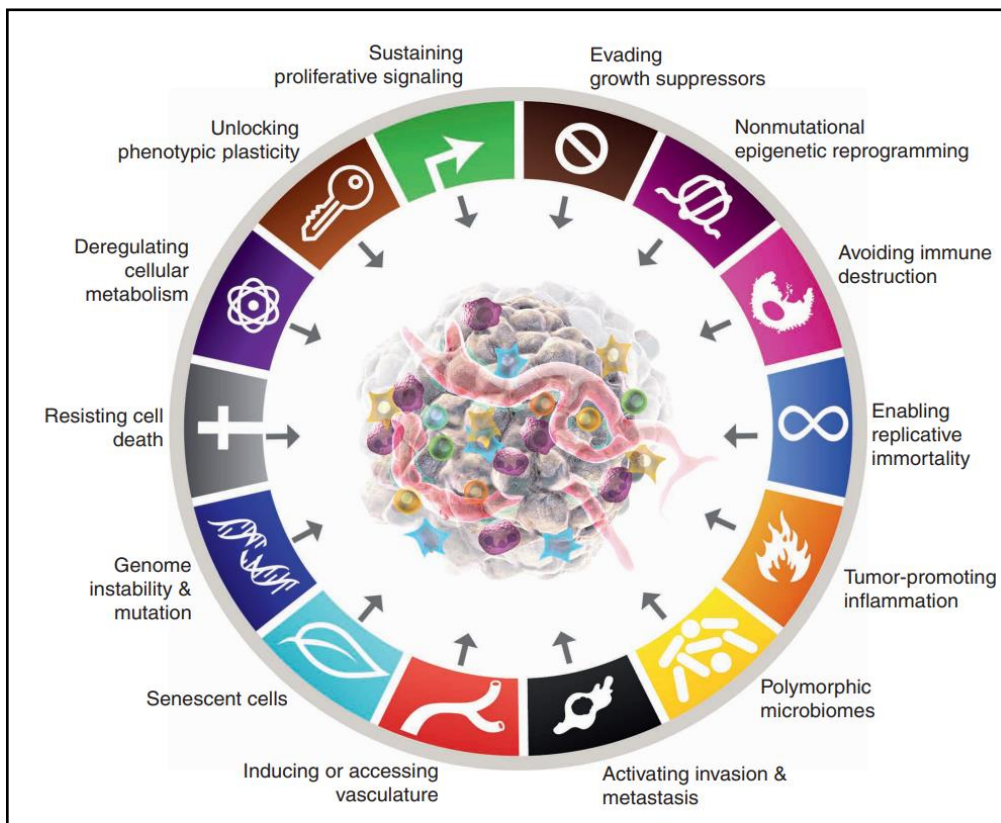
No hi ha dubte que el correcte establiment de la polaritat és un factor molt determinant en els processos tumorals, ja que la pèrdua d'aquesta pot desencadenar que les cèl·lules adquireixen identitats més agressives en funció del context cel·lular.

En els organoides d'endometri estudiats en aquestes tesi a més a més, *Pten* i *Smad2/3* seran també claus en el canvi de respostes antiproliferatives i reguladores de l'apoptosi del TGF- β .

Finalment, el fenotip d'invasió el veurem en relació a la via TGF- β /Smads en el model de ratolí deficient en *Pten* on, la pèrdua de *Smad2/3* confereix aquesta nova característica al càncer de pròstata.

S'ha de tenir en compte que moltes de les capacitats descrites, no són sempre una invenció nova o aberrant de les cèl·lules canceroses, sinó que poden ser, en alguns casos, la corrupció de capacitats latents de les cèl·lules normals que en situacions normals s'utilitzen per donar suport a l'homeòstasi, reparació i regeneració de teixits.

Els avenços en la recerca contra el càncer passen per l'estudi i caracterització d'aquests *hallmarks* o els seus derivats de la millor manera, ja no només per afinar la recerca de dianes terapèutiques, sinó per buscar teràpies que millor puguin combatre en el futur, tots els mecanismes que la cèl·lula cancerosa va desenvolupament per assegurar la seva supervivència en l'organisme humà.



Il·lustració 14: **Hallmarks of cancer**. Font: Hanahan et al., 2022.

5. El TGF- β

La citocina *Transforming growth factor* β (TGF- β) és un factor de creixement que pertany a la superfamília de factors de creixement que inclou diversos factors tals com les proteïnes morfogèniques òssies (BMP), activines, factors de creixement i diferenciació (GDF), entre d'altres (X. Xu et al., 2018). El TGF- β té un paper fonamental en el desenvolupament i l'homeòstasi cel·lular. Es coneixen tres isoformes TGF- β (TGF- β 1, 2 i 3) que són lligands dels receptors i tres receptors transmembrana serina/treonina quinases (TGF- β -RI, II i III) que tenen funcions biològiques semblants i que són essencials en processos de proliferació, diferenciació, migració, remodelació de l'ECM i apoptosi (Vander Ark et al., 2018). En aquesta tesi doctoral ens centrem en TGF- β 1. Tots

aquests processos influencien d'una manera o altra en la embriogènesi, cicatrització, fibrosis, inflamació i progressió del tumor (Shi et al., 2020).

Aquestes isoformes són secretades per diversos tipus cel·lulars tals com cèl·lules epitelials, fibroblasts i cèl·lules immunitàries i en processos carcinogènics es troben presents en el microambient tumoral en una forma inactiva; les formes actives poden exercir les seves funcions de manera autocrina o paracrina.

La senyalització comença amb el lligand TGF- β que s'uneix al receptor tipus II (TGF- β -RII) i s'uneixen i fosforilen el receptor TGF- β -RI (també anomenat *activin receptor-like kinase 5*: ALK5) formant un heterodímer i donant lloc a l'activació de diferents cascades de senyalització intracel·lular. Entre les vies de senyalització activades pel TGF- β hi ha la via que activa els factors de transcripció "Suppressor of Mothers against Decapentaplegic" (SMADs). La via de les SMADs es coneix com la via canònica, però no es la única activada per aquests receptors; altres mediadors fosforilats de la via no canònica translocaran al nucli i interaccionaran amb l'ADN a través de factors de transcripció (FT), co-activadors (CA) o co-repressors (CR) per tal de regula la expressió de diferents gens i produint finalment diversos processos cel·lulars com la proliferació, apoptosi o producció de proteïnes en la matriu extracel·lular entre d'altres (Shi et al., 2020).

Les vies de senyalització del TGF- β (Esquema 2) es poden englobar en la via canònica (Smads) o la via no canònica (PI3K/AKT-ERK/MAPK) que a continuació expliquem.

5.1. Via canònica (SMADs)

Un cop activats els lligands TGF- β per citocines, com ja hem dit, la senyalització del TGF- β comença a regular l'expressió gènica a través de la via de **Smads** o via no canònica. Respecte la via de Smads, es coneixen tres grups funcionals de famílies Smads; Smads regulats pels receptors (R-Smads) que inclouen Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 i Smad8, mediadors comuns de Smads (Co-Smads, inclouen Smad4), i inhibidors de Smads (I-Smads) que inclouen Smad6 i Smad7.

En aquesta via, el TGF- β és activat per integrines i posteriorment es produeix la fosforilació del receptor de transmembrana T β R II i posteriorment l'activació i fosforilació de T β R I. Aquest complex fosforila les proteïnes intracel·lulars Smad2 o Smad3 que es dissocien de les proteïnes d'ancoratge Smads per l'activació del receptor (SARA: *Smad anchor for receptor activation*). Posteriorment el complex hetero-oligomeritza i Smad4 transloca a nucli on pot interactuar amb diferents cofactors per mediar en l'expressió de

gens diana. En tot aquest context cel·lular, Smad7 funciona com un inhibidor d'aquesta via (Y. Chen et al., 2020).

5.2. Via no canònica

La via no canònica del TGF- β és tota aquella que no implica les Smads i que engloba processos de fosforilació, acetilació, ubiquitinació i interaccions específiques proteïna-proteïna entre altres. Aquestes interaccions fan de mediadores per a les respostes intracel·lulars del TGF- β i els factors de senyalització (Esquema 2). La via no canònica contempla diverses branques de cascades, les principals de les quals són les vies de les **ERK/MAPK** kinases, **Rho-like GTPases**, **PI3K/AKT** kinases i **p38/MAPK** kinases (Y. E. Zhang, 2009).

Aquestes vies tenen funcions ben definides en les cèl·lules.

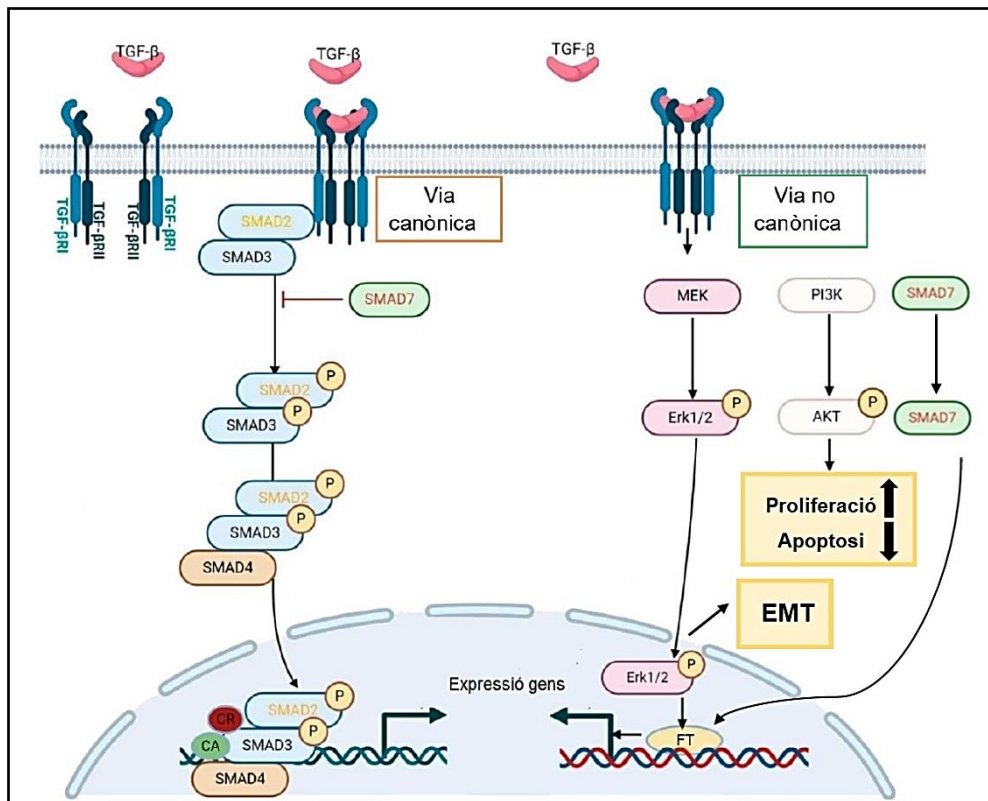
La via **ERK/MAPK** (*Extracellular signal-regulated kinase/Mitogen Activated Protein*) està molt vinculada a l'activació d'EMT, (Hao et al., 2019; J. Xu et al., 2009) un dels processos biològics principals que desenvolupa el TGF- β , necessari per al desenvolupament embrionari, cicatrització, però també present en processos de fibrosi o metàstasi tumoral.

La via **Rho-like GTPases** controla principalment processos d'organització del citoesquelet de la cèl·lula, mobilitat cel·lular i expressió de diversos gens (Y. E. Zhang, 2009).

La via **PI3K/AKT** (*veure descripció detallada en l'apartat 6*) actua en molts processos cel·lulars; entre ells l'EMT, la proliferació i la migració cel·lulars, i l'expressió de gens de matriu extracel·lular. També s'ha descrit que l'activació de PI3K o AKT protegeix les cèl·lules de l'apoptosi induïda pel TGF- β i inhibició del creixement i, més concretament, això està mediat per la interacció AKT-Smad3, que impediria la fosforilació de T β R I, localització nuclear de Smad3 i en conseqüència es produiria la inhibició de la transcripció de gens associada a Smad3 (K. Song et al., 2006).

Finalment es coneix que la via de **p38/MAPK** (*veure descripció detallada en l'apartat 7*) coopera amb la via de les Smads per induir apoptosi, mecanisme de supressió tumoral. A més a més, la via p38/MAPK també està vinculada a processos d'inducció d'EMT (K. Song et al., 2006).

En aquesta tesi ens centrarem en l'estudi de les vies PI3K/AKT, ERK/MAPK, i p38/MAPK.



Esquema 2: Les vies de senyalització del TGF-β. Font: *Shi et al., 2020* (Adaptació).

Durant els últims anys s'ha descrit que la coexistència de les dues vies principals (canònica i no canònica) és necessària per a moltes funcions biològiques del TGF-β. Així doncs, les interaccions entre els lligands, receptors, Smads, factors de transcripció i el *cross talk* entre les dues vies acaben derivant en la regulació de la transcripció de gens de diana específics (Peng et al., 2022).

La particularitat més interessant però del TGF-β és la seva funció dicotòmica i és que el TGF-β modula la seva funció depenent del context cel·lular; fa de supressora tumoral en cèl·lules sanes o pre-malignes –cèl·lules que ja han adquirit alguna mutació però no han desenvolupat encara un procés cancerígen- i de promotora tumoral en cèl·lules cancerígenes (Peng et al., 2022).

5.3. El TGF- β i el càncer

ROL TGF- β	Tipus	Mecanismes
SUPRESSIÓ TUMORAL	Proliferació	Activació de gens citostàtics i inhibició de creixement cel·lular
	Apoptosi	Inducció de proteïnes proapoptòtiques
PROMOCIÓ TUMORAL	Evasió de la immunitat	Supressió de la resposta immunitària contra els tumors a través de la inhibició de cèl·lules T citotòxiques, NK, macròfags, limfòcits
	Angiogènesi	Inducció de VEGs, altres factors de creixement i proteïnes de matriu extracel·lular entre d'altres i consegüentment promoció de la invasió i la metàstasi
	EMT	Canvi de polaritat, pèrdua d'adhesió cel·lular i regulació a l'alça de factors de transcripció desencadenants d'EMT

Taula 5: Mecanismes moleculars del TGF- β en càncer. Font: Peng et al., 2022. Chen et al., 2020. Massagué et al., 2008. (Adaptació)

Les funcions del TGF- β descrites en la taula 5 són un resum senzill de tots els estudis que s'han fet en diversos tipus de càncers en diferents fases del tumor (Y. Chen et al., 2020; Massagué, 2008; Peng et al., 2022). Molts d'aquests estudis han estat avalats amb la inhibició de T β RI, T β RII o algun element de la via de SMADs i amb el consegüent desenvolupament d'un procés cancerígen, demostrant les propietats **supressores tumorals del TGF- β** . Per exemple, la deficiència de SMAD4 en glàndules mamàries de ratolí va derivar en carcinomes escamosos espontanis (W. Li et al., 2003) o la inactivació de *Smad2/3* en l'úter d'un model de ratolí va derivar en càncer d'úter (Kriseman et al., 2019).

En l'escenari oposat, el paper de **promotor tumoral del TGF- β** ha estat validat en molts estudis després de la inhibició de la via TGF β i la consegüent reversió del fenotip tumoral. Per exemple, utilitzant una forma dominant negativa de T β RI o SMAD4 per inhibir la via de senyalització del TGF β en una línia cel·lular de càncer de mama, es va disminuir la capacitat de les cèl·lules tumorals per fer metàstasis un cop aquestes van ser implantades en teixits mamaris de ratolí (Padua et al., 2008).

De tot això el que podem extreure és que el TGF- β té una signatura pròpia en cada tumor, en cada fase del tumor, i en cada context cel·lular.

Per aquesta particularitat, el TGF- β està sent el focus d'estudi de molts laboratoris de recerca en càncer i cada vegada es coneix amb més profunditat aquesta doble funció. No obstant això, encara hi ha moltes controvèrsies en els mecanismes d'acció que regulen cada funció, i anar desvelant i definint aquests mecanismes ajudarà a poder anar fent un pas més en l'estudi del TGF- β i el seu paper en el càncer.

6. El gen supressor tumoral *PTEN* i la via PI3K/AKT en el càncer

PTEN és un dels gens supressors tumorals per excel·lència. Com el seu nom indica (*Phosphate and TENsin homoleg deleted on chromosome 10*) està situat al cromosoma 10 en els humans. Sobre els anys 80 es va documentar la pèrdua completa o parcial del cromosoma 10 en càncer de cervell, bufeta i pròstata (Bigner et al., 1984). No obstant això, no va ser fins l'any 1997 que el mapeig dels homozigots de mutacions al cromosoma 10 va identificar un nou gen supressor de tumor candidat al locus 10q23: *PTEN*. Aquell mateix any *PTEN* va ser identificat com un gen freqüentment alterat (Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998) en múltiples tipus de tumors esporàdics i relacionat amb mutacions en la línia germinal en pacients amb síndromes de predisposició al càncer. El conjunt de síndromes de predisposició familiar al càncer associats a *PTEN* es coneix com *PTEN tumor hamartoma syndromes* (PTHS). Aquest conjunt de síndromes es caracteritza per creixements benignes i un alt risc sobretot de càncer de mama, endometri i tiroide. La síndrome de Cowden és la més ben caracteritzada i el 85% d'aquests pacients tenen mutacions *PTEN* de la línia germinal.

Poc temps després la generació dels primers ratolins *Pten knockout* va demostrar el paper essencial de supressió tumoral de *PTEN* en múltiples tipus de teixit (Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998).

PTEN és una fosfatasa dual no redundant que té substrats tant lípids com proteïnes. La seva funció catalítica més important és la seva activitat de fosfatasa lipídica sobre la via PI3K/AKT/mTOR, actuant com a regulador negatiu (Wu et al., 1998). Aquesta via és una ruta de senyalització evolutivament molt conservada que regula processos fisiològics claus en l'homeòstasi cel·lular i considerada avui en dia una via molt oncogènica, ja que participa majoritàriament en processos de supervivència i proliferació cel·lular.

La seva importància és tal, que alteracions en la via desencadenen l'aparició de diverses patologies neurodegeneratives, diabetis o càncer, majoritàriament per una hiperactivació de la via (Courtney et al., 2010; Ersahin et al., 2015).

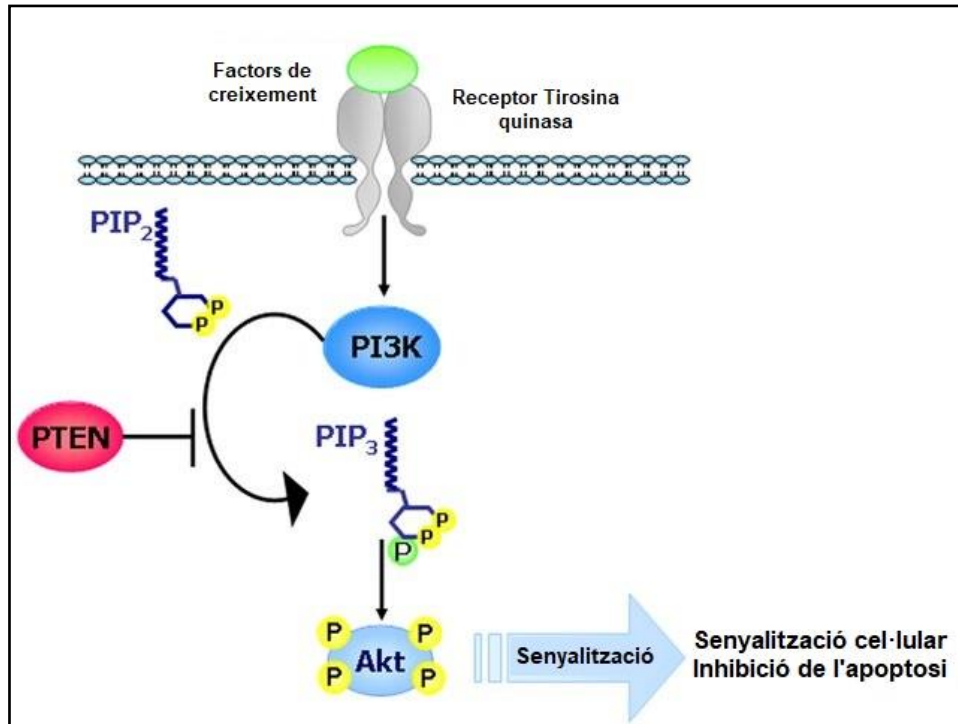
L'activació clàssica de les PI3Ks resulta de la unió d'un factor de creixement al domini extracel·lular d'un receptor tirosina quinasa (*Receptor Tyrosine Kinase, RTK*) i això desencadena l'activació de la via PI3K/AKT. Els RTKs més coneguts són l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*), el PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor*) i l'IGFR-1 (*Insulin Growth Factor 1 Receptor*). L'activitat quinasa d'aquests receptors es veu incrementada a l'unir-se el lligand corresponent a cadascun d'ells, ja que llavors els RTKs s'activen, dimeritzen i s'autofosforilen en el domini interior del receptor.

Un cop la via PI3K s'activa, catalitza la fosforilació de PIP₂ [*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*] i el converteix en PIP₃ [*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*]. Aquests lípids actuen com a missatgers secundaris de la propagació intracel·lular de la senyal d'activació, reclutant i ancorant a la membrana diverses proteïnes. Això és possible gràcies a que són capaços d'unir-se a dominis PH (*pleckstrin homology*) que presenten algunes proteïnes citosòliques. Concretament, faciliten el reclutament de proteïnes serina/treonina quinases PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) i AKT, també coneguda com PKB (*protein kinase B*). En condicions normals AKT es manté en un estat inactiu mitjançant la interacció intramolecular amb els seus dominis PH i quinasa. En canvi, quan interactua amb PIP₃ a través del seu domini PH, té lloc un canvi conformacional que facilita la fosforilació en Thr308 del seu domini d'activació a través de PDK1 i en la Ser473 del motiu hidrofòbic del domini regulador del complex mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) i a la quinasa DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Totes aquestes modificacions de la proteïna produeixen la seva activació completa. En aquest punt AKT es dissocia de la membrana i actua fosforilant múltiples proteïnes de senyalització al citosol, que tenen funcions de proliferació, supervivència, creixement, metabolisme cel·lular, i angiogènesi entre d'altres.

El component regulador negatiu més important d'aquesta via és PTEN, ja que PTEN executa l'acció antagonista de la PI3K, generant PIP₂ a partir de PIP₃, impeding així que

s'acumuli aquest lípid a la membrana. La pèrdua de PTEN i el consegüent augment de PIP_3 a la membrana plasmàtica provoca l'activació de membres de la família AKT (Manning & Toker, 2017; Salmena et al., 2008) que, com ja hem dit, promouen processos de proliferació i supervivència cel·lular (Esquema 3).

Així doncs, l'activitat de PTEN és imprescindible com a supressor tumoral, ja que actua regulant tots aquests processos.



Esquema 3: La via de senyalització PI3K/PTEN/Akt. PTEN regula l'eix PI3K/AKT/mTOR. En resposta a diferents estímuls extracel·lulars (per exemple, presència d'insulina, factors de creixement, citokines, etc) PI3K s'activa mitjançant receptors de tirosina quinasa o receptors acoblats a proteïnes G i fosforila PIP_2 per generar PIP_3 que al seu torn fosforila i activa Akt. PTEN és una fosfatasa lipídica que antagonitza l'acció de PI3K desfosforilant PIP_3 per generar PIP_2 (bloquejant així la cascada de senyalització PI3K). Font: *Molinari et al., 2014* (Adaptació).

6.1. *PTEN* i càncer d'endometri, pròstata i tiroide

PTEN és dels gens supressors tumorals més freqüentment mutats en càncers esporàdics i, es troba mutat significativament en els tres càncers objecte d'estudi en aquesta tesi.

Respecte el càncer d'endometri, es considera que *PTEN* és un dels principals iniciadors dels carcinomes tipus I o endometrioides amb un 80% d'aquests càncers mutats (McConechy et al., 2012; Murali et al., 2014).

Respecte al càncer de pròstata, es coneix que aproximadament el 20% dels tumors primaris de pròstata el 50% en tumors resistents a la castració tenen *PTEN* mutat (Jamaspishvili et al., 2018).

Nombrosos són els models animals que impliquen la pèrdua de *PTEN* per al desenvolupament de processos de tumorigènesi (Grabowska et al., 2014).

Finalment, respecte al càncer de tiroide, l'associació més important que s'ha fet entre *PTEN* i el càncer de tiroide és el que implica la malaltia de Cowden amb mutacions en *PTEN* germinal (Hollander et al., 2011). I és que al voltant del 25% dels adenomes tiroïdals benignes i diversos tumors de tiroïdes esporàdics mostren pèrdua heterozigota de *PTEN* (Dahia et al., 1997). La pèrdua total de *PTEN* és menys freqüent, amb un 10% d'incidència en els tumors de tiroïdes però en un percentatge més elevat el subtipus anaplàstic (Frisk et al., 2002). Nosaltres vam demostrar prèviament al grup que el model de ratolí *CRE⁺PTEN^{F/F}* induïble per Tamoxifè amb pèrdua de *Pten* desencadena neoplàsia de tiroide (Eritja et al., 2010). També s'han descrit models animals amb pèrdua de *Pten* i altres alteracions que han desencadenat processos de tumorigènesi, com la combinació amb el mutant dominant negatiu de la hormona de tiroide receptor β (Guigon et al., 2009), suggerint que la deleció única de *Pten* pot no desencadenar la carcinogènesi en ratolí, però pot contribuir al fenotip maligne en el marc d'altres alteracions genètiques.

7. Les MAPK i el seu paper en processos neoplàsics

La família de serina/treonina MAPK inclou les quinases regulades extracel·lulars ERK1/2 i ERK5, les quinases c-Jun N-terminal JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) i les quinases p38. En aquesta introducció ens centrarem en la via ERK i p38 (Esquema 5).

En general, les MAPK estan implicats en pràcticament totes les respostes cel·lulars tant a estímuls extracel·lulars com intracel·lulars (Cargnello & Roux, 2011). No obstant això, l'ERK està implicat tradicionalment en la transducció de senyals de factors de creixement, mentre que les quinases p38 i JNK s'activen principalment per una àmplia gamma de senyals d'estrès (Canovas & Nebreda, 2021; Cuadrado & Nebreda, 2010; Hotamisligil & Davis, 2016).

7.1. ERK

La cascada ERK implica diverses quinases: Ras/Raf/MAPK, ERK1/2, i diverses MAPKAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases*).

Les quinases ERK1 i ERK2 són les isoformes MAPK més conservades evolutivament i les seves alteracions estan vinculades a diverses patologies com el càncer (Y. Guo et al., 2020). Els seus pesos molecular són 44 and 42 kDa, respectivament, però fan funcions molt similars (Boulton et al., 1991).

L'expressió d'ERK és fonamental per al desenvolupament i la seva hiperactivació juga un paper important en el desenvolupament i progressió del càncer. La via Ras/Raf/MAPK (MEK)/ERK és la cascada de senyalització més important entre totes les vies de transducció del senyal MAPK, i juga a paper crucial en la supervivència i el desenvolupament de les cèl·lules tumorals. De fet és coneix que alteracions en la via Ras-ERK són desencadenants rellevants per al desenvolupament de la majoria de tipus de càncer (García-Gómez et al., 2018).

Són diversos els estímuls, com ara factors de creixement, citocines, virus, lligands del receptor acoblat a proteïnes G i oncogens que poden activar la via ERK (Y. Guo et al., 2020).

Es coneix que ERK1/2 es troba al citoplasma de cèl·lules no estimulades. Un cop activat per la unió d'un lligand a un RTK, s'activa la proteïna G, Ras. Al seu torn, Ras recluta i activa la serina/treonina proteïna quinasa, Raf, que activa MEK i, al seu torn, fosforila el ERK1/2, tant en residus de treonina com de tirosina (Soares-Silva et al., 2016). ERK1/2 transloca a nucli i es regula l'activitat de diversos factors de transcripció mitjançant la fosforilació, que acaba derivant en la regulació del metabolisme i la funció cel·lular, finalment influint en els efectes biològics específics de les cèl·lules.

Com ja hem comentat, la via de senyalització ERK/MAPK no només està implicada en la regulació de funcions biològiques cel·lulars, com ara la proliferació, diferenciació i apoptosi cel·lular sinó que també està relacionada amb la formació de tumors (Rubinfeld & Seger, 2005). S'ha detectat una expressió ERK elevada en diversos tumors humans, com el d'ovari, de còlon, de mama i de pulmó (Y. Guo et al., 2020) i tiroide (Bansal et al., 2013) entre d'altres.

7.2. p38

La família p38 de quinases d'estrès inclou tres membres designats com p38 α , p38 β , p38 γ i p38 δ (Cuadrado & Nebreda, 2010). Entre ells, p38 α és el membre millor caracteritzat que participa en la regulació de múltiples processos cel·lulars en condicions fisiològiques i patològiques (Canovas & Nebreda, 2021; Igea & Nebreda, 2015).

La cascada de senyalització de la via de p38 és similar a la descrita d'ERK. La via s'activa amb estrès o citoquines, llavors diferents MAPKS com MEKK1, ASK1 o TAK1 són activades per TRAF 2/3/6 [factor associat al receptor del TNF 2/3/6 (*tumor necrosis factor*)] o per proteïnes Rho. Al seu torn, es fosforila i activa MKK3 o MKK6, que finalment fosforilaran les isoformes p38 (Canovas & Nebreda, 2021).

Pel que fa al càncer, el paper de p38 és molt controvertit (Esquema 4) i s'han informat àmpliament tant de les funcions de promoció del tumor com de supressió del tumor (García-Hernández et al., 2021; Martínez-Limón et al., 2020).

Respecte les funcions de supressió tumoral, p38 ha demostrat promoure la parada de cicle cel·lular i la diferenciació del cicle cel·lular en condicions d'estrès. Els primers estudis van demostrar que l'activació de p38 inhibeix la transformació induïda per Ras mitjançant la regulació a la baixa de la ciclina D1. p38 α és fosforilat sota hiperactivació de Ras i això exerceix un bucle de retroalimentació reguladora negativa mitjançant la inhibició de l'expressió gènica i el creixement cel·lular depenent de Ras (Martínez-Limón et al., 2020). Altres publicacions també han demostrat que p38 α actua com a agent sensor de ROS en mutants induïts per Ras que produeixen ROS de forma exacerbada i que pot augmentar la tumorigènesi. L'activació de p38 desencadena l'apoptosi en esclats d'estrès oxidatiu en aquestes cèl·lules (Dolado et al., 2007). Altres experiments dirigits a membres de la via p38 diferents de p38 han portat a conclusions similars.

En un model de ratolí deficient en p38 α es va veure que la proliferació cel·lular augmentava i empitjorava la diferenciació en cèl·lules mare pulmonars i progenitores, exercint així un efecte negatiu general sobre l'homeòstasi dels teixits. En aquests teixits es va trobar la transcripció AKT augmentada, la qual cosa explicaria la proliferació exacerbada d'aquestes cèl·lules tumorals (Ventura et al., 2007).

Una altra capacitat supressora tumoral de p38 és la seva activitat pro-apoptòtica.

Per altra banda, existeix molta documentació sobre casos en què els efectes dels fàrmacs quimioterapèutics depenen de l'activació de p38 (Igea & Nebreda, 2015).

Un altre estudi va demostrar que l'estimulació del TGF- β augmenta l'activitat de p38, i suprimeix així la metàstasi en cèl·lules de carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll humà (HNSCC). En aquestes cèl·lules, la inhibició de p38 induïx proliferació tumoral (Sosa et al., 2014), la qual cosa implica que el canvi molecular entre estats proliferatius i estats latents en els tumors pot dependre d'aquesta quinasa.

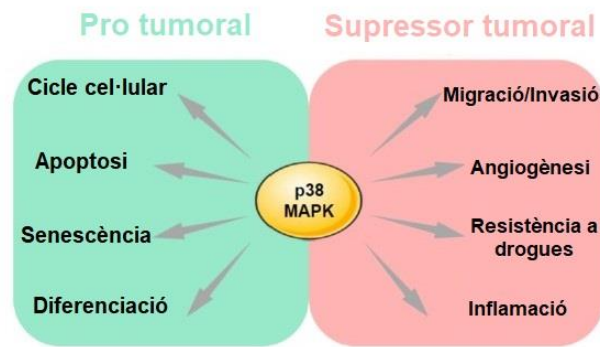
Per contra i respecte al paper de promotor tumoral de p38, hi ha molts estudis que demostren que aquesta quinasa pot promoure el càncer millorant la supervivència i la migració de cèl·lules tumorals, o augmentant la resistència a l'estrès o a agents quimioterapèutics (Wagner & Nebreda, 2009).

En càncer de mama un estudi va demostrar que p38 α era necessari per a la progressió del tumor en un model animal, ja que la seva deleció va empitjorar la resposta al dany cel·lular, va augmentar l'estrès replicatiu, el dany a l'ADN, la inestabilitat cromosòmica conduint a mort cel·lular i regressió del tumor. A més a més la seva inhibició també va potenciar la resposta als taxans (Cánovas et al., 2018). També en un model de càncer de mama, la supressió de p38 δ va demostrar reduir el volum del tumor (Wada et al., 2017).

Igualment s'ha demostrat que l'activació de p38 pot estar augmentada en diversos teixits com tumors de pulmó o de HNSCC (Greenberg et al., 2002; Leelahavanichkul et al., 2014).

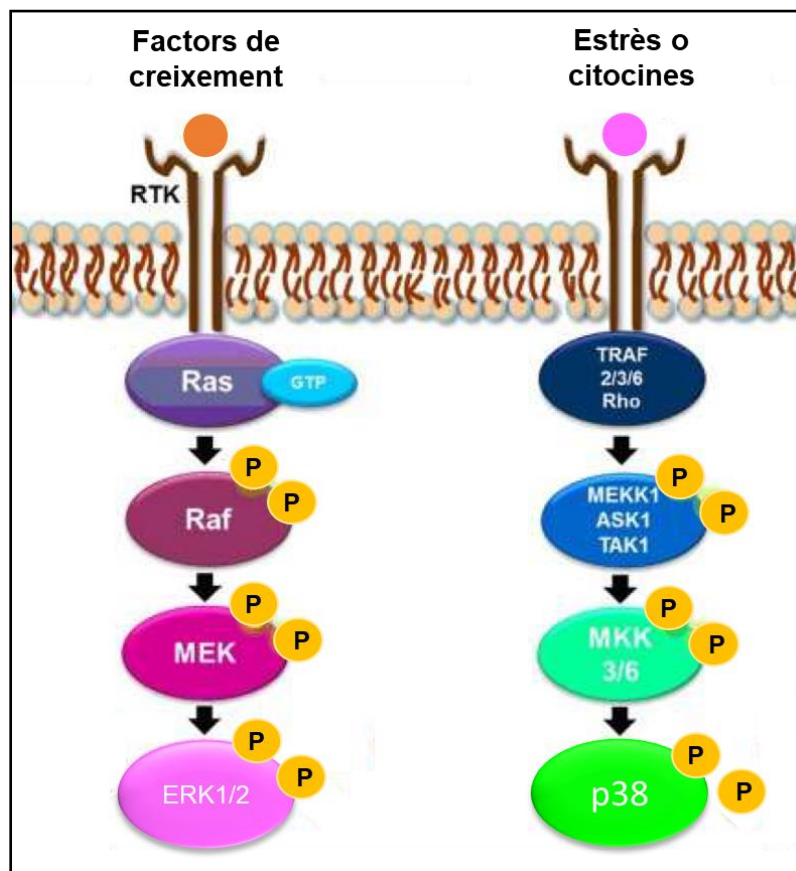
També s'ha documentat que la inhibició de p38 redueix la metàstasi òssia del càncer de mama en ratolins (Suarez-Cuervo et al., 2004) i també en càncer de pròstata a través del TGF- β (Yu-Lee et al., 2018).

Una altra capacitat pro-tumoral de p38 és l'angiogènesi a través de la modulació de l'expressió de factors proangiogènics com HBEGF, IL-8 i VEGFA en el carcinoma de mama metastàtic. S'ha vist que la inhibició de p38 pot reduir el creixement del tumor primari en models de xenograft ortotòpic i el nombre de colònies metastàtiques pulmonars (Limoge et al., 2017). Encara que aquestes troballes donar suport al paper prometastàtic de la via p38, també s'ha vist que la deleció de p38 en cèl·lules de càncer colorectal mostren una major capacitat per colonitzar el pulmó en un model de ratolí de xenograft ortotòpic (Urosevic et al., 2014). Aquesta observació suggeriria que, en alguns casos, la senyalització p38 podria inhibir la metàstasi.



Esquema 4: Funcions de p38 en el càncer. Font: *Martínez-Limón et al., 2020* (Adaptació).

Tenint en compte totes les evidències que postulen p38 com a promotor tumoral, avui en dia hi ha documentats diversos assajos clínics amb inhibidors de p38 combinats o no amb quimioterapèutics (per exemple Carboplatí o Gemcitabina) en diferents càncers localitzats o metastàtics. No obstant això, són tants els mecanismes desconeguts al voltant de la figura de p38 i associats a funcions de supressió tumoral que, com passa amb moltes altres molècules, encara queda molt camí per trobar una teràpia realment útil amb p38 com a diana terapèutica en el camp oncològic.



Esquema 5: Vies de senyalització de les MAPK ERK1/2 i p38. Font: *Soares-Silva et al., 2016* (Adaptació).

8. La Transició Epiteli-Mesènquima (EMT)

La Transició Epiteli-Mesènquima o *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT) és el procés mitjançant el qual les cèl·lules perden fenotip epitelial i adquireixen fenotip mesenquimal. L'EMT és un procés altament coordinat durant el desenvolupament embrionari i una característica patològica en la neoplàsia i la fibrosi. En condicions fisiològiques, les cèl·lules per exemple desenvolupen EMT en processos d'embriogènesi o cicatrització (Lamouille et al., 2014). No obstant això, també s'associa a funcions tumorals com la iniciació del tumor, progressió, migració, invasió, metàstasi i resistència a les teràpies.

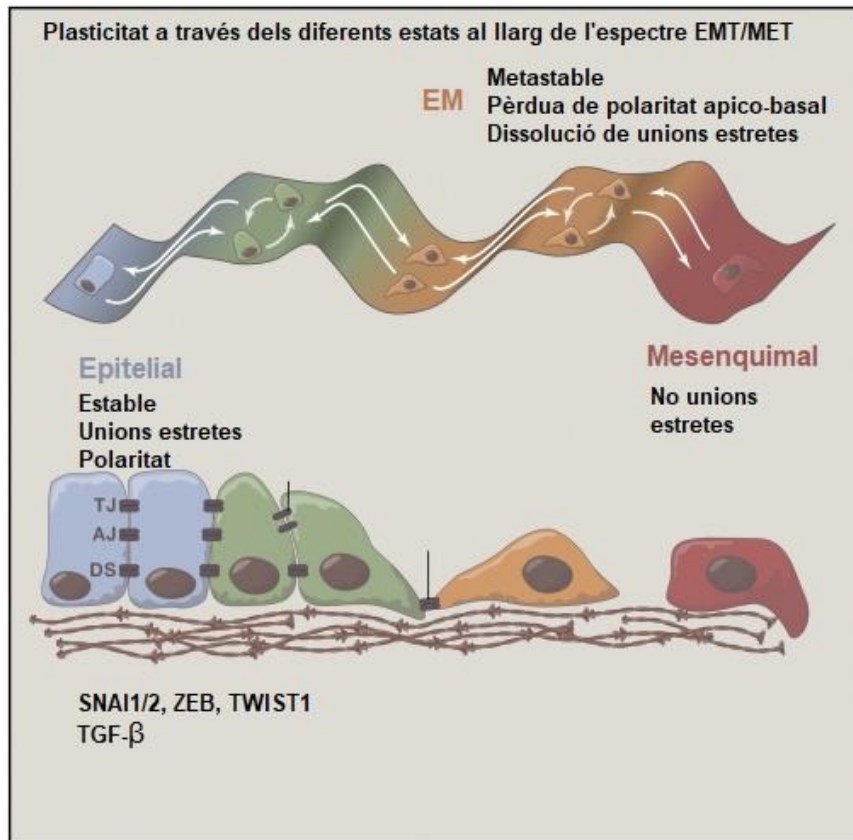
El procés revers d'aquest procés es coneix com Transició Mesènquima-Epiteli (*Mesenchymal to Epithelial Transition*, MET) s'associa a una pèrdua de la capacitat migratòria a través del qual les cèl·lules adopten una polarització apico-basal i expressen unions complexes característiques dels teixits epitelials (Thiery et al., 2009).

L'EMT es produeix en resposta a diferents factors de senyalització pleiotròpics de les cèl·lules que indueixen l'expressió de factors de transcripció anomenats TFs-EMT, tals com Snail, Zeb, Twist entre d'altres, i altres reguladors epigenètics i post-translacionals. És per això que l'EMT és un regulador molt important en neoplàsies derivades de teixits epitelials (Cano et al., 2000; Thiery, 2002) com l'endometri, la pròstata o la tiroide.

Les primeres definicions de l'EMT postulaven una transformació i no una transició, entre dos estats, l'epitelial i el mesenquimal. No obstant això, avui en dia aquest concepte ja es denomina transició i no transformació, ja que s'ha demostrat que l'EMT no és un procés binari entre dos estats, sinó que té lloc a través de diferents estats cel·lulars, és a dir, funcionant com una mena de gradient (Nieto et al., 2016).

La manera més simplista de definir l'EMT passa per expressar-la com el canvi d'expressió d'una sèrie de marcadors epitelials i mesenquimals com la pèrdua d'E-caderina, β -catenina o Citoqueratina i el guany de N-caderina, Vimentina, Slug o Twist entre d'altres (Das et al., 2019; Thiery et al., 2009). No obstant això, aquesta definició queda massa limitada i no aprofundeix en tota la naturalesa del procés. És per això que actualment la definició s'ha expandit i matisat a través d'estudis més exhaustius que postulen l'existència d'una EMT parcial amb fenotips híbrids de les cèl·lules que estan relacionats amb processos cancerígens i de metàstasi (Jordan et al., 2011; M. Yu et al., 2013).

Aquests fenotips híbrids dels quals parlem es basen en models matemàtics i postulen el model d'estats estables (fenotips epitelials i mesenquimals) o metastables (fenotip intermedi). Aquests últims són estats en què la cèl·lula està en un punt 'flexible' en què podria canviar a un estat epitelial o mesenquimal (Tam & Weinberg, 2013).



Il·lustració 15: Transicions pels diferents estats al llarg de l'espectre EMT. L'EMT es pot considerar un procés continu, en què les cèl·lules presenten fenotips epitelials (E), intermedis (EM) i mesenquimals (M). A mesura que les cèl·lules fan la transició d'esquerra a dreta, perden seqüencialment la polaritat apico-basal i les adhesions cèl·lula-cèl·lula i guanyen polaritat davantera i posterior i milloren les interaccions cèl·lula-matriu. Els diferents reguladors de l'EMT inclouen factors de transcripció (SNAI1/2, ZEB, TWIST1), reguladors post-transcripcionals (miRNA) i controls epigenètics. Quan el sistema es pertorba en resposta a senyals EMT (factors de creixement com per exemple TGF- β), les cèl·lules podrien passar per una estat termodinàmic que condueixi a un fenotip diferent (per exemple, EM). **TJ**: unió estreta; **AJ**: unió adherent; **DS**: desmosoma. Font: Nieto *et al.*, 2016 (Adaptació).

8.1. EMT i càncer

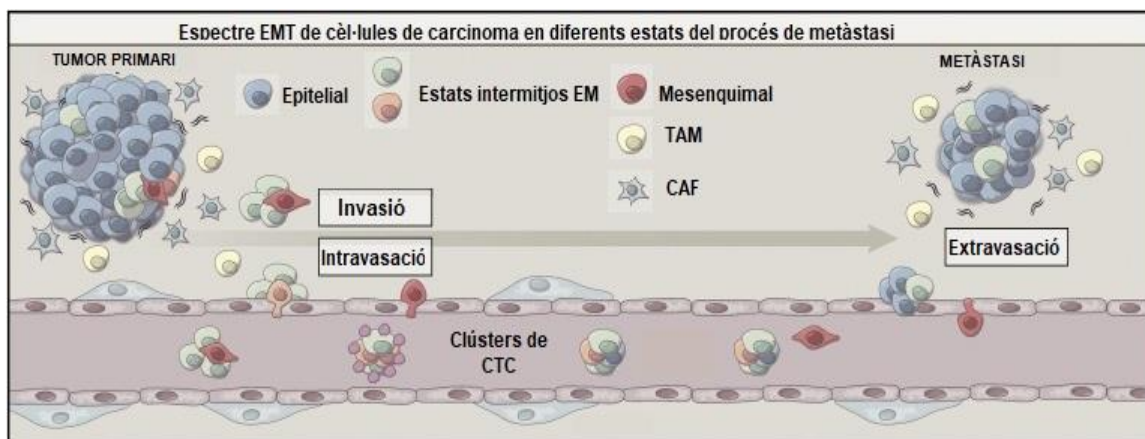
El principi bàsic de la funció de l'EMT en el càncer és la dissociació del tumor primari i la intravasació als vasos sanguinis, la migració, i la difusió a llocs distants (Thiery, 2002). En aquest punt, és la MET la que desencadena el cessament de la migració, induint les mateixes cèl·lules a proliferar i formar el nou tumor.

Les cèl·lules del tumor primari interaccionen amb el microambient tumoral, en el qual es poden trobar fibroblasts associats al càncer (CAF) i cèl·lules immunitàries, inclosos diferents tipus de limfòcits T i B. Aquest estroma també inclou macròfags associats al tumor (TAM) i altres cèl·lules derivades de la medul·la òssia.

L'EMT en el càncer és un procés focal, això vol dir que la proporció de cèl·lules de carcinoma amb característiques EMT pot ser baixa. En un estudi que es va fer amb tumors primaris de mama (Gentles et al., 2015), les cèl·lules que expressaven fenotip d'EMT no superava el 3% en els tumors positius en receptor d'estrògens (ER) i del 10% al 15% en els tumors ER negatius. En aquest context tumoral, també es troben les cèl·lules tumorals circulants (CTC) que presenten un fenotip EMT intermedi. Les CTC deriven del mateix tumor primari i poden patir el procés d'EMT *in situ*, o poden adquirir fenotip d'EMT quan estan en circulació. Les cèl·lules que pateixen EMT al tumor primari també poden cooperar amb les cèl·lules canceroses epitelials a envair (Robinson et al., 2009).

Les cèl·lules canceroses que es troben en el límit de la metàstasi presenten característiques epitelials i, poden ser identificades morfològicament i molecularment i a més a més és possible validar que provenen del tumor primari, posant de manifest la plasticitat de les cèl·lules tumorals. Aquesta plasticitat proporciona avantatges evidents a les cèl·lules tumorals: per una banda, permet a les cèl·lules mesenquimals, que originen un nou tumor després del procés de metàstasi, revertir al fenotip epitelial i, per altra banda, els hi permet escapar la mort cel·lular durant els diferents estats de la progressió del tumor. Es coneix que les cèl·lules de tipus mesenquimàtic s'adapten millor a la deformació cel·lular, resisteixen millor l'estrès i són més resistents als fàrmacs (Nieto et al., 2016).

La literatura científica està plena d'estudis que atorguen un rol essencial a l'EMT en el càncer, no obstant això, la seva aplicabilitat en el diagnòstic, pronòstic i tractament del càncer és molt limitada. Això és degut a diversos factors, com per exemple l'heterogeneïtat del tumor, el microambient tumoral, i factors moltes vegades difícilment fidedignes en els models de cultius cel·lulars o animals entre d'altres.



Il·lustració 16: Espectre EMT en la tumorigènesi. Es mostra la progressió del tumor a través dels diferents tipus cel·lular: cèl·lules **epitelials**, cèl·lules amb **fenotips intermedis** de l'EMT, cèl·lules **mesenquimals**, macròfags associats al tumor (**TAM**), fibroblasts associats al càncer (**CAF**) i cèl·lules tumorals circulants (**CTC**). Les cèl·lules epitelials del tumor primari desencadenen EMT, infiltren a torrent sanguini (intravasació), circulen formant agrupacions de CTC, surten de torrent sanguini (extravasació) i acaben el procés de metastasi amb la formació del nou tumor, ajudades per la seva plasticitat cel·lular. Font: Nieto et al., 2016 (Adaptació).

8.2. Senyalització del TGF- β dependent/independent de SMADs en EMT

L'EMT és un procés molt complex que està modulada per diferents modificacions epigenètiques, transcripcionals, i d'estabilitat cel·lular. L'EMT pot ser desencadenada a través de moltes vies de senyalització. Una de les més vinculades a l'EMT és la via TGF- β . La via del TGF- β pot desencadenar l'EMT a través de la via canònica (Smads) o la via no canònica (Das et al., 2019; Hao et al., 2019; J. Xu et al., 2009; H. Zou et al., 2020) (Esquema 6).

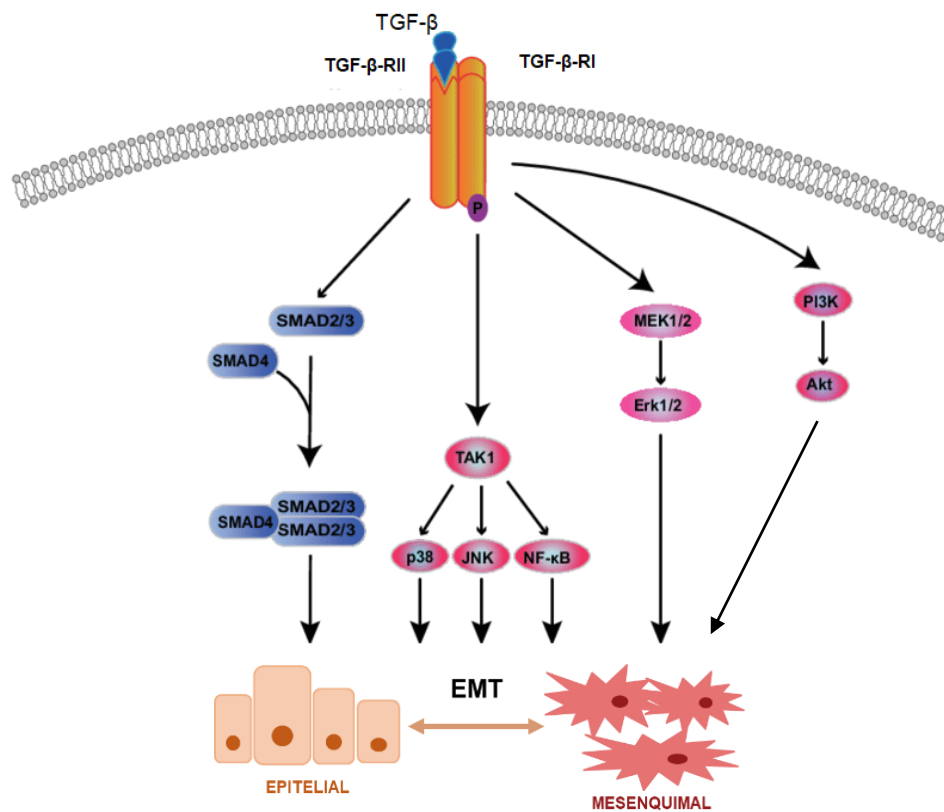
A més a més, aquestes vies poden cooperar entre elles i generar la transcripció de reguladors de l'EMT, tals com Snail, Slug, and Twist (Gavert & Ben-Ze'ev, 2008; Hummer et al., 2003) que funcionen com a repressors de l'E-caderina (Batlle et al., 2000) i que al seu torn cooperen amb altres reguladors al nucli (Lamouille et al., 2014).

Si parlem de la via del TGF- β canònica o de Smads, s'ha demostrat que, per una banda, formes dominant-negatives de T β RII o T β RI, o la inhibició farmacològica de l'activitat kinasa de T β RI, bloquegen l'EMT induïda pel TGF- β en molts tipus cel·lular (Lamouille & Derynck, 2007; Portella et al., 1998; Valcourt et al., 2005) mentre que un T β RI activat de manera constitutiva inicia l'EMT (Piek et al., 1999). Per altra banda, la inactivació de SMAD2, SMAD3 o SMAD4, o augmentar l'expressió de SMAD7 (regulador negatiu de l'eix), impedeix l'EMT induïda pel TGF- β (Valcourt et al., 2005; Zavadil & Böttinger, 2005).

Altres assajos amb ratolins immunodeprimits han revelat que un cop s'hi injectaven cèl·lules tumorals de mama *Knock down* per SMAD4, aquestes tenien menys capacitat metastàtica i els ratolins tenien una supervivència major (Deckers et al., 2006).

Si parlem de la via del TGF- β no canònica, es coneix que el TGF- β pot induir l'EMT a través de la inducció de les vies *RHO-like* GTPases, PI3K i MAPK (Lamouille et al., 2014).

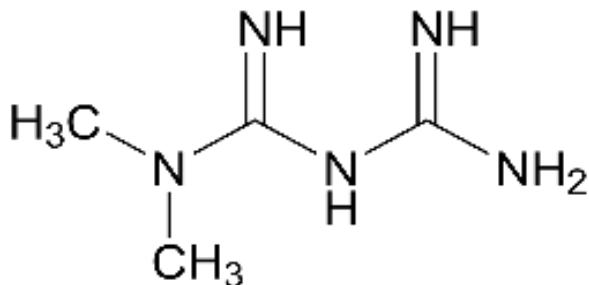
Un dels mecanismes més descrits de l'EMT a través de la via no canònica és la via ERK/MAPK (Hao et al., 2019; Lamouille et al., 2014; J. Xu et al., 2009). El TGF- β activa ERK, p38 i JNK i això desencadena diferents accions. Per una banda, provoca la repressió d'E-caderina i activació de N-caderina i de diferents metaloproteases de matriu (MMP) (Grände et al., 2002; Uttamsingh et al., 2008). Per altra banda, aquesta activació estableix SNAIL1 (Marchetti et al., 2008). A més a més, l'activació del TGF β -*activated kinase 1* (TAK1) i p38 MAPK són necessàries per a la consegüent cooperació entre SMAD3/SMAD4 i la inducció de l'expressió de gens específics. Finalment, JNK activa c-JUN i modula la transcripció de gens per part del TGF- β en cooperació de nou amb SMAD3/SMAD4 (Santibañez, 2006). Consistent a aquests resultats, s'ha descrit que la inhibició de l'activitat quinasa d'ERK o p38 produeix la repressió de l'EMT induïda pel TGF- β a través d'aquesta via (Xie et al., 2004; L. Yu, 2002). El TGF- β a través d'AKT desencadena l'activació del complex mTORC1 i el complex mTORC2 (Bakin et al., 2000; Lamouille et al., 2012; Lamouille & Derynck, 2007). El complex mTOR1 contribueix a un augment de la mida cel·lular, síntesi proteica, motilitat i invasió (Lamouille & Derynck, 2007), mentre que el complex mTORC2 és necessari per l'EMT (Lamouille et al., 2012). S'ha demostrat que la inhibició farmacològica de PI3K evita l'EMT induïda pel TGF- β (Bakin et al., 2000). Per altra banda, la inhibició d'AKT decreix els nivells de SNAIL1 (Julien et al., 2007) atenuant la consegüent repressió d'E-caderina i l'activació de la metaloproteasa 9 (MMP9), mentre que la inhibició de mTORC2 redueix el comportament invasiu i metastàtic de les cèl·lules (Lamouille et al., 2012).



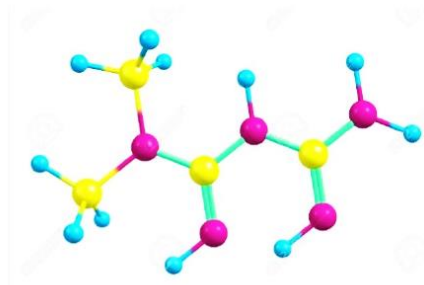
Esquema 6: Vies de senyalització del TGF-β i EMT. Font: Zou et al., 2020 (Adaptació).

9. La Metformina

9.1. Estructura de la Metformina



Dibuix 1: Molècula 2D de Metformina.
Creada amb el programa ChemDraw 21.0.0.



Dibuix 2: Molècula 3D de Metformina.
Creada amb el programa ChemDraw 21.0.0.

La Metformina és el nom conegut que dona lloc a la 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina segons la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

La seva fórmula química és $C_4H_{11}N_5$ i la seva massa molecular és 129,17 g/mol. A temperatura ambient és de color blanc i forma cristalls, és inodora i soluble en aigua (350g/L), ja que la Metformina té molts hidrògens disponibles que hi formen ponts d'hidrogen. Té un pH neutre, de 6,7.

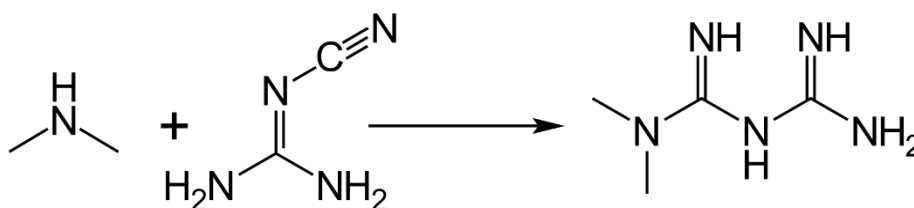
9.2. Història de la Metformina

Les primeres documentacions que es troben de la Metformina relaten que les biguanides (precursors de la Metformina) van ser inicialment extretes de la planta *Galega officinalis* durant l'època medieval (Bailey & Day, 1989). S'utilitzaven llavors per reduir la micció exagerada dels diabètics i també pels pacients de pesta per tal d'augmentar la sudoració d'aquests. Els principis actius d'aquesta planta eren les galeguines o isoamilenguanidines.



Imatge 1: Flor de *Galega officinalis*. Font: CABI Digital Library.

L'any 1922 la Metformina com a tal va ser sintetitzada per primera vegada per Emil Werner i James Bell com a resultat de la reacció entre hidroclore de dimetilamina, 2-cianoguanidina i calor (Thomas & Gregg, 2017).



Dibuix 3: Reacció de síntesi de la Metformina. Creada amb el programa ChemDraw 21.0.0.

No obstant aquesta síntesi prometedora, el seu ús es va veure eclipsat per la producció d'insulina sintètica al voltant de la mateixa època.

Així que no va ser fins a la dècada dels 1950 que el científic francès Jean Sterne va publicar les propietats de la Metformina i la va anomenar *Gluophage* (que significa “menjador de Glucosa”).

9.3. Ús de la Metformina

Des del seu descobriment i caracterització, la Metformina va començar a utilitzar-se com a antidiabètic, avantatjada pel seu perfil toxicològic segur, la baixa possibilitat d'efectes adversos i lleus (diarrees, nàusees i malestar estomacal), la seva fàcil administració i els seus efectes positius en el pes corporal. El risc més important és l'aparició d'acidosi làctica en determinades poblacions de pacients, tot i que s'ha estimat que és un risc molt baix, a raó de 9 casos per cada 100.000 pacients.

L'any 1994 la Metformina es va aprovar per al seu ús als Estats Units. Arran de la millora de la morbiditat i mortalitat en la Diabetis Tipus II demostrada en un estudi prospectiu sobre la diabetis al Regne Unit (UKPDS), la Metformina es va instaurar com a tractament oral de primera línia per a la diabetis tipus II per l'Associació Americana de Diabetis (ADA) i Associació Europea per a l'Estudi de la Diabetis (EASD) des de 2009. Actualment, s'estima que es prescriuen al voltant de 50 milions de receptes anuals de Metformina als Estats Units (Thomas & Gregg, 2017).

La Metformina és un dels medicaments per excel·lència per tractar la diabetis mellitus II; la diferència bàsica entre diabetis tipus I i tipus II és que amb la **tipus I** no hi ha una producció d'insulina, acostuma a ser de naixement o es desencadena durant la infància i es requereix d'insulinoteràpia i amb la **tipus II** sí que pot haver-hi producció d'insulina però o bé aquesta és insuficient, o bé els receptors pancreàtics són resistents al seu efecte, s'acostuma a desencadenar en l'edat adulta i es tracta amb medicaments que regulen la producció i captació de glucosa o sensibilitzen la insulina del cos com la Metformina (sense baixar els nivells de glucosa).

Actualment, la Metformina es considera el fàrmac de primera elecció utilitzat diàriament per uns 150 milions de persones i figura a la llista de la OMS de medicaments essencials (Lord & Harris, 2023).

9.4. Mecanismes d'acció de la Metformina

La Metformina treballa a través de diversos mecanismes d'acció. Curiosament i malgrat la llarga experiència clínica amb la Metformina i la investigació activa en aquesta àrea -des del 2008 s'han publicat anualment més de 100 publicacions indexades sobre la Metformina- els seus mecanismes d'acció exactes encara no estan del tot clars.

El fet que la Metformina s'administri a dosis grans per aconseguir un efecte terapèutic (1-2 grams/dia) suggereix que l'efecte terapèutic no és el resultat d'una única interacció amb una proteïna específica, sinó que existeixen diverses dianes terapèutiques del fàrmac.

No obstant això, el mecanisme molecular més descrit de la Metformina està relacionat amb la via metabòlica i energètica de 5' AMP-*activated protein kinase* (AMPK) (Graham et al., 2011; Vancura et al., 2018; B. Zhao et al., 2020). La Metformina entra a la cèl·lula a través de transportadors orgànics catiónics (OCT) i fosforila AMPK a través de LKB1, i això desencadena l'activació del complex TSC1-TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 1,2*), per a finament desencadenar la inhibició de la fosforilació de mTOR i conseqüentment la inhibició del creixement cel·lular. A més a més, la Metformina inhibeix l'eix de supervivència cel·lular PI3K/AKT, essencial per la proliferació i el creixement cel·lular.

9.5. Farmacodinàmica i farmacocinètica de la Metformina

En termes col·loquials, en farmàcia s'entén la **farmacodinàmica** com el que la **droga li fa al cos** i la **farmacocinètica** com el que el **cos li fa a la droga**.

Farmacodinàmica

A nivell de farmacodinàmica, la Metformina té acció terapèutica contra la diabetis principalment de la següent manera (B. Zhao et al., 2020):

- **Incrementa la sensibilitat a la insulina i millora de la captació de glucosa**
- **Redueix la producció hepàtica de glucosa** per inhibició de la gluconeogènesi
- **Retarda l'absorció de la glucosa a nivell intestinal**

Farmacocinètica

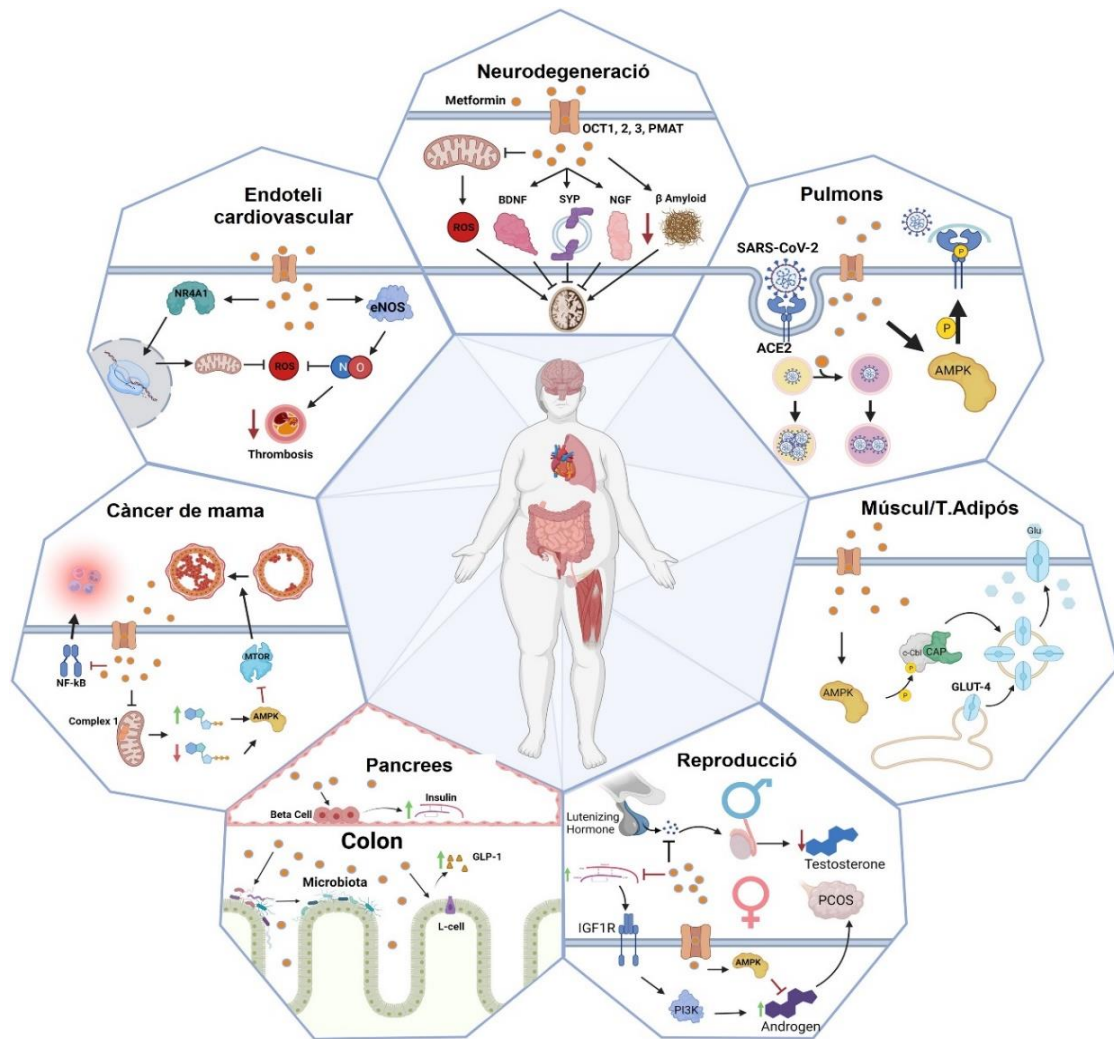
Respecte la farmacocinètica de la Metformina (Graham et al., 2011) es considera que la Metformina és una molècula hidrofílica molt soluble a pH fisiològic. La seva biodisponibilitat és al voltant d'un 60% i s'absorbeix principalment a través de l'íestí prim.

Una curiositat de la Metformina és que al ser una molècula tan hidrofílica s'excreta bàsicament per orina i de forma inalterada. El temps de semivida ($t_{1/2}$) és de 5 hores aproximadament. El seu aclariment renal (CL^R) és d'aproximadament 510 ± 130 mL/min.

9.6. La Metformina i altres dianes terapèutiques

La informació que avala la Metformina com a eficaç contra diferents patologies és extensa. S'ha demostrat que té efectes cardioprotectors, neuroprotectors i eficàcia contra síndrome d'ovari poliquístic (PCOS) entre d'altres. I és que la Metformina és un medicament tan famós que ja s'ha investigat contra la COVID-19 (Triggle et al., 2022). A part d'aquests usos, nombrosos són els estudis que atorguen propietats anticancerígenes a la Metformina en relació a diferents càncers (Lv & Guo, 2020; B. Zhao et al., 2020).

En aquesta tesi ens centrem en tres càncers: càncer d'endometri, càncer de tiroide i càncer de pròstata. A continuació parlarem de les evidències fins ara a través d'estudis poblacionals i de les últimes dades relatives a la Metformina referents a assajos clínics.



Esquema 7: Resum dels efectes de la Metformina en diferents patologies. En malalties **neurodegeneratives** la Metformina redueix la formació de ROS i agregats β -amiloides. Als **pulmons** la Metformina activa la via AMPK que fosforila ACE2 i redueix l'entrada de SARS-CoV-2. En el **múscul** i el **teixit adipós** facilita la captació de glucosa mitjançant transportador de glucosa GLUT4. En el **PCOS** augmenta la sensibilitat a la insulina reduint els nivells d'aquesta i en conseqüència l'activitat d'enzims esteroidogènics. En la microbiota del **colon** afavoreix la producció d'insulina per les cèl·lules β del pàncrees a través de GLP-1. Els efectes **anticancerígens** s'atribueixen principalment a l'activació d'AMPK i conseqüent inhibició de mTOR. L'activació d'AMPK també està implicada en la inhibició de NF κ β i per tant en la reducció de citocines inflamatòries. En el **teixit endotelial** la Metformina facilita la generació d'òxid nítric (NO), redueix el ROS i la tromboinflamació. Font: *Triggle et al., 2022.* (Adaptació)

9.6.1. Estudis retrospectius

Càncer d'endometri

El CE ha sigut objectiu d'estudi de nombrosos estudis poblacionals i la seva relació amb l'ús de la Metformina per diverses raons. Una d'elles és que té factors de riscos com l'obesitat i la Diabetis Mellitus que es combaten amb fàrmacs com la Metformina.

EL 2016 es va realitzar una meta-anàlisi formada per onze estudis i que incloïen 766.926 pacients. Aquest estudi va concloure que l'ús de Metformina s'associava a un menor risc de patir càncer d'endometri i a una major supervivència global (*Overall Survival, OS*) en aquelles pacients amb càncer d'endometri (Tang et al., 2017). No obstant això, també s'ha documentat un estudi meta-anàlisi que malgrat que associa l'ús de Metformina i l'augment d'OS, no troba diferències significativament estadístiques entre l'ús de la Metformina i el risc de patir càncer d'endometri (Chu et al., 2018).

Altres estudis retrospectius també han demostrat una associació entre l'ús de Metformina en pacients de diversos països doblement diagnosticades de càncer d'endometri i diabetis mellitus II, i l'augment de l'OS (Feng & Qin, 2021; Lemon et al., 2022; Nevadunsky et al., 2014; Seebacher et al., 2016).

Càncer de pròstata

Un dels estudis més a gran escala que es van fer per avaluar els possibles efectes beneficiosos de la Metformina contra el CP va estudiar 12.226 pacients amb càncer de pròstata i controls del *Danish Cancer Registry* i *Aarhus University Prescription Database*. Els resultats demostraven que l'ús de Metformina es relacionava amb una disminució en la incidència de càncer de pròstata (Preston et al., 2014). No obstant això, també estan documentats altres estudis que no van trobar relació quant a la incidència de càncer de pròstata i l'ús de la Metformina (Nordström et al., 2015). Un altre estudi interessant comparava l'ús de Metformina i l'ús d'altres hipoglucemians com les sulfonilurees. Mentre que el primer es va associar a un menor risc de patir càncer de pròstata, el segon va relacionar un augment de la incidència (Haring et al., 2017), potser pel mecanisme d'acció de les sulfonilurees que implica una estimulació d'insulina, ja que la hiperinsulinèmia es considera un factor de risc en aquest càncer.

També s'ha estudiat l'ús de la Metformina i la supervivència lliure de malaltia (*Recurrence-Free Survival* o *RFS*) i la l'OS. Un estudi va determinar que l'ús combinat de

Metformina i un tipus d'estatina (reductor dels nivells de colesterol) s'associava a un major temps de RFS (Danzig et al., 2015).

D'igual forma, es van trobar estudis que demostraven l'ús de la Metformina (H. Xu et al., 2015) i l'augment d'OS, i altres que no (Bensimon et al., 2014).

Càncer de tiroide

Respecte l'ús de la Metformina i el CT la informació és més reduïda. Un estudi prospectiu que es va realitzar amb pacients amb acromegàlia –una patologia de la glàndula pituïtària que predisposa al risc de patir càncer d'endometri– va establir una relació entre l'ús de la Metformina i la disminució en el risc de patir càncer de tiroide (Sulu et al., 2022). Un altre estudi amb pacients de càncers de tiroides no diabètics, diabètics tractats i no tractats amb Metformina va demostrar que durant els mesos posteriors a l'inici de l'estudi, els pacients diabètics tractats amb Metformina tenien significativament un creixement del tumor menor que aquells no tractats amb Metformina i que inclús els pacients no diabètics (Klubo-Gwiedzinska et al., 2013).

Com a visió global s'extreu que en tots els casos existeixen dades que avalen l'ús de la Metformina com a factor protector o antitumoral contra els diferents càncers, i altres que ho qüestionen. S'ha de tenir en compte però, les nombroses variables no mesurables presents en els estudis i les limitacions que a vegades apareixen, com per exemple l'ús de la Metformina de forma natural en la població, i no a través d'assignació randomitzada o les duracions o dosis inexactes dels tractaments. En tot cas, hi ha indicis raonables per pensar que la Metformina és un tractament potencial o co-adjuvant per a tots aquests càncers, que cal continuar estudiant i caracteritzant.

9.6.2. Assajos clínics de la Metformina

A continuació es mostra una taula amb els últims assajos clínics cursats de l'ús de Metformina sola o coadjuvant en càncer d'endometri, tiroide i pròstata:

Component	Tipus de càncer	Disseny de l'estudi	Fase	Resultats
Metformina (Tabrizi et al., 2015)	Càncer d'endometri	Metformina (500 mg/dia) en 43 pacients durant 3 mesos	Assaig clínic	Prevenió del creixement cel·lular
Metformina + acetat de medroxiprogesteron (Mitsuhashi et al., 2016)	Càncer d'endometri i hiperplàsia endometrial	Metformina (750-2250 mg/dia) + Acetat de medroxiprogesterona (400 mg/dia) en 17 pacients amb hiperplàsia i 19 amb càncer durant 24-36 setmanes	Fase II	Disminució significativa de recaiguda
Metformina + deprivació androgènica (Mahalingam et al., 2017)	Càncer de pròstata metastàtica	Metformina (500 mg/dia) en 36 pacients durant 28 setmanes	Fase II	Millora la supervivència lliure de malaltia i la supervivència global
Metformina (Rothermundt et al., 2014)	Càncer de pròstata	Metformina (2000 mg/dia) en 44 pacients amb càncer de pròstata metastàtic resistent a la castració durant 1 any	Fase II	Estabilització de la malaltia i baixada de PSA
Metformina (Anil et al., 2016)	Càncer de tiroide	Metformina (1700 mg/dia) en 100 pacients durant 6 mesos	Assaig clínic	Reducció significativa del volum del tumor i els nòduls
Metformina + levotiroxina (Rezzónico et al., 2011)	Càncer de tiroide	Metformina (800 mg/dia) + Levotiroxina en 66 pacients durant 6 mesos	Fase II	Reducció significativa del volum del tumor i els nòduls petits
Metformina + temsirolimus (Khawaja et al., 2016)	Càncers refractaris a tractaments convencionals	Metformina (500-2000 mg/dia) + Tensirolimus (25 mg/setmana) durant 3 mesos	Fase I	Bona tolerància amb potencial efectivitat moderada

Taula 6: Exemples d'assajos clínics de la Metformina en càncer. Diverses fonts. (Adaptació)

10. Reposicionament de fàrmacs

El reposicionament de fàrmacs, també conegut com a **drug repurposing**, fa referència a la identificació de nous usos terapèutics per a fàrmacs que ja estan aprovats per altres usos (Ashburn & Thor, 2004). Els avantatges més evidents d'aquesta estratègia són tres:

1. **Baix risc de fracàs en les fases clíniques o pre-clíniques**
2. **Reducció de temps de desenvolupament del fàrmac**
3. **Menys inversió econòmica i temporal requerida**

Generalment, un fàrmac candidat a reposicionament s'estalvia les fases I i II -que són les més centrades en l'avaluació de la toxicitat- i entra directament en fase III. D'aquí ve l'estalvi econòmic i temporal. Es calcula que de mitjana un fàrmac nou a EUA requereix deu vegades més inversió econòmica que un fàrmac reposicionat (Nosengo, 2016).

És per això que nombrosos fàrmacs han estat aprovats durant els últims anys a través de diferents estratègies com l'anàlisi d'estudis retrospectius, els *screenings in vitro* de llibreries de compostos, o el *molecular docking* -estratègia que consisteix en predir els llocs d'unió entre un fàrmac i una proteïna- entre d'altres (Pushpakom et al., 2019).

Curiosament, el reposicionament farmacèutic de molts medicaments al llarg de la història ha estat una cosa fortuïta. Per exemple, el sildenafil va ser originalment desenvolupat com un fàrmac antihipertensiu, però va ser posteriorment reposicionat per Pfizer pel tractament de la disfunció erèctil i comercialitzat com a Viagra®. La talidomina, un fàrmac originalment sedant i utilitzat per les nàusees, es va retirar als 4 anys perquè causava malformacions a nadons les mares dels quals havien pres talidomida durant el primer trimestre dels seus embarassos. No obstant aquest fracàs, anys després un derivat de la talidomida va resultar ser efectiu i aprovat en el tractament del mieloma múltiple (Ashburn & Thor, 2004).

Aquests èxits han fomentat el desenvolupament d'enfocaments més sistemàtics per identificar fàrmacs que puguin optar a reposicionament farmacèutic com la Metformina i és que, molts dels medicaments candidats al reposicionament farmacèutic, estan enfocats a malalties greus com el càncer, malalties orfes o molt incapacitants.

A continuació es mostra una taula amb fàrmacs que han resultat exitosos al reposicionament farmacèutic durant els últims anys:

Nom del fàrmac	Indicació original	Indicació nova	Data d'aprovació	Curiositats
Zidovudin	Càncer	SIDA/HIV	1987	Primer fàrmac aprovat contra l'HIV
Minoxidil	Hipertensió	Pèrdua de cabell	1988	Actualment genera 800\$ milions anuals a EUA
Sildenafil (Viagra®)	Angina de pit	Disfunció erèctil	1998	Producte líder amb ventes de més de 2 bilions\$ anuals
Talidomida	Nàusees i vòmits	Mieloma múltiple	2006	Un derivat de la talidomida va ser el nou medicament aprovat
Celecoxib (Celebrex®)	Dolor i inflamació	Pòlips adenomatosos	2000	Més de 2 bilions\$ anuals a EUA
Atomoxetina (Strattera®)	Parkinson	TDAH	2002	Més de 2 bilions\$ anuals a EUA
Duloxetina	Depressió	IU, dolor crònic	2004	Un temps després de la seva aprovació per la IU va ser retirat a EUA
Rituximab	Càncer	Artritis reumatoide	2006	Més de 7 bilions\$ anuals a EUA
Fingolimod	Rebuig per transplantament	Esclerosis múltiple	2010	Primera teràpia oral contra l'esclerosis múltiple
Dapoxetina	Analgèsia i depressió	Ejaculació precoç	2012	Aprovada a Regne Unit i part d'Europa. Pendent a EUA
Topiramata (Qsymia®)	Epilèpsia	Obesitat	2012	(Qsymia®) conté topiramata i fentermina contra la obesitat
Ketoconazol	Infeccions fúngiques	Síndrome de Cushing	2014	Aprovat en persones majors de 12 anys
Aspirina	Analgèsia	Càncer colorectal	2015	Fàrmac aprovat per tractament de: càncer colorectal i malalties cardiovasculars

Taula 7: Fàrmacs exitosos en reposicionament farmacèutic. TDAH: Trastorn de Dèficit d'Atenció i Hiperactivitat, IU: Incontinència Urinària. Font: *Pushpakom, et al. 2019* (Adaptació).

El 2019 es va publicar una revisió (Pushpakom et al., 2019) on s'enumeraven estratègies necessàries per a l'èxit en el reposicionament de fàrmacs:

- 1)** Desenvolupar millors plataformes integradores per a l'anàlisi de dades
- 2)** Millor accés i centralització de la informació pre-clínica i clínica dels compostos generada a la indústria i/o centres de recerca
- 3)** Millor accés a les dades d'assaigs clínics de fase II-IV generades en la indústria i/o centres de recerca
- 4)** Seguiment continuat del perfil de seguretat dels fàrmacs reposicionats
- 5)** Millors condicions quant a patents i obstacles d'agències sanitàries reguladores
- 6)** Més oportunitats de finançament a tots els nivells

Amb tot això, l'estratègia de reposicionament farmacèutic cobra especial interès en aquesta tesi que posa el focus en la Metformina, un fàrmac segur i molt utilitzat a nivell mundial, que ha estat objecte en els últims anys d'estudis que li otorguen noves propietats.

Limitacions i futures perspectives

Els estudis d'aquesta tesi s'han elaborat amb línies cel·lulars humanes i models murins.

Les **limitacions** relatives als estudis són, per una banda, la simplicitat dels models *in vitro*, que no són un model fidedigne de l'organisme humà. Per una banda, en els estudis de la Metformina, la Metformina actua evitant els processos biològics naturals de l'organisme enfront qualsevol substància, com seria l'absorció, metabolització i/o distribució d'aquesta substància. Per altra banda, en els resultats obtinguts a través dels models murins, podrien no mimetitzar íntegrament les característiques moleculars que es donarien en l'ésser humà.

Malgrat aquestes limitacions però, els resultats obtinguts generen informació molt acurada sobre la via TGF- β /SMADs en processos de tumorigènesi i sobre diferents mecanismes d'acció amb funcions antineoplàsiques de la Metformina en cèl·lules humanes i models de ratolí. Tots aquests resultats permeten servir de base útil per a l'estudi amb més profunditat tant de la via TGF- β /SMADs en el càncer com d'aquest vell fàrmac amb propietats innovadores.

D'aquí neixen **futures perspectives** com el fet de postular la Metformina com a fàrmac candidat en futurs assajos clínics, amb grups poblacionals estratificats segons mutacions com per exemple *PTEN*. Aquests assajos clínics optimitzarien temps i recursos i servirien per precisar molt més el tipus de pacient que es podria beneficiar d'aquest fàrmac. També cal seguir estudiant la via TGF- β /SMADs per tal de continuar caracteritzant molècules amb funcions supressores o promotores tumorals, per a llarg termini millorar en el diagnòstic i/o benefici de tractaments disponibles o dels tractaments que estan per venir.

Amb tot, cal continuar estudiant i anar generant un coneixement compartit que sigui impuls d'una millora de la salut en el camp oncològic.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

1. Estudiar la pèrdua de polaritat en cèl·lules epitelials d'endometri

La nostra hipòtesi general és que la pèrdua de polaritat pot canviar el fenotip i les vies de senyalització de les cèl·lules epitelials d'endometri així com la resposta cel·lular a factors de creixement i citocines. En aquest context, s'ha descrit que el TGF- β té un paper important en la carcinogènesi endometrial. Per això, hem hipotetitzat que la polaritat cel·lular podria afectar el comportament de les cèl·lules endometrials en resposta al TGF- β . Per tal d'abordar aquesta hipòtesi, es van plantejar els següents objectius:

- 1.1. **Estudiar els efectes cel·lulars de l'absència de polaritat i matriu extracel·lular en resposta al TGF- β**
- 1.2. **Estudiar els mecanismes moleculars i les vies de senyalització regulades per la polaritat cel·lular**

2. Estudiar els efectes del fàrmac Metformina en processos tumorals

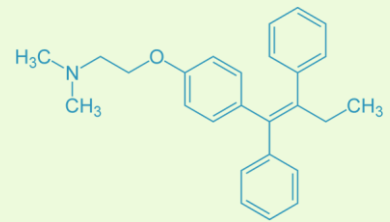
La nostra hipòtesi general és que la Metformina és un fàrmac segur que pot tenir propietats antitumorals en diferents neoplàsies. Aquests efectes anti-neoplàsics serien deguts a l'activació de processos cel·lulars associats a mecanismes de supressió tumoral, tals com l'apoptosi, proliferació o transició epiteli mesènquima. A més a més, aquests processos podrien ser deguts als efectes de la Metformina sobre diferents vies de senyalització. Per tal d'abordar aquesta hipòtesi, es van plantejar els següents objectius:

- 2.1. **Estudiar *in vitro* la Metformina en línies cel·lulars humanes d'endometri i tiroide, cèl·lules epitelials endometrials i tiroïdals de ratolí i la seva implicació en la resposta del TGF- β**

- 2.2. Estudiar *in vivo* els efectes de la Metformina en tumors d'endometri, tiroide i pròstata iniciats per la deficiència en *Pten* en un model *Knock out* per aquest supressor tumoral**
- 2.3. Estudiar els mecanismes moleculars de supressió tumoral causats per la Metformina**
- 3. Estudiar la implicació de SMAD2 i SMAD3 en processos tumorals induïts per la pèrdua de *Pten***

Es ben conegut que *PTEN* actua com a supressor tumoral en l'endometri i la pròstata i que, la seva pèrdua provoca aparició de neoplàsies en aquests dos tipus de teixit. Malgrat això, en ambdós casos les neoplàsies que apareixen són no invasives (neoplàsies intraepiteliales). La nostra hipòtesi general és que *SMAD2/3* poden funcionar com a supressors tumorals en neoplàsies d'endometri i pròstata en cooperació amb el supressor tumoral *PTEN*. D'aquesta manera la pèrdua de *SMAD2/3* juntament amb *PTEN* podria fer progressar les neoplàsies intraepiteliales d'endometri i pròstata a neoplàsies invasives. Per abordar aquesta hipòtesi, es van plantejar els següents objectius:

- 3.1. Estudiar *in vitro* la implicació de SMAD2 i SMAD3 en un context cel·lular deficient per *Pten* en cèl·lules epitelials d'endometri**
- 3.2. Estudiar *in vivo* la implicació de SMAD2 i SMAD3 en neoplàsies induïdes per la pèrdua de *Pten* en endometri i pròstata de ratolí**



MATERIALS I

MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Animals d'experimentació

1.1. Consideracions prèvies

Per al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'han utilitzat ratolins modificats genèticament que han estat allotjats i mantinguts en instal·lacions convencionals, amb *racks* ventilats i en gàbies convencionals. Els ratolins s'han mantingut a 20+/-2°C i una humitat relativa del 50+/-5%, amb cicles de 12 hores de llum/fosc i un accés *ad libitum* del menjar (Tecklad Global 14% proteïna 5% Greix, Envigo) i aigua.

Els mètodes experimentals utilitzats amb els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995 del 21 de juny de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a l'experimentació i altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997 del 30 de juliol de la Generalitat de Catalunya, pel qual es regula la utilització d'animals per a l'experimentació i altres finalitats científiques.
- Real Decret 53/2013 de l'1 de febrer pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació o altres finalitats científiques i que inclouen la docència.
- En el marc de la legislació europea, la Directiva 63/2012/UE que deroga la Directiva 86/209/CEE del 22 de setembre del Consell d'Europa sobre la protecció dels vertebrats utilitzats amb finalitats experimentals o altres finalitats científiques.

Tots els procediments duts a terme amb ratolins s'han realitzat sota la supervisió del personal científic responsables i els tècnics especialistes corresponents en la nostra institució, en el marc de totes les directrius legals i ètiques vigents. A més a més, s'especifica que tots els procediments han estat aprovats pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Lleida (UdL).

1.2. Soques de ratolins utilitzades

1.2.1. Ratolins CAG-CRE^{ERT}

Els ratolins transgènics CAG-CRE^{ERT} [B6.CG-Tg(CAG-cre/Esr1)5Amc/J] van ser generats al laboratori del Dr. Andrew P. McMahon mitjançant la tècnica d'injecció pronuclear, en la qual el material genètic s'injecta al pronucli d'un ovòcit fecundat (*Hayashi and McMahon, 2002*). El nostre laboratori va adquirir aquests ratolins CAG-CRE^{ERT} a través de l'empresa The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A partir els simplificarem amb la nomenclatura Cre^{+/-} al llarg de la tesi.

Aquest ratolins transgènics es caracteritzen per expressar la recombinasa Cre induïble per Tamoxifè sota el control del promotor CAG acoblat al promotor del citomegalovirus (CMV). La Cre està unida a un lligand de receptor d'estrògens transformat que només permet la unió amb Tamoxifè i, en conseqüència, s'impedeix la unió amb estrògens endògens. Això es considera una proteïna de fusió denominada CRE:ER^T i que es manté al citoplasma amb o sense estímuls d'estrògens endògens però, que amb presència de Tamoxifè, transloca al compartiment nuclear i actua com a recombinasa sobre les seqüències *loxP* que flanquegen el gen d'interès.

Aquesta colònia murina es manté en heterozigosi; Cre:ER^{+/-}, i els ratolins son viables, fèrtils i presenten una mida normal, sense mostrar alteracions morfològiques ni de comportament.

1.2.2. Ratolins PTEN *FLOXED* (PTEN^{F/F})

Els ratolins PTEN^{F/F} (C;129S4-Pten^{tm1Hwu}/J) van ser generats pel DR. Hong Wu mitjançant la tècnica d'electroporació de cèl·lules mare embrionàries (ESC) i la posterior injecció en blastòcits que van ser transferits posteriorment a femelles (*Lesche et al, 2002*). El nostre laboratori va adquirir aquests ratolins a través de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Aquests ratolins presenten seqüències *loxP* que flanquegen l'exó 5 de *Pten*, que codifica pel domini fosfatasa de la proteïna. El creuament d'aquests ratolins amb una soca que expressi qualsevol tipus de recombinasa donarà lloc a la pèrdua de l'exó 5 i, en conseqüència, a l'absència de la proteïna PTEN. Per tant, el seu ús permet l'excisió de l'exó de *Pten* flanquejat en diferents teixits o moment del desenvolupament en funció de la recombinasa que s'utilitzi.

Aquesta colònia de ratolins es manté en homozigoci; PTEN^{F/F} i, els ratolins són viables, fèrtils, presenten una mida normal, sense mostrar alteracions morfològiques ni de comportament i amb uns nivells de PTEN normal fins el moment de creuar-los amb soques amb qualsevol tipus de recombinasa.

1.2.3. Ratolins SMAD2 FLOXED (SMAD2^{F/F})

Els ratolins SMAD2^{F/F} (fons genètic C57BL/6) van ser generats pel Dr. Martin M Matzuk (Houston, TX, USA).

Aquesta colònia de ratolins es manté en homozigoci; SMAD2^{F/F} i, els ratolins són viables, fèrtils, presenten una mida normal, sense mostrar alteracions morfològiques ni de comportament i amb uns nivells de SMAD2 normal fins el moment de creuar-los amb soques amb qualsevol tipus de recombinasa.

1.2.4. Ratolins SMAD3 FLOXED (SMAD3^{F/F})

Els ratolins Smad3^{ex8/ex8} (fons genètic C57BL/6) van ser generats pel Dr. Akihiko Yoshimura (Keio University School of Medicine, Tokio, Japó).

Aquesta colònia de ratolins es manté en homozigoci; SMAD3^{F/F} i, els ratolins són viables, fèrtils, presenten una mida normal, sense mostrar alteracions morfològiques ni de comportament i amb uns nivells de SMAD3 normal fins el moment de creuar-los amb soques amb qualsevol tipus de recombinasa.

1.2.5. Ratolins CRE^{ERT} PTEN^{F/F}

Aquest ratolins són *Knock out* per PTEN, induïbles per Tamoxifè, el qual s'injecta mitjançant una dosi intraperitoneal única aproximadament a les 5 setmanes de vida del ratolí a raó de 0,5 mg de Tamoxifè.

Aquest ratolins van ser generats el 2013 per la Dra. Cristina Mirantes (*Mirantes et al., 2013*) mitjançant el creuament de ratolins Cre:ER^{T+/-} amb ratolins PTEN^{F/F} amb un fons genètic mixt. Els creuaments s'han anat fent passant per una generació en heterozigosi de PTEN^{F/wt} fins obtenir el ratolí CRE^{ERT} PTEN^{F/F}.

1.2.6. Ratolins CRE^{ERT} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F}

Aquest ratolins són *Knock out* per SMAD2 i SMAD3, induïbles per Tamoxifè, el qual s'injecta mitjançant una dosi intraperitoneal única a les 5 setmanes de vida del ratolí a raó de 0,5 mg de Tamoxifè.

Aquest ratolins han estat generats durant la realització d'aquesta tesi doctoral mitjançant el creuament de ratolins Cre:ER^{T+/-} amb ratolins SMAD2^{F/F} i SMAD3^{F/F} amb un fons genètic mixt. Els creuament s'han anat fent passant per les generacions en heterozigosi de SMAD2^{F/wt} i SMAD3^{F/wt} fins obtenir el ratolí CRE^{ERT} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F}.

1.2.7. Ratolins CRE^{ERT} PTEN^{F/F} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F}

Aquest ratolins són *Knock out* per PTEN, SMAD2 i SMAD3 induïbles per Tamoxifè, el qual s'injecta mitjançant una dosi intraperitoneal única a les 5 setmanes de vida del ratolí a raó de 0,5 mg de Tamoxifè.

Aquest ratolins han estat generats durant la realització d'aquesta tesi doctoral mitjançant el creuament de ratolins Cre:ER^{T+/-} amb ratolins PTEN^{F/F}, SMAD2^{F/F} i SMAD3^{F/F} amb un fons genètic mixt. Els creuament s'han anat fent passant per les generacions en heterozigosi de PTEN^{F/wt}, SMAD2^{F/wt} i SMAD3^{F/wt} fins obtenir el ratolí CRE^{ERT} PTEN^{F/F} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F}.

1.3. Sexatge i genotipatge

Els ratolins es deslleten a les 3 setmanes de vida i es separen en funció del seu sexe. Es procedeix al tall d'un tros de cua (menor a 5 mm de longitud), prèvia anestèsia del ratolí amb isoflurà (Ecuphar) al 2% per via inhalatòria. Simultàniament es marca l'animal mitjançant un codi a les orelles que va del n^o0 al n^o15.

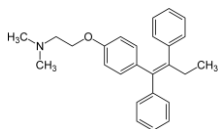
A continuació es dipositen les cues tallades en tubs d'1,5 ml i es digereixen amb 150 µL de buffer tampó de genotipatge que conté 25 mM de NaOH (Sigma-Aldrich) i 0,25 mM d'EDTA (Sigma-Aldrich) en H₂O miliQ. Es deixen les cues 1h a 1000 rpm i 95°C i posteriorment es neutralitza el NaOH amb 6 µL de TRIS 1 M (Fisher) a pH=5,5. Un cop tenim les cues digerides, es procedeix a fer les PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de genotipatge corresponent. Finalment, els productes de PCR s'analitzen mitjançant separació electroforètica en gel d'agarosa (FisherScientific) al 2, 3 o 4% en funció del pes del producte de PCR que vulguem visualitzar, i les bandes es visualitzen per tinció amb *MIDORI Green Advance DNA Stain* (CULTEK).

Gen	Seqüència dels primers utilitzats		Programa de PCR			Bandes obtingudes	
			T (°C)	Temps	Cicles	Genotipatge	Mida
CRE^{ERT}	<i>FWD</i>	5'-ACG AAC CTG GTC GAA ATC GT GCG 3'	94	2'	1	CRE ^{ER-/-}	No banda
			94	45''		CRE ^{ER+/-}	350 bp
	<i>REV</i>	5'-CGG TCG ATG CAA ACG AGT GAT GAG-3'	65	45''			
			72	45''	32		
			72	5'	1		
PTEN <i>floxed</i>	<i>FWD</i>	5'-CCA GCA CTC TGC GAA CTG AG-3'	94	3'	1	PTEN ^{F/F}	328 bp
			94	30''		PTEN ^{+F}	156 & 328 bp
	<i>REV</i>	5'-AGG TTT TTG AAG GCA AGA TGC -3'	65	1'		PTEN ^{+/+}	156 bp
			72	2'	35		
			72	2'	1		
SMAD2 <i>floxed</i>	<i>FWD</i>	5'-TGA GAC TTC TCT GTA CCC GAT-3'	95	5'	1	SMAD2 ^{F/F}	400 bp
			95	30''		SMAD2 ^{+F}	350 & 400 bp
	<i>REV</i>	5'-CAT CAG ATT CCA TTA GAG ATG G-3'	58	45''		SMAD2 ^{+/+}	350 bp
			72	45''	40		
			72	7'	1		
SMAD3 <i>floxed</i>	<i>FWD</i>	5'-CTC CAG ATC GTG GGC ATA CAG C-3'	95	2'	1	SMAD3 ^{F/F}	200 bp
			95	30''		SMAD3 ^{+F}	150 & 200 bp
	<i>REV</i>	5'-GGT CAC AGG GTC CTC TGT GCC-3'	60	45''		SMAD3 ^{+/+}	150 bp
			72	45''	30		
			72	10'	1		

Taula 8: Gens determinats en els ratolins utilitzats en aquesta tesi.

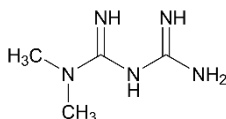
1.4. Tractaments farmacològics *in vivo*

1.4.1. Tamoxifè



El Tamoxifè [(Z)-4HidroxiTamoxifè] s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol amb etanol pur fins a 10 mg/ml. Posteriorment es dilueix a 5 mg/ml mitjançant una dilució 1:2 amb oli de blat (Sigma-Aldrich). Això es calenta a 37°C i es vorteja per tal d'afavorir la homogeneïtzació de la dissolució. Aquest preparat es subministra al ratolí d'aproximadament 5 setmanes de vida mitjançant una injecció intraperitoneal amb xeringuilla a raó d'0,5 mg per ratolí.

1.4.2. Metformina



La Metformina [3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina] també s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol amb *phosphate buffered saline* (PBS) o H₂O miliQ estèrils fins a una dissolució de 50 mg/ml. Aquest preparat es subministra al ratolí amb una xeringuilla i per sondatge oral a raó de 250 mg/Kg/dia de ratolí. El tractament amb Metformina s'inicia als 5 dies de la injecció de Tamoxifè i es manté durant 4 setmanes amb una periodicitat d'una administració cada dia.

2. Tècniques de biologia cel·lular

2.1. Reactius i matèries utilitzades en els cultius cel·lulars

TIPUS	REFERÈNCIA	PROVEÏDOR
MATÈRIES PRIMES I REACTIUS		
Agarosa	10775684	FisherScientific
Anfotericina	A2942-20ML	Sigma-Aldrich
BioAcril	J63279	ThermoFisher
BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina)	B23151	Invitrogen
BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>)	BP9702-100	FisherScientific
Collagenasa tipus II	17101-015	ThermoFisher
<i>Corn oil</i> (Oli de blat)	1148806	Sigma Aldrich

<i>DC Protein Assay Reagent A</i>	5000113	Bio Rad
<i>DC Protein Assay Reagent B</i>	5000114	Bio Rad
<i>DCC (Dextran Coated Charcoal Stripped Serum)</i>	C6197	Sigma-Aldrich
DAB (Diaminobenzimida)	GV82511-2	Agilent
Dihidrotestosterona	D-073	Sigma-Aldrich
<i>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i>	41965-039	ThermoFisher
DMEM/F12	11039-021	ThermoFisher
DMSO (Dimetilsulfòxid)	D2650	Sigma-Aldrich
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich
<i>EGF (Epithelial Growth Factor)</i>	PHG0313	ThermoFisher
Estreptomicina	S9137	Sigma-Aldrich
<i>FBS (Fetal Bovine Serum)</i>	F7524-500ML	Sigma-Aldrich
Glutamax	35050-061	ThermoFisher
<i>HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)</i>	14175-046	Invitrogen
<i>Human TGF-β1 Protein</i>	PHG9214	ThermoFisher
Isoflurà	13400264	Ecuphar
ITS (Insulina-transferrina-seleni)	41400045	ThermoFisher
<i>Matrigel® Corning® Basement Membrane Matr</i>	354234	Sigma Aldrich
<i>MEM-NEA (Non Essential Amino Acids)</i>	11140-035	ThermoFisher
Metformina [(3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina)]	317240-5GM	Sigma Aldrich
MIDORI Green Advance DNA Strain	523268	Cultek
<i>MTT Reagent A</i>	CT01-5	Sigma Aldrich
NaOH	1603091000	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetrametilethilenediamin	T9281-25	Sigma Aldrich
N-Acetilcisteïna	A0737	Sigma Aldrich
Piruvat Sòdic	11360-039	ThermoFisher
Proteïna B27	17504044	Invitrogen
<i>Revelador Immobilon® Forte Western HRP Substrate</i>	WBLUF0500	Sigma Aldrich
Tamoxifè [(Z)-4HidroxiTamoxifè]	579002	Sigma Aldrich
Tripsina-EDTA	25200-056	ThermoFisher
Tripsina	T6763	Invitrogen
Tris	BP1521	FisherScientific
<i>TSH (Thyroid Stimulating Hormone)</i>	T8931-1VL	Sigma Aldrich
Tween 20	P1379-1L	Sigma Aldrich

INHIBIDORS		
LY294002 (Inhibidor de PI3K)	S1105	Selleckchem
Mirdametininim (Inhibidor de MEK)	PD0325901	Selleckchem
PD184352 (Inhibidor de MEK)	CI-1040	Selleckchem
PH-797804 (Inhibidor de p-38)	PZ0259	Sigma Aldrich
Pictilisib (Inhibidor de PI3K)	GDC-0941	Selleckchem
SB203580 (Inhibidor de p-38)	PB 203580	Selleckchem
SB431542 (Inhibidor de TβRII)	S1067	Selleckchem
U0126 (Inhibidor de MEK)	109511-58-2	Sigma Aldrich
Y-27632 (Inhibidor de ROCK)	Y0503-1MG	Sigma Aldrich
ANTICOSSOS		
AKT Total	sc-1618	Santa Cruz Biotechnology
Alexa-Fluor anti-Mouse	11029	Invitrogen
Alexa-Fluor anti-Rabbit	11037	Invitrogen
CICLINA D1	Sc-20044	Santa Cruz Biotechnology
CITOQUERATINA	9377	Abcam
CITOQUERATINA-8	AB531826	DSHB
CLEAVED-CASPASA3	9661	Cell Signaling
E-CADERINA	610181	BD Biosciences
GAPDH	8245	Abcam
PANERK	610623	BD Biosciences
Peroxidase-conjugated anti-Mouse	115-007-003	Jackson
Peroxidase-conjugated anti-Rabbit	011-000-003	Jackson
phospho-AKT serine 473	9271	Cell Signaling
phospho-AMPKα Treonine 172	2535	Cell Signaling
phospho-ERK	9101	Cell Signaling
Phospho-FAK 397	700255	Thermo Fisher
phospho-MKK4 treonine 261	9151	Cell Signaling
phospho-mTOR serine 2448	2971	Cell Signaling
phospho-P38 treonine 180/tirosine 182	4511	Cell Signaling
phospho-P70S6K	9205	Cell Signaling
phospho-SMAD2 serine 465/467/Smad3 serine 423/425	8828	Cell Signaling
phospho-STAT3		
PTEN	9188	Cell Signaling
R.Estrògens	GA084	DAKO
SMAD2	5339	Cell Signaling

SMAD2/3	610842	BD Biosciences
SMAD3	28379	Abcam
TUBULINA	T6199	Sigma
VIMENTINA	550513	BD Biosciences
A-RACEMASA	GA060	DAKO
B-ACTINA	a5441	Sigma
B -CATENINA	610153	BD Biosciences
SONDES DE RT-PCR		
<i>Gene Cdh2</i>	Mm01162497_m1	Applied biosystems, ThermoFisher
<i>Gene Gadph</i>	Mm999915_g1	
<i>Gene Twist1</i>	Mm00442036_m1	
<i>Gene Vimentin</i>	Mm01333430_m1	

Taula 9: Reactius, anticossos i drogues utilitzades en aquesta tesi.

2.2. Línies cel·lulars humanes utilitzades

2.2.1. Línies cel·lulars humanes d'endometri



ARK-1: Adenocarcinoma serós endometrial. CENE. De dona afroamericana (62 anys). Fase IVA.

ARK-2: Adenocarcinoma serós endometrial. CENE. De dona afroamericana (63 anys).

És la fase més avançada d'ARK-1 (IVB) Expressa més receptors HER2 que ARK-1.

HEC-1A: Adenocarcinoma endometrial. CEE. De dona asiàtica (71 anys).

Ishikawa: Adenocarcinoma endometrial. CEE. De dona asiàtica (39 anys).

MFE-296: Adenocarcinoma endometrial. CEE. De dona europea (68 anys).



2.2.2. Línies cel·lulars humanes de tiroide

CAL-62: línia cel·lular derivada d'un carcinoma de tiroide anaplàstic. ATC. De dona europea (70 anys).

FTC-133: línia cel·lular derivada d'un carcinoma de tiroide fol·licular. FTC. D'home europeu (42 anys).

2.3. Aïllament de cèl·lules de ratolí

2.3.1. Cèl·lules epitelials d'endometri

Per a l'aïllament de cèl·lules epitelials d'endometri es procedeix a l'eutanàsia del ratolí que ha de tenir unes 3-5 setmanes de vida i posteriorment es fa l'extracció de l'úter. Es neteja l'úter del greix que el circumda i es talla cada branca de l'úter en 3-4 trossos. Es posen els trossos en un tub de 15 ml amb medi de digestió de tripsina que consta d'1,5 ml de HBSS i 1 ml de tripsina. Es deixa l'úter amb tripsina durant 60 minuts a 4°C en agitació. Posteriorment es posa el falcon amb l'úter en agitació a temperatura ambient durant 45 minuts. Un cop transcorregut el temps indicat, neutralitzarem la tripsina afegint-li el doble de volum de digestió de tripsina de medi DMEM 10% de Sèrum Fetal Boví. Tot seguit es treu l'epiteli, pinçant una punta del úter i amb l'ajut d'un bisturí estèril, es va passant per sobre l'úter fins que surti per l'altra punta el cilindre d'epiteli. Finalment es recull l'epiteli en un falcon de 10 ml, s'enrasa amb PBS i es centrifuga a 800 rpm durant 5 minuts. Obtenim el pellet de cèl·lules en el tub.

2.3.2. Cèl·lules epitelials de tiroide

Per a l'aïllament de cèl·lules epitelials de tiroide i, de forma similar al procediment descrit anteriorment, es procedeix a l'eutanàsia del ratolí que en aquest cas ha de tenir 2-4 mesos de vida. Posteriorment es fa l'extracció de la tiroide. Aquesta és tallada amb un bisturí estèril en trossos petits d'aproximadament 0,5 cm i aquests són dipositats en un tub d'1,5 ml que conté un buffer d'1 ml de medi DMEM F-12, 50 µL de col·lagenasa tipus II (100 mg/ml), 50 µL de Sèrum Fetal Boví (100% pur) i 1 µL d'inhibidor de ROCK Y-27632 (10 µM). Es deixa 1h 30 minuts a 37°C i en agitació (900 rpm). Posteriorment es dissocia la barreja amb una pipeta *up-and-down* 20-30 cops i es deixa reposar 2 minuts. Després s'agafa el sobrenedant (un 750 µL) i es passa a un tub falcon de 15 ml. S'afegeixen 750 µL de PBS a la barreja prèvia i es pipeteja *up-and-down* 20-30 cops. Es deixa reposar 2 minuts i es torna a agafar el sobrenedant i es diposita al mateix tub falcon de 15 ml esmentat. Es repeteix el procés des del PBS dues vegades més. Posteriorment es filtra tot aquest sobrenedant amb un *strainer* 40 µM i es centrifuga el que passa a través del filtre a 1000 rpm durant 3 minuts a RT. S'aspira el sobrenedant i queda un pellet de cèl·lules que es pipetegen amb un medi específic de tiroide, i es planten les cèl·lules en la densitat que es desitja.

2.4. Establiment de cultius cel·lulars en dues dimensions (2D)

Per a l'establiment de cultius cel·lulars en 2D es segueix el mateix mètode per tots els tipus de cèl·lules epitelials primàries de ratolí però s'altera el medi utilitzat en cada cas.

Es parteix del pellet de cèl·lules en el tub de falcon de 15 ml, i s'afegeix 1 ml de medi preparat*. Es pipeteja *up-and-down* 20-30 cops i es planta en la placa que interressi amb una densitat d'unes 4-5 agrupacions de cèl·lules.

*Medi preparat per a endometri: per a cada 10 ml de DMEM F12, s'afegeixen 100 µl de piruvat sòdic, 100 µl d'antibiòtic Streptomycina i 10 µl d'antifúngic Anfotericina. L'anomenem medi Basal. Al medi basal se li afegeixen 30 µl de *Dextran Coated Charcoal Stripped Serum* (100% pur)/1 ml de medi basal.

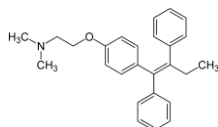
*Medi preparat per a tiroide: per a cada 10 ml de medi Basal s'afegeixen 100 µl de sèrum Sèrum Fetal Boví (100% pur), 100 µl d'Aminoàcids no essencials (100% pur), 100 µl de Glutamax (100% pur), 50 µl d'N-acetilcisteïna (100% pur), 10 µl d'inhibidor de ROCK Y-27632 (10 µM), 100 µl d'Insulina-transferrina-seleni (100% pur), 1 µl d'EGF (5 ng/ml) i 12,5 µl de d'Hormona estimulant de tiroide (TSH; 100 ng/ml).

2.5. Establiment de cultius cel·lulars en tres dimensions (3D)

Per al l'establiment de cultiu cel·lular en 3D, primerament es fa un rentat a la placa amb PBS i es tripsinitzen les cèl·lules amb tripsina durant 3-4 minuts a 37°C a l'incubador. De manera paral·lela, es prepara el llit de matrigel 100% a la placa que es vol utilitzar. És important que el llit de matrigel estigui com a mínim 30 minuts a 37°C. Les cèl·lules que s'estan tripsinitzant es treuen de l'incubador i es bloqueja la quantitat de tripsina amb el doble de quantitat de medi de neutralització DMEM. S'allarga el volum fins a 15 ml en un falcon amb PBS i es centrifugar a 1000 rpm 3 minuts a RT. S'aspira el sobrenedant i es resuspèn amb medi Basal. Es pipeteja *up-and-down* unes 10-15 vegades. S'afegeix 3% de matrigel pur i es planta en la placa desitjada amb una densitat de 2-3 agrupacions de cèl·lules. Al dia següent es canvia el medi per medi BIE [medi format per: per cada 10 ml de medi Basal, 100 µl d'Insulina-transferrina-seleni (100% pur), 1 µl d'EGF (5 ng/ml)] suplementat amb 3% de matrigel. A partir de llavors, es fa el mateix canvi de medi amb una freqüència de canvi de dos dies.

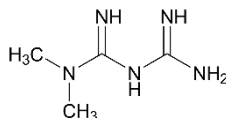
2.6. Tractaments farmacològics *in vitro*

2.6.1. Tamoxifè



El Tamoxifè ((Z)-4HidroxiTamoxifè) s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol amb etanol pur fins a 1 mM. Posteriorment per als cultius cel·lulars, aquesta solució de Tamoxifè s'utilitza raó de 0.5 µL/ml. Es deixa 24 hores en cultiu i llavors es pot canviar el medi perquè s'assumeix que el Tamoxifè ja ha sigut efectiu i les cèl·lules epitelials quedaran amb el gen d'interès que està flojexat per les seqüències loxP, delecionat.

2.6.2. Metformina



La Metformina [3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina] s'adquireix en pols (Sigma-Aldrich) i es dissol amb PBS o H₂O miliQ estèrils fins a una dissolució d'1M (162.62 g per cada litre de medi basal). Aquesta s'aliquota, es manté a -20 °C, i es treu quan s'ha d'utilitzar a 20 mM (mitjançant una dilució d'1:50). Els tractaments tindran una duració diferent en funció del que es vulguis estudiar, i està especificada en cada experiment; de forma general, per l'estudi de canvis en vies de senyalització, tindran una duració de 15 minuts i, per l'estudi de canvis en la proliferació, duraran 48-72 hores.

2.7. Mesura del diàmetre de les glàndules en tres dimensions

Per a l'estudi del diàmetre de glàndules en tres dimensions, s'ha procedit a generar cultius d'aproximadament 7 dies, que és el temps en el qual les glàndules ja tenen dimensions concretes en funció del genotip i/o tractament que s'estudiï. Es fan les fotos amb el microscopi estereoscòpic Nikon Eclipse Ts2R. Per a la mesura del diàmetre s'utilitza el software d'anàlisi d'imatges ImageJ versió 1.46r;NIH, Bethesda, MD., i es mesura cada glàndula en píxels. Aquests píxels s'equivaldran a micròmetres, mitjançant l'assignació prèvia de l'escala de la foto en micròmetres, als píxels corresponents. S'utilitza aquesta escala per a totes les mesures i es farà la conversió a l'excel. Posteriorment s'utilitza el programa GrapPhad.9. per a l'anàlisi estadístic dels resultats.

2.8. Assaig de la proliferació cel·lular mitjançant l'assaig d'incorporació de BrdU

Per a l'estudi de proliferació cel·lular s'utilitza la BrdU (Bromodesoxiuridina) que és un nucleòtid sintètic anàleg de la timidina marcat i que s'utilitza comunament en la detecció de cèl·lules que estan en procés de proliferació. Així, les cèl·lules poden incorporar la BrdU en lloc de la timidina a les noves cadenes d'ADN que es repliquen.

Per a l'assaig d'incorporació de l'assaig de BrdU es procedeix a afegir la BrdU al cultiu a una concentració final de 4 µg/mL i es deixa 12 hores. Posteriorment es fixa el cultiu amb paraformaldehid (PFA) fred al 4% durant 15 minuts i després es fan 3 rentats amb PBS. Seguidament es desnaturalitza l'ADN amb àcid clorhídric (HCl) 2 M durant 30 minuts a l'incubador a 37°C (aquest pas permet que l'anticòs primari pugui unir-se més endavant a BrdU). S'afegeix tetraborat sòdic 0,1 M durant 2 minuts per tal de neutralitzar l'HCl. Posteriorment es fan 3 rentats amb PBS i s'afegeix la solució de bloqueig (5% de HS, 5% de FBSi, 0,2% de glicina i 0,1% de tritó X-100 en PBS) durant 1 hora. A continuació es tornen a fer 3 rentats amb PBS i s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs primari de ratolí anti-BrdU (ref. M0744 de DAKO, dilució 1/100) durant 18 hores. Finalment es retira l'anticòs primari, es renta amb PBS tres vegades i s'incuba l'anticòs secundari de cabra anti-ratolí Alexa Fluor 546 (ref. A11003 de Life Technologies, dilució 1/500) durant 3 hores. Passat aquest temps, ja es pot visualitzar la tinció de la BrdU mitjançant microscopi confocal (Olympus FluoView™ 1000) i realitzar el comptatge per al posterior anàlisi estadístic amb GrapPhad9.0.

2.9. Avaluació de la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig MTT

Per a l'anàlisi de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig MTT (bromur de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli tetrazoli]), primerament es prepara l'MTT: es dilueixen 500 mg de pols del MTT en 100 mL de medi de cultiu habitual. Això i els passos següent es realitzaran a les fosques, ja que el MTT és fotosensible. Aquesta solució de MTT queda a 5 mg/ml i es guarda a -20°C embolicat amb paper de plata fins el moment que es necessiti. Un cop tinguem el cultiu cel·lular llest, es descongela el MTT i es prepara la dilució de treball; una dilució 1/5, diluïda en el medi de cultiu habitual. S'afegeixen 75 µL de la solució de MTT a cada pou en una placa de 96 pous sense aspirar el medi prèviament. Es deixa la placa a l'incubador a 37°C durant 30 minuts. Posteriorment s'aspira el medi i s'afegeixen 50 µL de dimetilsulfòxid (DMSO) per pou de placa de 96. En aquest punt cal tenir en compte que el compost inicial (MTT) és un compost d'un color groc, que en ser reduït a formazà en les cèl·lules vives a través d'enzims oxioreductases

NAD(P)H-dependents canvia a un color lila molt intens que es pot mesurar quantitativament amb un espectrofotòmetre. Finalment es deixa la placa en agitació durant cinc minuts embolicada amb paper d'alumini. Finalment es llegeix la placa a l'espectrofotòmetre de forma dual: filtre de mesura: 590 nm → 595 nm i filtre de referència: 620 nm → 655 nm. Es passen les dades a l'excel i es fa l'anàlisi estadística per tal de veure si els resultats tenen significança estadística.

2.10. Assaig de migració *Transwell*

Per a l'avaluació migratòria de les cèl·lules es realitza l'assaig de migració que consisteix en sembrar les cèl·lules en el seu medi basal a sobre d'inserts *transwell* de 8 µm que contenen un filtre, en presència o no de Tamoxifè durant 24 h. Posteriorment es canvia el medi per medi basal sol o medi basal complementat amb la droga d'interès (en el nostre cas TGF-β). Després de 72 h s'elimina el medi i la part superior de les membranes del filtre es neteja amb un cotó. Es tallen les membranes de les insercions amb un bisturí i les cèl·lules de la part inferior de la membrana (cèl·lules migratòries) es tenyeixen amb 1% de Hoechst durant 10 min a RT. Els nuclis es visualitzen amb un microscopi de fluorescència. S'examinen deu camps aleatoris i els resultats es representen com a percentatge respecte al control.

3. Tècniques histològiques

3.1. Histologia bàsica

Els animals d'experimentació es sacrifiquen amb dislocació cervical i es procedeix a la documentació de la presència o no d'alteracions macroscòpiques. Després s'extreuen els òrgans d'interès, que en aquesta tesi són bàsicament endometri, tiroide i pròstata, i es fixen amb formol durant 16 hores a 4°C. Posteriorment es col·loquen en cassets, es deshidraten i s'inclouen en parafina. Es fan talls de cada bloc de parafina de 5 µm i es tenyeixen amb H&E al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Dos patòlegs revisen i avaluen de manera independent i a cegues la histologia de cadascun dels teixits basant-se en criteris preestablerts.

3.2. Immunohistoquímica

Els blocs de teixits d'interès poden ser analitzats mitjançant assajos d'immunohistoquímica. Per a tals, es realitzen talls de parafina de 3 µm i s'assequen durant 1h a 65°C. Després es realitza un tractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es realitza el desemascament antigènic, que permet recuperar i exposar antigens emmascarats durant la preparació de la mostra i que es basa en incubar els portaobjectes amb un tampó comercial que conté Tris/EDTA 50x a pH=9 durant 20 minuts a 95°C. El següent pas és bloquejar la peroxidasa endògena incubant els portaobjectes amb una solució d'H₂O₂ al 3% amb la finalitat de reduir el soroll de fons. Tot seguit es realitzen 3 rentats amb PBS i s'incuba la mostra amb l'anticòs primari durant 30 minuts a RT. Posteriorment es fan 3 rentats més de PBS i s'incuba l'anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa (HRP) i s'incuba durant 30 minuts. Finalment s'aplica el cromogen DAB (diaminobenzimida, Sigma-Aldrich) per rebel·lar la reacció i es realitza una contra-tinció amb hematoxilina per tal de visualitzar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

4. Tècniques bioquímiques

4.1. Immunodetecció de proteïnes

4.1.1. Western blot

4.1.1.1. Extracció de proteïna total en SDS

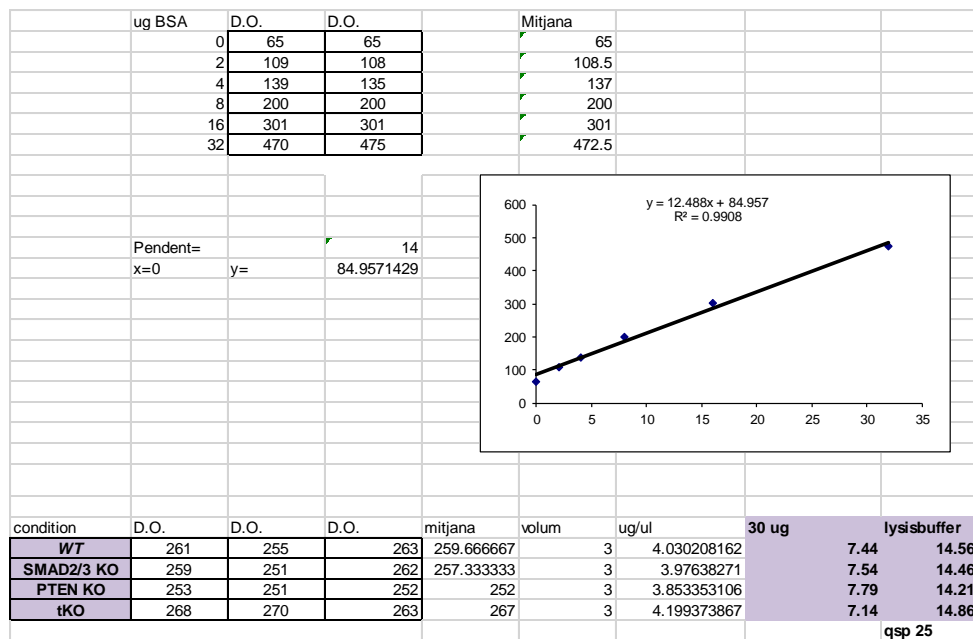
Per l'extracció de proteïnes de cultius cel·lulars, prèviament hem plantat les cèl·lules en plaques m24 per tenir una quantitat gran de proteïna. Per a l'extracció de proteïnes de teixit, s'extreu el teixit del ratolí un cop eutanasiat, es talla a trossos petits i es barreja *lysis buffer* (composició: 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% (p/v) SDS i 0.01% (p/v) Azida de sodi, pH 7.4).

Pels cultius, primerament es fa un rentat amb PBS i s'afegeix *lysis buffer*, normalment 50µL /pou, i sempre en funció de la quantitat de cèl·lules del pou; a més cèl·lules, més *lysis buffer*. Posteriorment, amb puntes de pipeta invertides, es rasquen els pous i s'aspira el volum de *lysis buffer* juntament amb les cèl·lules i es diposita tot en eppendorf d'1 ml. Seguidament es soniquen les mostres a 10% (15-20% pels teixits) de potència en un sonicador Branson® digital i ja estaran llestes per a ser quantificades.

4.1.1.2. Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry

La quantificació de proteïnes es realitza a través del mètode *Lowry*, que consisteix en establir una recta patró d'absorbància de concentracions de BSA (*Bovine Serum Albumin*) conegudes. S'agafa una placa m96 i s'afegeixen 25 µL de *DC Protein Assay Reagent A*, 5 µL de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 de BSA i 200 µL de *Protein Assay Reagent B*. Per les mostres s'utilitza la mateixa quantitat de *Reagent A* i *Reagent B* però 3 µL de cada mostra. Cada pou experimentarà una reacció colorimètrica que s'avaluarà amb l'espectrofotòmetre X. S'estableix la corba patró i es fa una extrapolació amb els valors generats de l'absorbància (densitat òptica: D.O.) a 595 nm de longitud d'ona obtinguda amb les mostres de concentracions desconegudes. Es coneix quina concentració en µg/µL de proteïna hi ha a la mostra i s'igualava el volum amb *lysis buffer*.

Exemple de mostres de cèl·lules epitelials endometrials en 3D amb 4 genotips diferents:



Imatge 2: Exemple de quantificació Lowry. Es mostra la corba patró que es fa amb les concentracions conegudes de BSA en µg/ml i els resultats dels valors d'absorbàncies en densitat òptica i concentracions proteïques de les mostres per determinar.

4.1.1.3. Electroforesi en gel SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Un cop tenim quantificades les proteïnes de les mostres, es procedeix a l'electroforesi d'aquestes en un gel SDS-PAGE. Per això, es munta la cubeta d'electroforesi i s'omple amb *Running Buffer* (composició 1.92 M Glicina, Tris 250 mM, 1% SDS, pH 8.3). Es carreguen les mostres i el marcador (*Page Ruler™*) que ens identificarà el pes molecular de les proteïnes analitzades. S'aplica un voltatge de 120 volts al sistema durant 1h 45 minuts aproximadament.

4.1.1.4. Transferència de proteïnes, bloqueig i incubació anticossos

A continuació i un cop finalitzada l'electroforesi de les proteïnes, es transfereixen aquestes a una membrana, prèviament activada per afavorir la seva capacitat hidrofílica amb metanol durant 10 segons i H₂O miliQ durant 10 segons més. Es procedeix després a fer el muntatge del 'sandwich' que consisteix en un suport de plàstic, una esponja, paper whatman, el gel SDS-PAGE amb les proteïnes, la membrana activada, paper whatman, esponja i suport de plàstic. S'afegeix *Transfer Buffer* (composició: 0.25 M Tris, 1.92 M Glicina, pH 8.3) fins omplir la cubeta, i s'aplica un voltatge de 90 Volts durant 1h 30 minuts aproximadament i sempre en funció del pes molecular de les proteïnes que volem veure; proteïnes de més pes molecular requereixen més temps i a la inversa.

Acabada la transferència es desfà el muntatge, i es bloqueja la membrana amb les proteïnes transferides mitjançant 5% de llet en 20 ml de TBS diluït de l'stock 1/10 (composició TBS stock: Tris 200 mM, 1.5 M NaCl, pH 7.4) + 1 ml de tensioactiu Tween 20 per tal d'evitar unions inespecífiques durant 1 hora. A continuació es fan 3 rentats amb PBS i s'incuba l'anticòs primari ON a 4°C i en agitació. Tots els anticossos utilitzats en aquesta tesi per la tècnica de Western Blot s'han utilitzat a dilució 1/1000 a excepció de les proteïnes per avaluar la càrrega: Tubulina, β -actina i GAPDH (1/10.000).

Passat el temps d'incubació de l'anticòs primari, es fan 3 rentats amb PBS de 15 minuts i s'incuba l'anticòs secundari (diluït a 1/10.000 en TBS-T + 5% llet) durant 1 hora a RT. Passat aquest temps, es fan 3 rentats més de PBS de 15 minuts i la membrana ja està llesta per a ser revelada.

4.1.1.5. Identificació i detecció de proteïnes

Es revelen les proteïnes amb unes gotes de revelador *Immobilon® Forte Western HRP Substrate* en paper film. Es deixa la membrana 2-3 minuts en contacte amb el revelador, i es detecten les proteïnes amb el Chemidoc Biorad Universal Hood II. Totes les membrananes es bloten amb una de les següent proteïnes de càrrega (Tubulina, β -actina o GAPDH) per tal de corroborar una càrrega de proteïna equitativa en totes les mostres.

4.1.2. Immunofluorescència

Per a realitzar un assaig d'immunofluorescència, les cèl·lules es sembren en un volum de 40 μ l/pou en plaques de 96 pous negres amb fons microclar (Greiner Bio-one). Els cultius cel·lulars es fixen amb paraformaldehid al 4% durant 15 min a RT i es renten dues

vegades amb PBS. Posteriorment el cultiu es bloqueja amb solució bloqueig caspasa (composició: 2% de *Serum Horse*, 0.1% de Tritó, 2% de BSA i q.s.p. 40 mL de PBS) durant 1h a RT. Després i en funció de l'anticòs primari que s'utilitza després, les cèl·lules es permeabilitzen o no amb metanol al 100% durant 5 min. A continuació els cultius s'incuben ON a 4 °C amb l'anticòs primari diluït amb TBS-T + BSA 5% + 20% d'Azida. Tots els anticossos utilitzats en aquesta tesi per la tècnica d'immunofluorescència s'han utilitzat a dilució 1/250. Passada la nit, les cèl·lules es renten dues vegades amb PBS i s'incuben amb PBS que conté 5µg/mL de Hoechst i una dilució d'1:500 d'anticòs secundari Alexa-Fluor anti-conill, Alexa-Fluor 488 o Alexa-Fluor anti-ratolí durant 4 h a RT. La immunofluorescència es visualitza i analitza mitjançant microscòpia confocal (model FV1000; Olympus) amb els objectius d'ampliació 109, 209 i 609 d'immersió en oli. L'anàlisi de les imatges obtingudes es realitzen amb el programa FLUOVIEW FV100 (Olympus).

4.2. PCR a temps real quantitativa: RT-PCR

Per a la realització de la PCR quantitativa a temps real, primerament s'extreu l'ARN total mitjançant els kits NZYol de Nzytech segons el protocol del fabricant. Posteriorment es quantifica l'ARN total amb un nanodrop NanoPhotometer® N60.

La reacció es realitza mitjançant un total d'1 µg d'ARN total amb el kit de transcripció inversa TaqMan® d'Applied Biosystems. La detecció quantitativa de l'expressió gènica per PCR en temps real es realitza amb el sistema de detecció de seqüències ABI Prism 7000 mitjançant el TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les seqüències d'encebadors utilitzades com a sondes (Taula 9) per a la PCR s'obtenen comercialment d'Applied biosystems *Assay-on-demand*. L'expressió relativa de cada ARN es determina a partir dels valors del llindar del cicle (Ct), que es normalitzen a través de la quantitat de ARN de GAPDH com a control endogen. La significació estadística es determina mitjançant la prova *T-student* o ANOVA en funció del nombre de grups que es volen comparar, amb un valor $p \leq 0,05$.

Totes les tècniques i experiments realitzar es van repetir tres vegades i cada grup de tractament es va realitzar per triplicat.

RESULTATS

RESULTATS

BLOC 1

1. ESTUDI DE LA PÈRDUA DE POLARITAT EN CÈL·LULES EPITELIALS D'ENDOMETRI

La matriu extracel·lular i l'establiment correcte de la polaritat de les cèl·lules epitelials tenen un paper crític en l'homeòstasi de les cèl·lules. De manera que, la pèrdua de polaritat cel·lular és un factor crític per al desenvolupament d'un procés de carcinogènesi (Hastings et al., 2019).

Per altra banda, les vies de transducció del senyal TGF- β /SMADs i PI3K/PTEN/AKT tenen un paper important en la regulació de l'homeòstasi de les cèl·lules epitelials i les pertorbacions d'aquestes dues vies poden també estar implicades en processos de carcinogènesis.

La molècula **TGF- β** té un paper molt protagonista en aquesta tesi doctoral, degut a la seva curiosa particularitat: és una molècula amb doble funció depenent del context cel·lular on treballa; fa de **supressora tumoral** en cèl·lules sanes o pre-cancerígenes i de **promotora tumoral** en cèl·lules malignes o tumorals, és a dir, quan d'alguna manera el procés de carcinogènesi ja s'ha iniciat (Massagué, 2008).

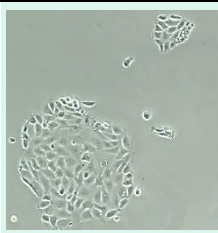
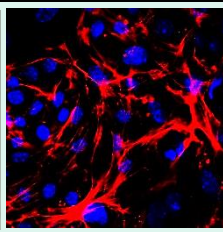
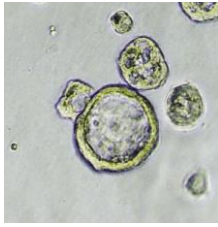
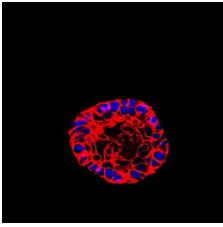
Estudiar i caracteritzar els efectes del TGF- β i les seves vies de transducció en diferents contextos cel·lulars és clau per desxifrar i seguir aprofundint en els factors que determinen la seva acció de supressió o promoció tumoral.

Així doncs, vam voler posar el focus en la relació entre la **polaritat cel·lular** i les respostes del **TGF- β** així com la influència de la seves vies (canònica/Smads o no canònica) en cèl·lules epitelials d'endometri.

En tot aquest context d'informació, l'inici d'aquesta tesi doctoral comença posant el focus en la importància de la polaritat cel·lular i en poder respondre la primera pregunta:

Les cèl·lules epitelials endometrials responen igual al TGF- β quan estan polaritzades respecte quan no ho estan?

El primer que vam fer va ser anar al més essencial que consistia en cultivar les cèl·lules epitelials endometrials extretes de ratolí amb o sense ECM (*extracel·lular matrix*), és a dir, en condicions de polaritat o no:

ECM	CONTEXT CEL·LULAR	AGRUPACIONS	CULTIU	FENOTIP	
NO	NO POLARITAT	Petites agrupacions	Bidimensional (2D)		
SÍ	POLARITAT	Organoides de cèl·lules de forma esfèrica	Tridimensional (3D)		

Taula 10: Característiques i fenotip dels cultius cel·lulars d'endometri 2D i 3D. Al fenotip, imatges de contrast de fases (esquerra) i de confocal (dreta) tenyides amb Fal-loidina i Hoechst per visualitzar el citoesquelet i el nucli de les cèl·lules. **ECM:** *extracel·lular matrix*, matriu extracel·lular.

Les cèl·lules inicialment són sempre cultivades en condicions 2D i posteriorment s'aplica Matrigel® que és una matriu extracel·lular sintètica formada bàsicament per col·lagen i altres proteïnes de la matriu extracel·lular, a la part inferior on es planten les cèl·lules (fa de base) i en el propi medi rodejant les cèl·lules. El Matrigel provoca una organització tridimensional de les cèl·lules epitelials endometrials que formen organoides i, aquestes cèl·lules mostren un alt grau de polarització (Eritja et al., 2010). El procés d'adquisició del fenotip 3D dura uns dies i té varies fases (Fig. 1):

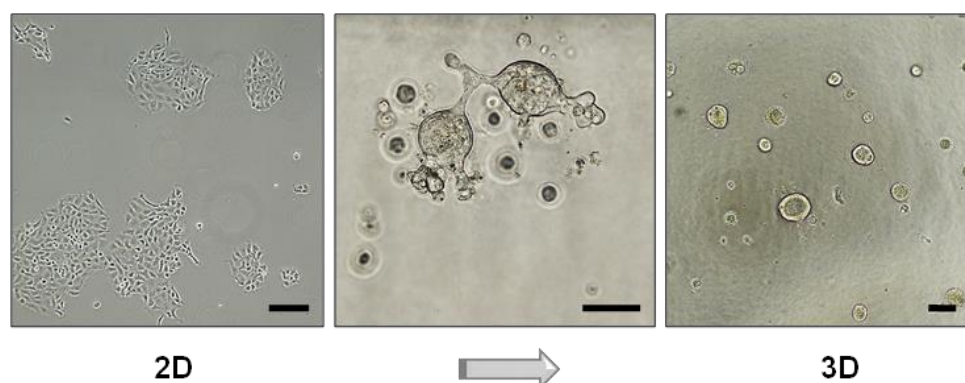


Figura 1: Imatges representatives de microscopi de contrast de fases de cèl·lules epitelials endometrials en 2D i la seva evolució a 3D. Escala 100 µM

La primera informació obtinguda en aquesta tesi és la caracterització de marcadors epiteli-mesènquima en aquestes cèl·lules en 2D i 3D (Fig. 2). Sota condicions 2D, les cèl·lules formen monocapes i en 3D, formen organoides:

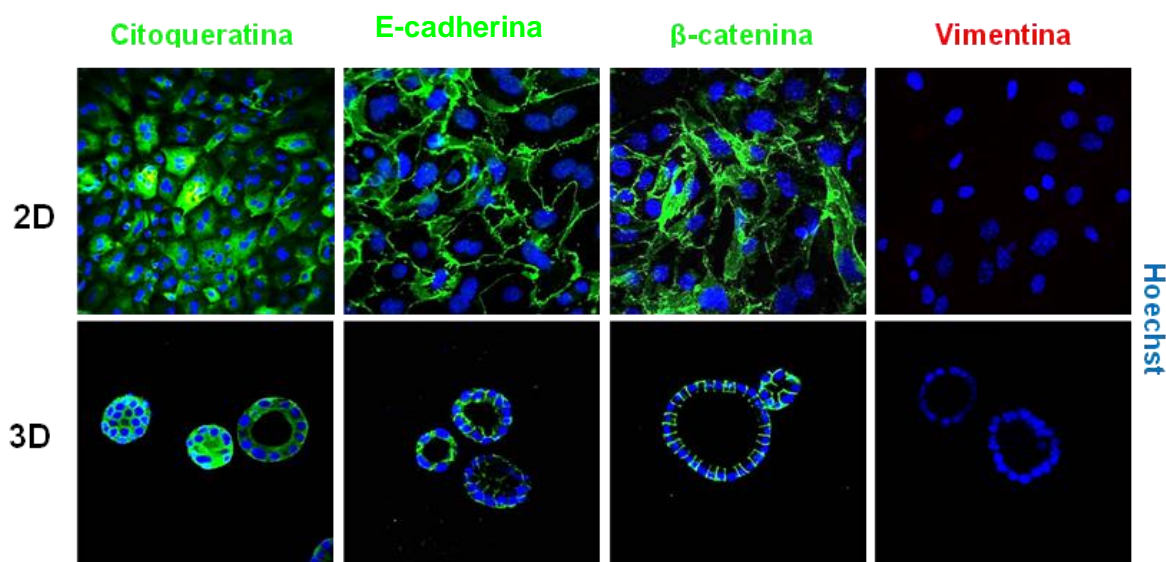


Figura 2. Les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí formen estructures diferents amb l'adició de matriu extracel·lular i condicions tridimensionals (3D) en comparació als cultius bidimensionals (2D). Immunofluorescència de marcadors epitelials (Citoqueratina, E-Caderina, β-catenina) i marcador mesenquimal (Vimentina) de cèl·lules epitelials endometrials de ratolí. En el cultiu 2D la immunofluorescència es va fer als 2 dies i en el cultiu 3D, als 6 dies i un cop els organoides estaven plenament formats. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM.

1.1. Estudi dels efectes cel·lulars de l'absència de polaritat i matriu extracel·lular en la resposta al TGF-β

La pèrdua de polaritat cel·lular causada per l'absència de matriu extracel·lular (Matrigel®) impedeix l'apoptosi induïda pel TGF-β

Resultats previs del nostre laboratori van demostrar que el TGF-β desencadena l'apoptosi d'organoides de cèl·lules epitelials endometrials polaritzades cultivades en 3D (Eritja et al., 2017). La disrupció de la polaritat cel·lular és un segell distintiu del càncer i està íntimament implicada la progressió d'aquest. Per tant, vam decidir analitzar els efectes de la polarització cel·lular sobre la resposta pro-apoptòtica induïda pel TGF-β a les cèl·lules epitelials endometrials. Amb aquesta finalitat, es van plantar cèl·lules endometrials aïllades en presència o absència de Matrigel. Per tal d'abordar els efectes de la polarització cel·lular induïda per Matrigel sobre les respostes del TGF-β, els organoides endometrials i les monocapes de cèl·lules endometrials es van tractar amb el TGF-β.

Com vam demostrar anteriorment, l'addició del TGF- β a cèl·lules endometrials cultivades com a organoides 3D va provocar l'aparició l'activació de la caspasa-3 (Eritja et al., 2017) en les cèl·lules. Sorprenentment, el tractament de les cèl·lules cultivades en 2D no polaritzades en absència de Matrigel amb el TGF- β no va provocar l'activació de la *cleaved-caspasa3* (Fig. 3), cosa que indica que la manca d'ECM impedeix l'apoptosi induïda pel TGF- β .

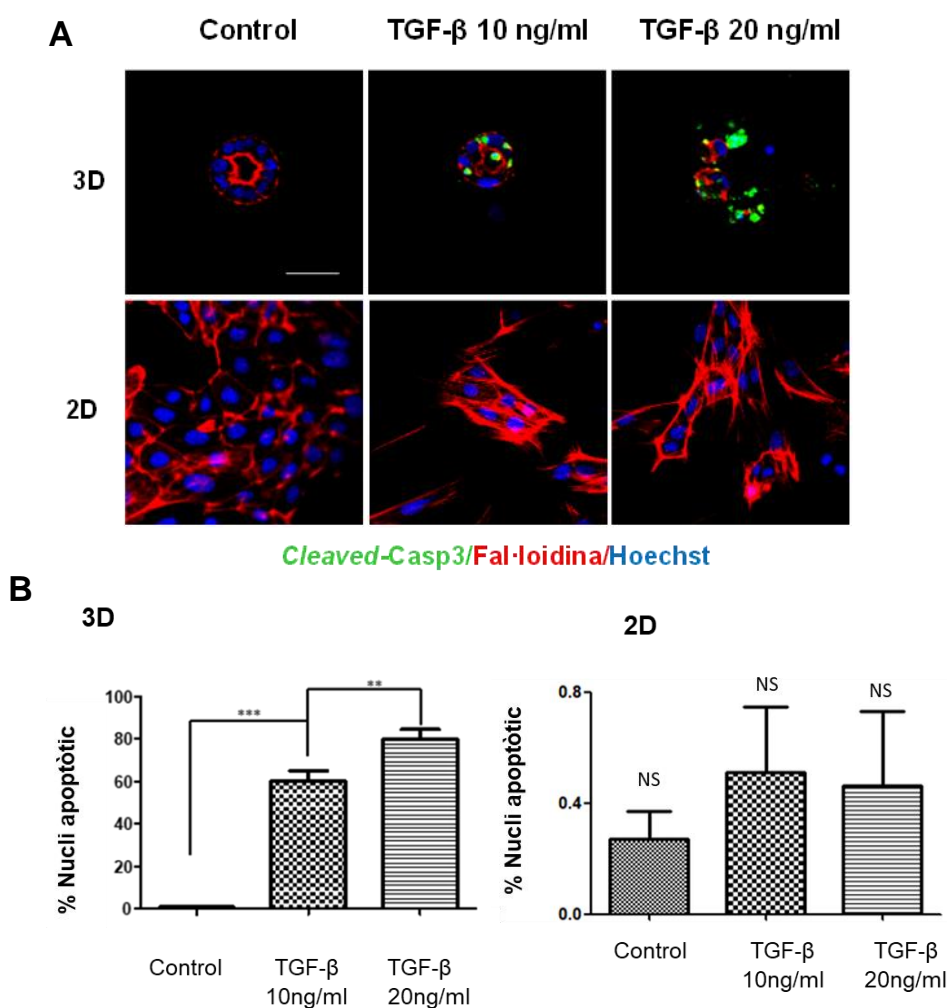


Figura 3. TGF- β causa l'apoptosi cel·lular en cultius 3D de cèl·lules epitelials endometrials però no en cultius 2D. A. Immunofluorescència de *cleaved-caspasa3* després del no tractament (control) i tractament amb TGF- β a 10 ng/ml i 20ng/ml durant 72 h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M. **B.** Quantificació de la *cleaved-caspasa3* sota les condicions esmentades. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

L'absència de matriu extracel·lular augmenta la senyalització de l'eix PI3K/AKT i causa resistència a l'apoptosi induïda pel TGF-β

La via de senyalització PI3K/AKT té un paper fonamental en la regulació de la supervivència cel·lular i l'apoptosi de les cèl·lules epitelials endometrials. Els nostres estudis anteriors demostren que la deficiència de *Pten* condueix a un augment en la senyalització PI3K/AKT, i això dificulta l'apoptosi induïda pel TGF-β dels organoides endometrials (Eritja et al., 2017, 2021). Aquests resultats ens van permetre investigar si l'ECM pot regular l'activació de la via de senyalització PI3K/AKT i, per tant, la sensibilitat a l'apoptosi induïda pel TGF-β. Per tal d'abordar aquesta hipòtesi, es va analitzar la fosforilació AKT mitjançant western blot en lisats d'organoides 2D i 3D. Com es mostra a la Fig. 4A, els organoides 3D mostraven un nivell notablement reduït de la fosforilació AKT en comparació amb les monocapes 2D, sense diferències en l'expressió de PTEN. A continuació, ens vam preguntar si aquesta diferència en la fosforilació AKT podria ser el resultat de la pròpia estimulació de Matrigel o, en cas contrari, ser el resultat de l'adquisició d'estructura glandular polaritzada. Per abordar aquesta pregunta, les cèl·lules epitelials endometrials en monocapa 2D no polaritzades es van estimular amb dosis creixents de Matrigel durant 48 h. Posteriorment els llisats es van sotmetre a anàlisi de Western blot. El que es va observar és que l'augment de la concentració de Matrigel va provocar una reducció marcada de la fosforilació de mTOR, AKT, p70S6K i ERK (Fig. 4B).

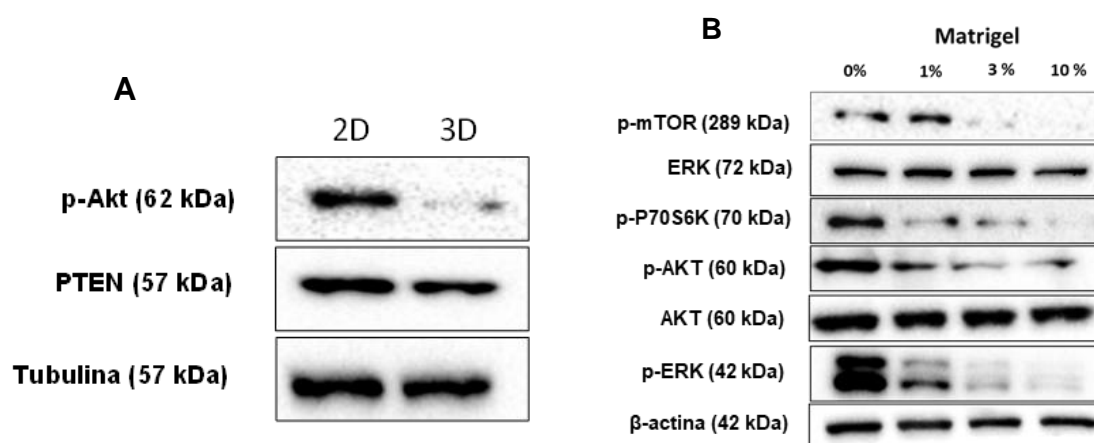


Figura 4. La presència de matriu extracel·lular causa una disminució dosi-depenent de les vies PI3K/AKT, MAPK/ERK i MAPK/p38. A. Western Blot que mostra una disminució de pAKT en els cultius 3D respecte els 2D. **B.** Western Blot que mostra una disminució de pAKT, p-p70S6K, pERK amb l'adició de matrigel en dosis creixents a un cultiu 2D.

Un cop demostrat que l'absència de Matrigel dona lloc a un augment de la fosforilació AKT, vam investigar si aquest augment podia ser la causa de la resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β en cèl·lules d'endometri en monocapa 2D. Amb aquesta finalitat, es van tractar prèviament les cèl·lules en monocapa 2D amb els inhibidors químics de PI3K: LY294002 o Pictisilib i després es va estimular amb el TGF- β .

Vam realitzar immunofluorescència de la *cleaved*-caspasa3 i la quantificació va revelar que la inhibició de PI3K/AKT amb ambdós inhibidors restaurava l'apoptosi induïda pel TGF- β en monocapes 2D de cèl·lules epitelials endometrials (Fig. 5A, B).

Després d'haver demostrat que el 10% de Matrigel provoca una disminució de la fosforilació d'AKT i que la inhibició de PI3K/AKT provoca l'apoptosi induïda pel TGF- β , era fàcil especular que l'estimulació de Matrigel també causaria l'apoptosi induïda pel TGF- β . De nou a través de la immunofluorescència i quantificació de *cleaved*-caspasa3 vam observar que l'addició d'un 10% de Matrigel provocava també l'apoptosi induïda pel TGF- β (Fig. 5C).

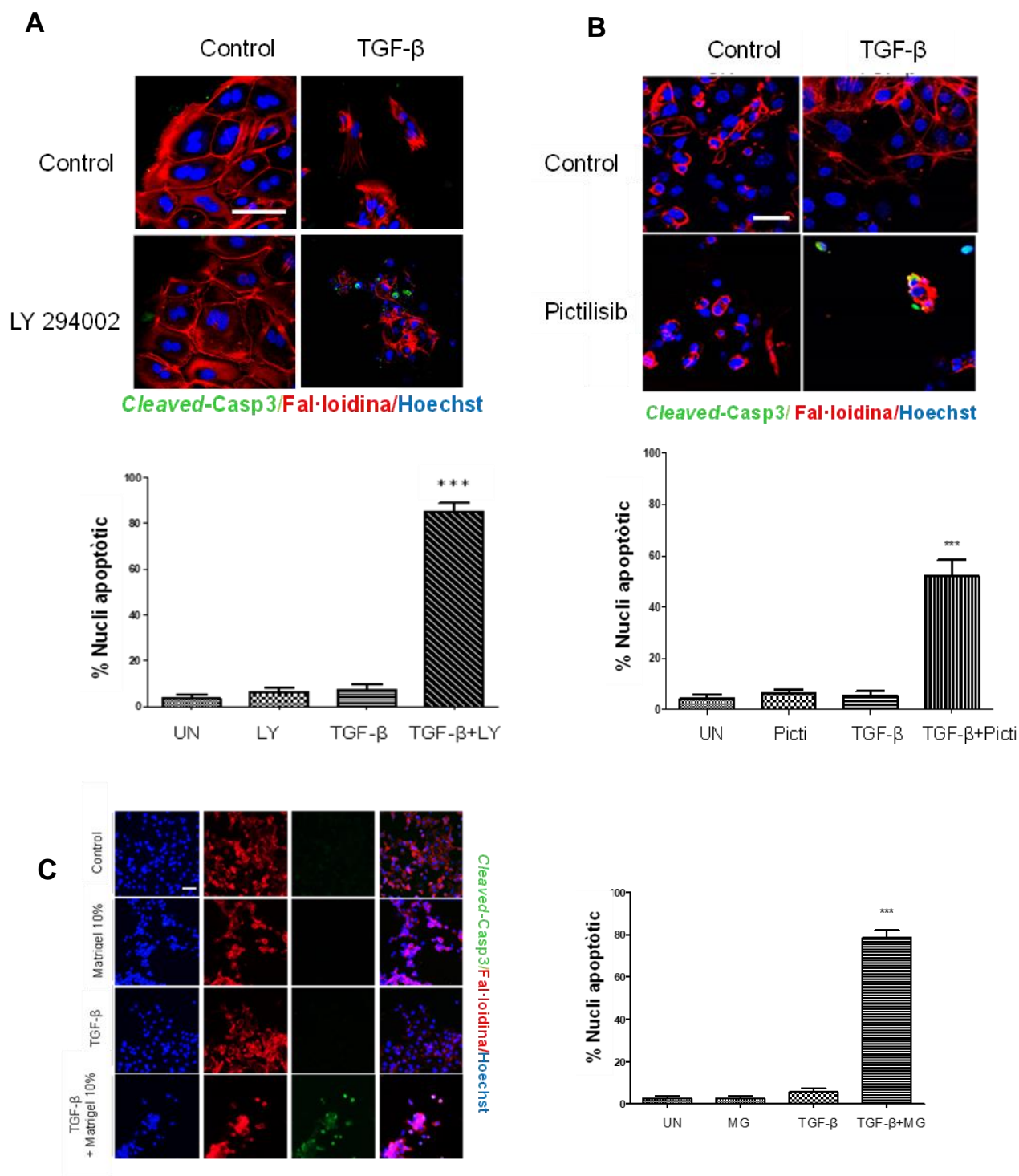


Figura 5. La inhibició de pAKT causa una restauració de la funció apoptòtica del TGF- β en cultius 2D. A, B, C. Immunofluorescència i quantificació de *cleaved-caspasa3* després del no tractament (control) i tractament amb TGF- β a 20ng/ml combinat o no amb LY294002 (LY) 10 μ M, Pictilisib (Picti) 200 nM o matrigel 10% respectivament durant 72 hores. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. *** P <0,001 per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

El TGF- β desencadena la Transició Epiteli-Mesènquima en cultius 2D de cèl·lules epitelials d'endometri no polaritzades

L'observació de contrast de fases de cèl·lules no polaritzades tractades amb el TGF- β durant 72 h va evidenciar un canvi significatiu en la morfologia cel·lular, amb transició de la morfologia típica de llambordes a la forma fusiforme mesenquimal i fusiforme (Fig. 6A). Com que el TGF- β també és un potent inductor EMT (Miettinen et al., 1994; J. Xu et al., 2009) preteníem investigar si aquests canvis produït pel TGF- β podien ser el resultat d'aquest procés.

Per abordar aquest punt, vam realitzar immunofluorescències de marcadors d'Epiteli-Mesènquima i vam observar una disminució de marcadors epitelials (Citoqueratina, E-caderina, β -Catenina) i un increment del marcador mesenquimal Vimentina després del tractament amb el TGF- β durant 72 h.

El tractament de cèl·lules endometrials 2D no polaritzades amb el TGF- β va provocar la pèrdua d'expressió dels marcadors epitelials E-caderina, β -catenina i Citoqueratina i l'adquisició del marcador d'expressió mesenquimal Vimentina (Fig. 6B), cosa que suggereix que les cèl·lules endometrials estaven sotmeses a EMT. Els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi d'immunofluorescència es van confirmar per Western blot (Fig. 6C).

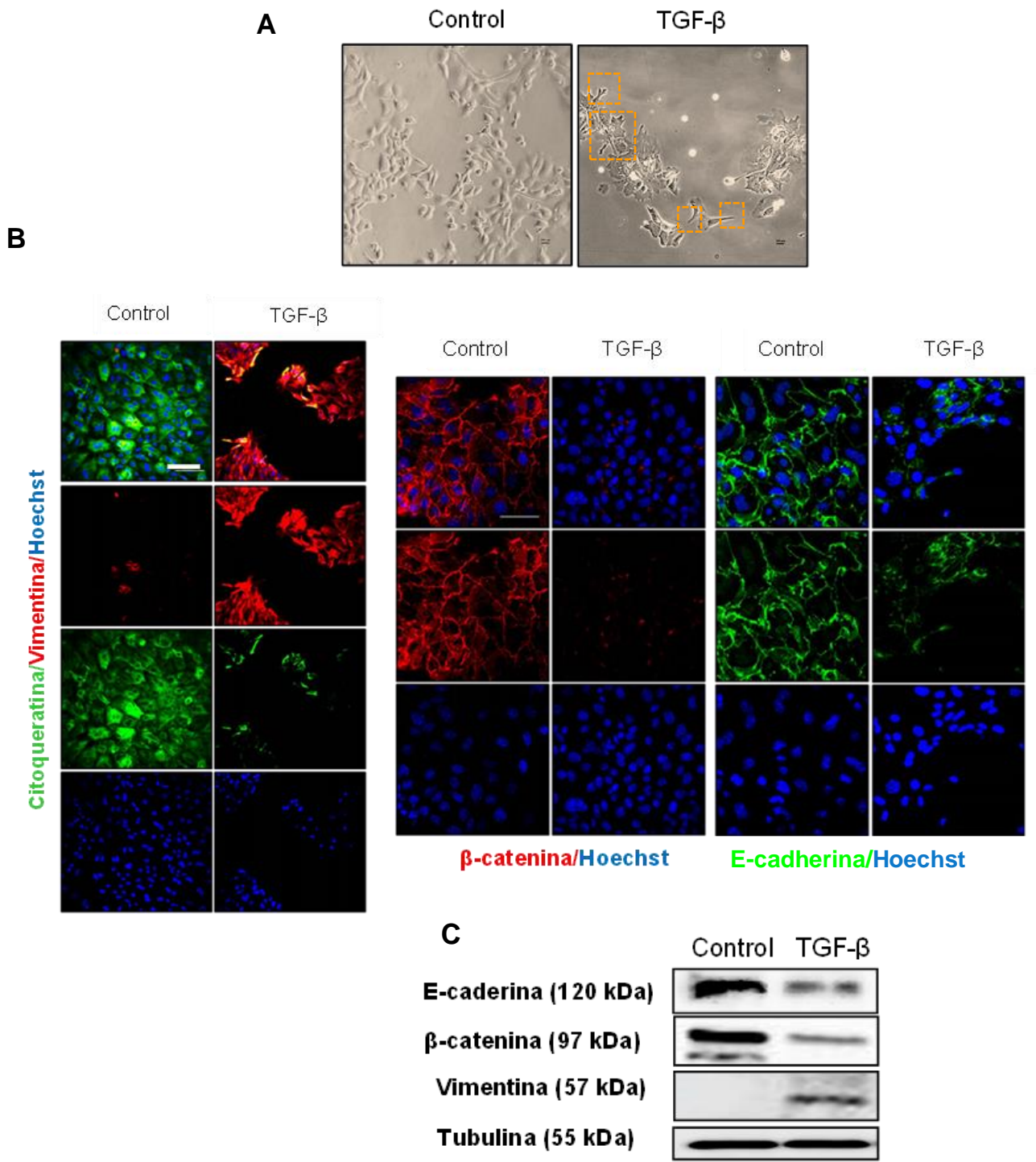


Figura 6. TGF-β desencadena l'EMT en cultius 2D. **A.** Imatges de Microscopi de contrast de fases de cultiu 2D de cèl·lules epitelials endometrials no tractat (Control) i tractat amb TGF-β 10 ng/ml durant 72 h. Els quadrats taronges assenyalen el fenotip mesenquimal. **B.** Immunofluorescència de Citoqueratina, Vimentina, β-catenina i E-cadherina sota les mateixes condicions. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM. **C.** Western Blot que mostra els canvi de marcadors del fenotip d'EMT sota les mateixes condicions.

La inhibició d'ERK inhibeix l'EMT induïda pel TGF- β en cultius 2D de cèl·lules epitelials d'endometri no polaritzades

Un cop demostrat que el tractament amb el TGF- β de cèl·lules no polaritzades induïa EMT, ens vam plantejar a través de quins mecanismes podia anar aquesta l'EMT. Fa anys que es porta descrivint que un dels mecanismes a través dels quals el TGF- β desencadena l'EMT és l'activació de la via TGF- β no canònica a través d'ERK (Hao et al., 2019; J. Xu et al., 2009)

Prèviament al nostre grup es va demostrar que ERK/MAPK és necessari per a l'EMT de línies cel·lulars de càncer d'endometri amb el transduc d'un mutant BRAF-V600E (Montserrat et al., 2012). Aquestes evidències ens van permetre investigar el paper de l'ERK en l'EMT induïda pel TGF- β . Amb aquesta informació, primer vam analitzar si el TGF- β era capaç d'estimular l'activació d'ERK en les cèl·lules epitelials endometrials en 2D. Així que vam realitzar una anàlisi Western blot de l'estimulació del curs temporal amb el TGF- β en les cèl·lules i aquest va demostrar un augment de la fosforilació d'ERK després de 30 min d'estimulació (Fig. 7A). Aquesta activació intuïem que es produïa a curt termini perquè a continuació es desencadena una cascada d'activació de factors de transcripció a nucli que produirà canvis a nivell cel·lular. Posteriorment, es van tractar les cèl·lules en monocapa 2D no polaritzades amb el TGF- β sol o amb el TGF- β més l'inhibidor de MEK U0126 i posteriorment es va analitzar l'expressió dels marcadors EMT per immunofluorescència. U0126 va inhibir la pèrdua d'expressió de Citoqueratina, E-caderina o β -catenina i l'augment del marcador mesenquimal Vimentina (Fig. 7B). A més a més, es va validar l'estat de la fosforilació d'ERK amb U0126 i TGF- β través d'una anàlisi Western Blot (Fig. 7B). Els resultats es van confirmar encara més amb dos inhibidors de MEK addicionals: PD184352 i Mirdametinib, a través d'una immunofluorescència de Citoqueratina (Fig. 7C). Aquests resultats indiquen que la inhibició de la senyalització ERK pel inhibidors químics de MEK van prevenir l'EMT induïda pel TGF- β .

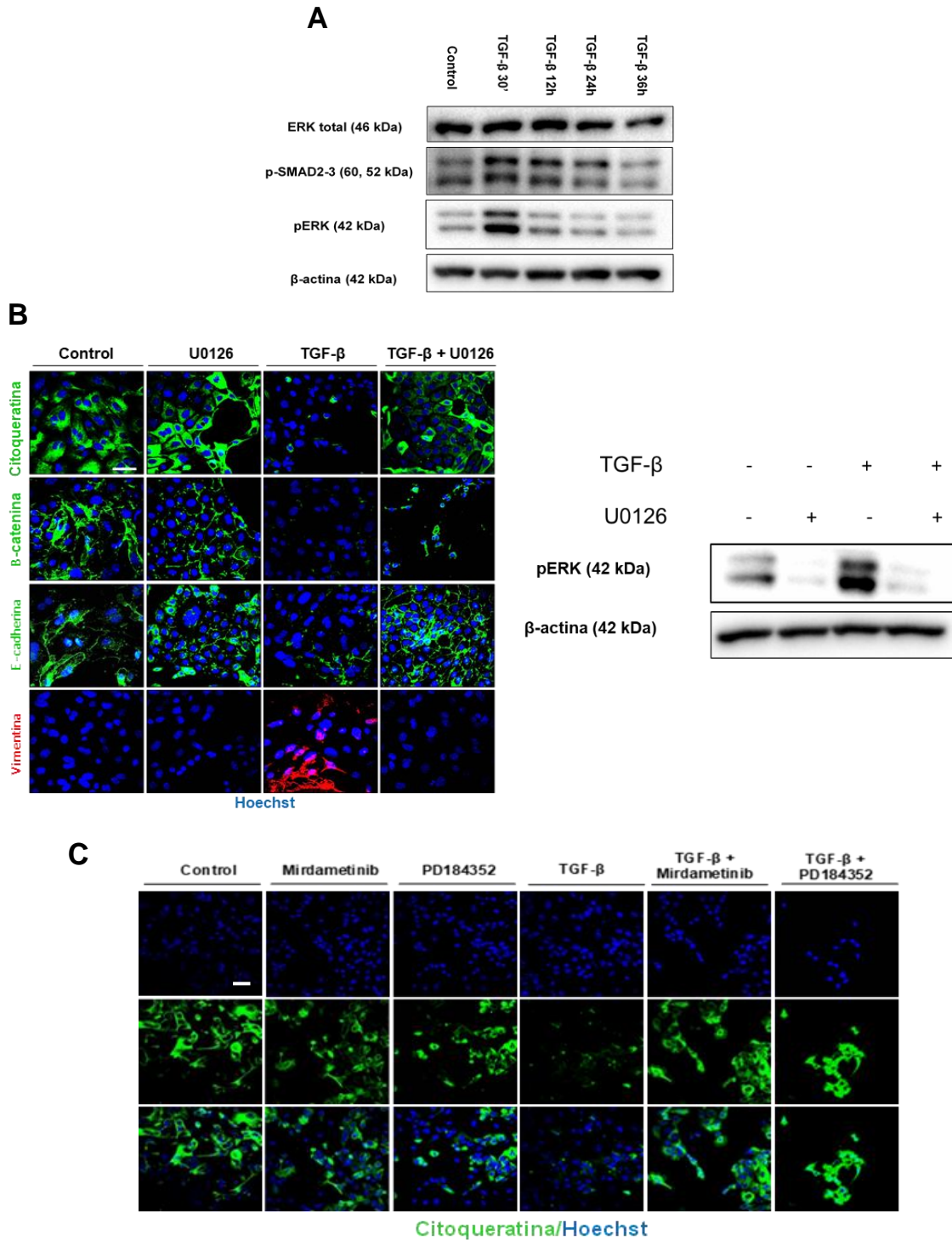


Figura 7. La inhibició de pERK bloqueja l'EMT en cultius 2D desencadenada pel TGF- β . **A.** Western Blot de cultius 2D tractats amb 10ng/ml del TGF- β a diferents temps. **B.** (Esquerra) Immunofluorescència de Citoqueratina, Vimentina, β -catenina i E-caderina dels cultius 2D no tractats (Control), tractats amb U0126 10 μ M, 10ng/ml del TGF- β o ambdós tractaments durant 72h. Escala: 100 μ M. (Dreta) Western Blot de pERK de cèl·lules en 2D amb els tractaments indicats a 30 minuts. **C.** Immunofluorescència de Citoqueratina de cultius 2D no tractats (Control), tractats amb Mirdametininib 20 nM o PD184352 0.5 μ M, 10ng/ml del TGF- β o ambdós tractaments corresponents. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M.

El Matrigel® inhibeix l'EMT induïda pel TGF-β en cultius 2D de cèl·lules epitelials d'endometri no polaritzades

Els resultats anteriors ens havien demostrat que, per una banda, la presència de Matrigel disminuïa ERK i, per l'altra, la inhibició d'ERK inhibia l'EMT induïda pel TGF-β.

Per tant, era temptador especular que l'estimulació amb Matrigel també hauria de ser capaç de bloquejar l'EMT induïda pel TGF-β. Per provar aquesta hipòtesi, es van tractar els cultius 2D no polaritzats de cèl·lules endometrials amb el TGF-β sol o amb el TGF-β més un 10% de Matrigel com a estímul (que provoca la inhibició completa de la fosforilació ERK). Vam observar l'expressió de E-caderina i la Vimentina per immunofluorescència (Fig. 8).

Efectivament, vam corroborar que l'estimulació de Matrigel va provocar un bloqueig de la disminució d'E-caderina i augment de Vimentina, canvis característics de l'EMT causa pel TGF-β.

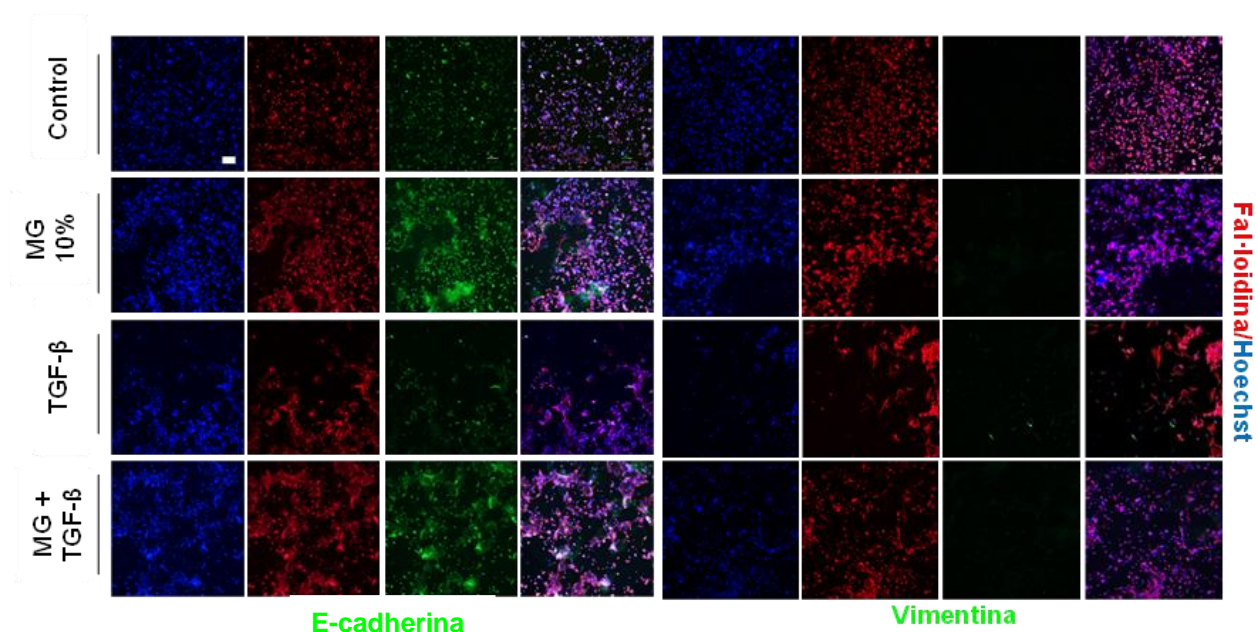
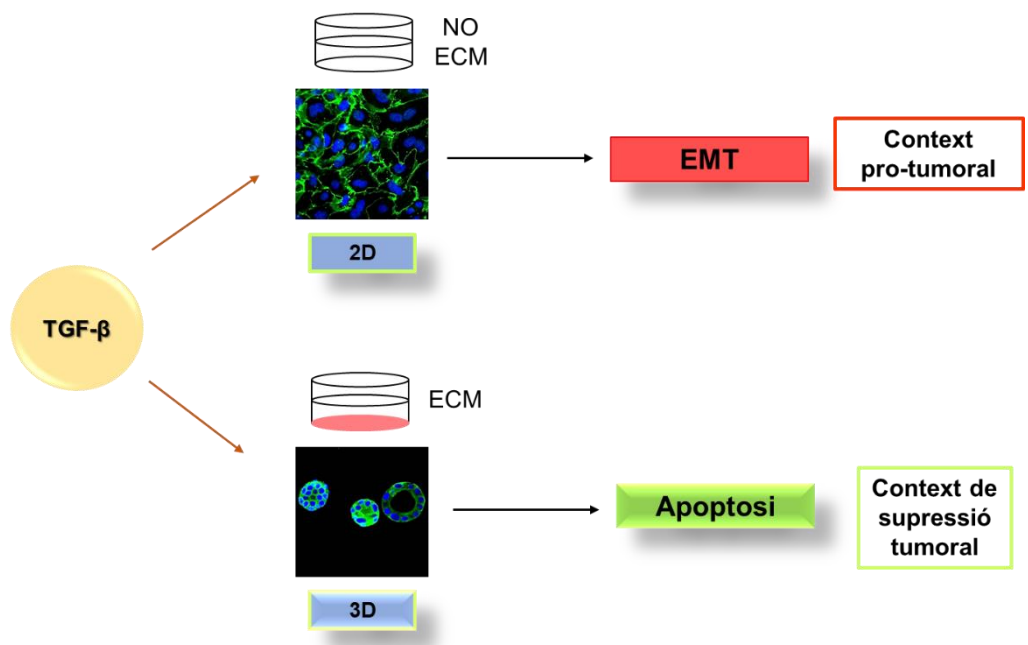


Figura 8. El Matrigel® bloqueja l'EMT en cultius 2D desencadenada pel TGF-β. Immunofluorescència d'E-caderina i Vimentina de cultius 2D no tractats (Control), tractats amb Matrigel® al 10% (MG), 10ng/ml del TGF-β o ambdós tractaments corresponents durant 72h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM.

Resum gràfic del bloc 1.1:



Esquema 8: Resum de la implicació de la polaritat cel·lular en relació a les respostes del TGF-β en cèl·lules epitelials endometrials de ratolí. Quan les cèl·lules es cultiven en bidimensionalitat (2D), és a dir, en absència d'ECM, el TGF-β desencadena una Transició Epiteli-Mesènquima (EMT). Quan les cèl·lules es cultiven en condicions de tridimensionalitat (3D) formant organoides, és a dir, en presència d'ECM, TGF-β indueix l'apoptosi cel·lular.

1.2. Estudi dels mecanismes moleculars i les vies de senyalització regulades per la polaritat cel·lular

La deficiència de *Smad2/3* desencadena una EMT parcial independentment de l'estimulació pel TGF- β

Les SMAD tenen un paper important com a transductors de respostes cel·lulars després de l'engranatge del receptor TGF- β (Aashaq et al., 2022).

Per tal abordar el paper d'aquests factors de transcripció en l'EMT desencadenada pel TGF- β , vam aïllar cèl·lules epitelials endometrials de ratolins Cre:ER^{+/+} SMAD2^{F/F}SMAD3^{F/F} induïbles per Tamoxifè. Es van plantar les cèl·lules en presència o no de Tamoxifè per induir l'ablació de *Smad2/3* i 24 hores després es van tractar les cèl·lules amb el TGF- β . A partir d'ara les cèl·lules no tractades amb Tamoxifè les anomenarem *wt* (*wild type*) i les tractades **SMAD2/3 KO**.

De manera inesperada, els cultius endometrials 2D SMAD2/3 KO van mostrar un augment espectacular de l'expressió de Vimentina en absència del TGF- β , tot conservant l'expressió de marcadors epitelials com la citoqueratina β -catenina i E-caderina (Fig. 9A, B). Aquests resultats suggerien que, en absència de matriu extracel·lular, es requeria l'expressió *Smad2/3* per mantenir un fenotip epitelial complet, i la seva pèrdua provocava una EMT parcial de manera independent als estímuls de TGF- β . L'augment de l'expressió de Vimentina es va validar encara més mitjançant Western Blot (Fig. 9C). Vam observar que a més l'augment dels nivells de proteïna de Vimentina de cèl·lules SMAD2/3 KO ser similar als observats en cèl·lules *wt* tractades amb el TGF- β .

Per confirmar encara més aquest procés, vam analitzar l'expressió d'altres marcadors mesenquimàtics mitjançant RT-qPCR. Les cèl·lules deficientes de *Smad2/3* van mostrar un augment en l'expressió de *Cdh2* (N-caderina) i *Twist1* (Fig. 9D), un dels factors de transcripció implicats en l'EMT.

Posteriorment, es va analitzar l'efecte de la deficiència de *Smad2/3* sobre l'EMT induïda pel TGF- β . Per això, es van tractar les cèl·lules epitelials endometrials *wt* o SMAD2/3 KO amb el TGF- β 10 ng/ml durant 72 hores i es va avaluar l'expressió de Vimentina i els marcadors epitelials β -catenina, Citoqueratina i E-caderina mitjançant immunofluorescència (Fig. 10A, B). El que es va veure és que, en oposició a les cèl·lules que expressen *Smad2/3*, les cèl·lules SMAD2/3 KO no van mostrar una reducció significativa dels marcadors epitelials Citoqueratina, β -catenina, i E-caderina. Aquest resultat suggereix que, en absència de matriu extracel·lular, la deficiència de *Smad2/3* bloqueja la regulació a la baixa dels marcadors de cèl·lules epitelials relacionats amb els canvis d'EMT provocats pel TGF- β .

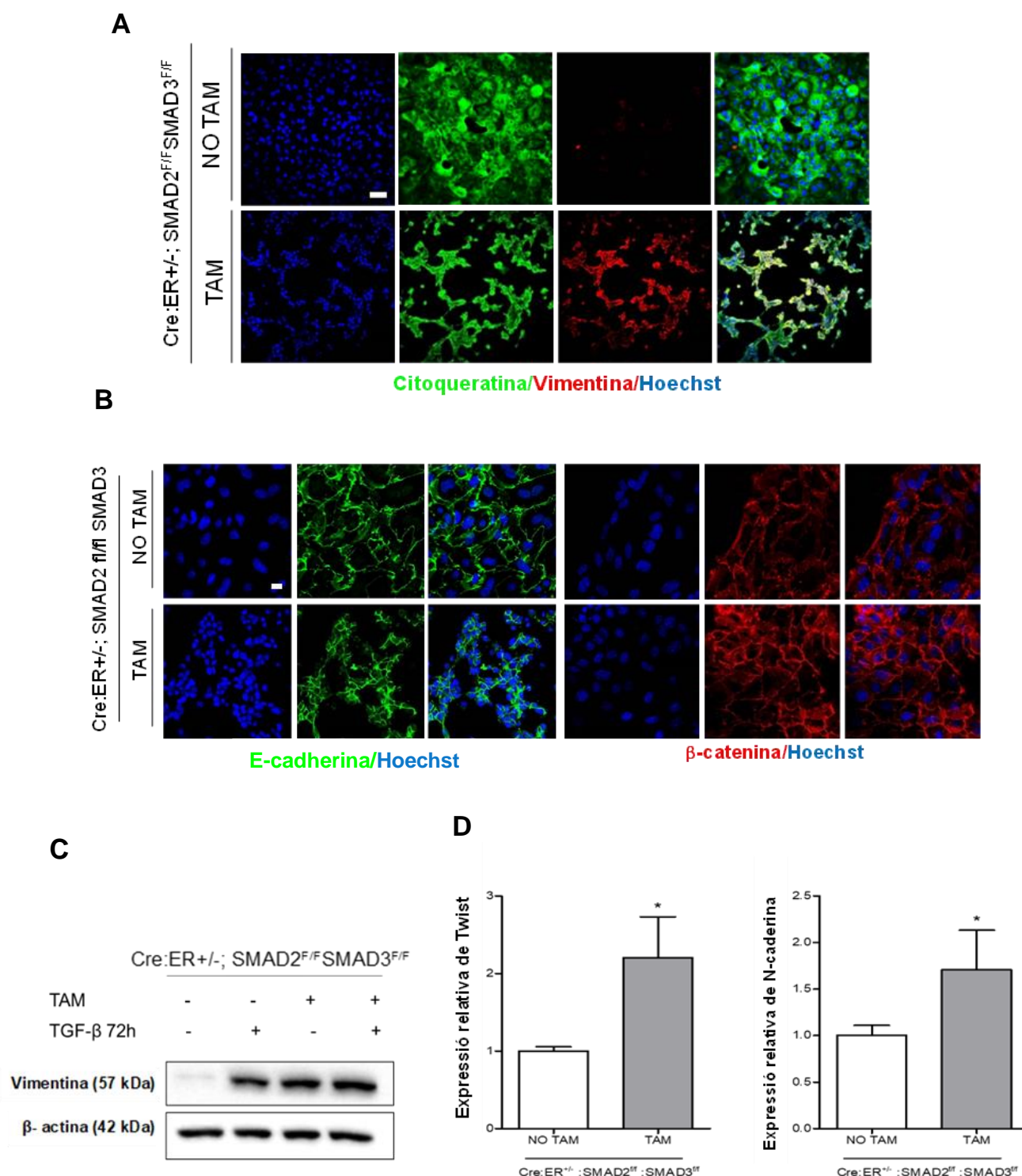


Figura 9. Les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí amb pèrdua de SMAD2/3 expressen més marcadors mesenquimals però no canvis en marcadors epitelials respecte les cèl·lules epitelials endometrials *wt*. **A.** Immunofluorescència de Citoqueratina i Vimentina de cultius de cèl·lules epitelials d'endometri CRE^{+/+}-SMAD2^{F/F}SMAD3^{F/F} després del tractament amb Tamoxifè (TAM) o no (NO TAM). Escala: 100 µm. **B.** Immunofluorescència d'E-caderina i β-catenina sota les mateixes condicions. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 25 µm. **C.** Western Blot de Vimentina de cultius de cèl·lules epitelials d'endometri sense o amb TAM no tractats (Control) o tractats amb 10ng/ml del TGF-β durant 72h. **D.** RT-PCR de Twist i N-caderina de les mateixes condicions. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. **P*<0,05 per *student's t* test.

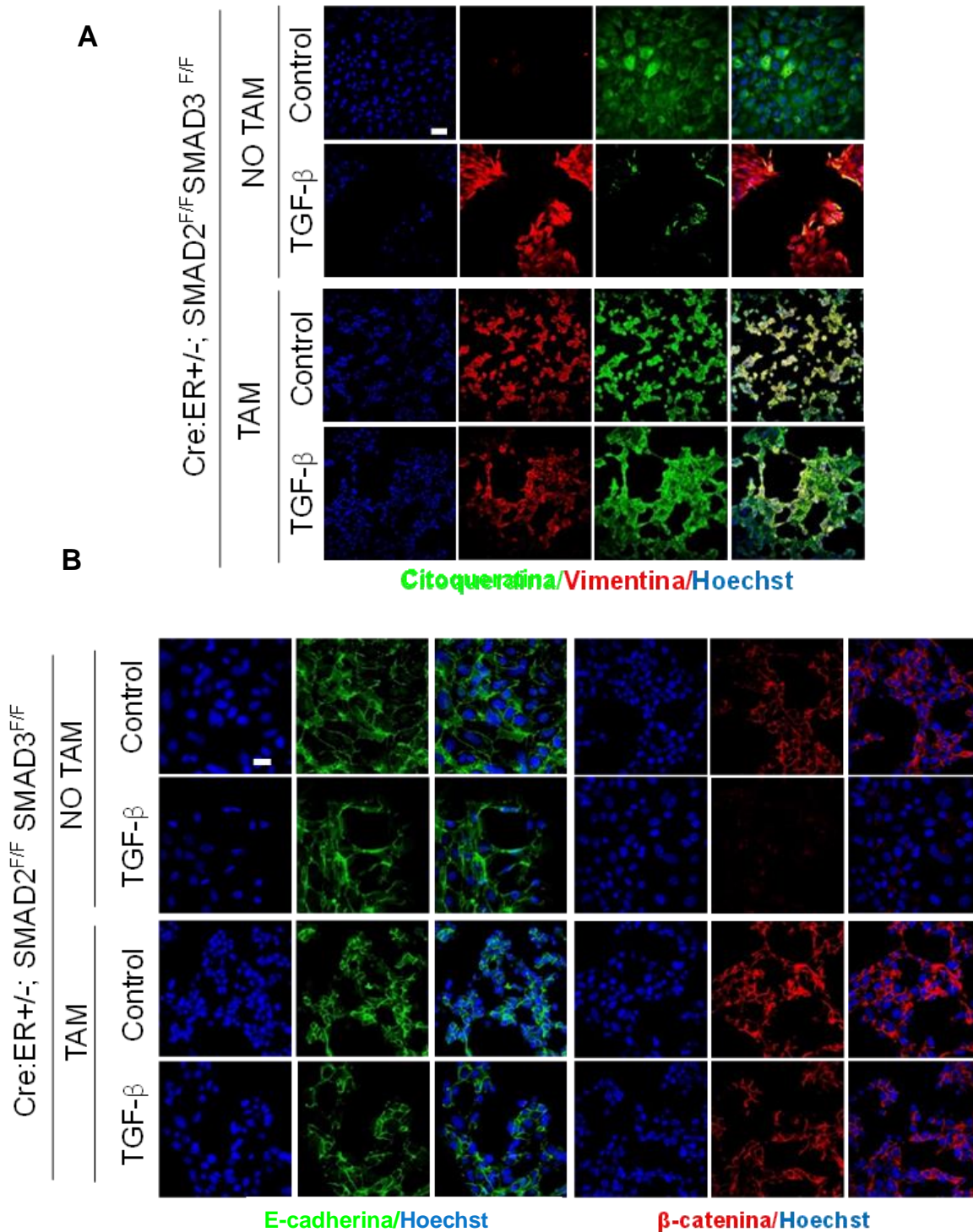


Figura 10. Les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí amb pèrdua de SMAD2/3 són resistents al fenotip migratori induït pel TGF-β. **A.** Immunofluorescència de Citoqueratina i Vimentina de cultius de cèl·lules epitelials d'endometri sense o amb TAM no tractats (Control) o tractats amb 10ng/ml del TGF-β durant 72h. Escala: 100 μM. **B.** Immunofluorescència d'E-caderina i β-catenina sota les mateixes condicions. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 25 μM.

La deficiència de *Smad2/3* bloqueja l'adquisició del fenotip migratori induït pel TGF- β

Un cop analitzats els efectes de la deficiència de *Smad2/3* sobre l'expressió dels marcadors de d'EMT induïts pel TGF- β , vam investigar si aquesta EMT es podia correlacionar amb una capacitat migratòria de les cèl·lules amb deficiència de *Smad2/3*. Per abordar aquest punt, les cèl·lules epitelials endometrials de Cre:ER+/-; SMAD2^{F/F}; SMAD3^{F/F} es van plantar en presència de Tamoxifè per induir l'ablació de *Smad2/3* i 24 hores després es van tractar amb el TGF- β . Després del tractament amb el TGF- β , la morfologia del citoesquelet d'actina es va estudiar amb la tinció de Fal·loidina i la fosforilació de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) per immunofluorescència. La tinció de Fal·loidina va revelar que el TGF- β en cèl·lules *wt* induïa la formació de fibres d'estrès, indicatiu del fenotip migratori. A més a més el TGF- β va canviar la tinció difusa de fosfo-FAK dispersa a un patró de tinció puntual que es co-localitzava amb els marges de les fibres d'estrès extenses. Aquests patrons de tinció suggereixen que el TGF- β desencadena la migració i la formació de noves adhesions focals de cèl·lules epitelials endometrials. (Fig. 11A). En canvi, el tractament amb el TGF- β de cèl·lules endometrials SMAD2/3 KO no va canviar el patró d'expressió de la Fal·loidina o la tinció de fosfo-FAK, cosa que indica que la supressió de *Smad2/3* perjudica la migració induïda pel TGF- β . (Fig. 11A).

Per demostrar encara més l'augment de la capacitat migratòria de les cèl·lules deficientes en *Smad2/3*, vam realitzar un assaig de migració *transwell*. Les cèl·lules deficientes en *Smad2/3* van mostrar una capacitat migratòria augmentada fins i tot en absència del TGF- β . (Fig. 11B).

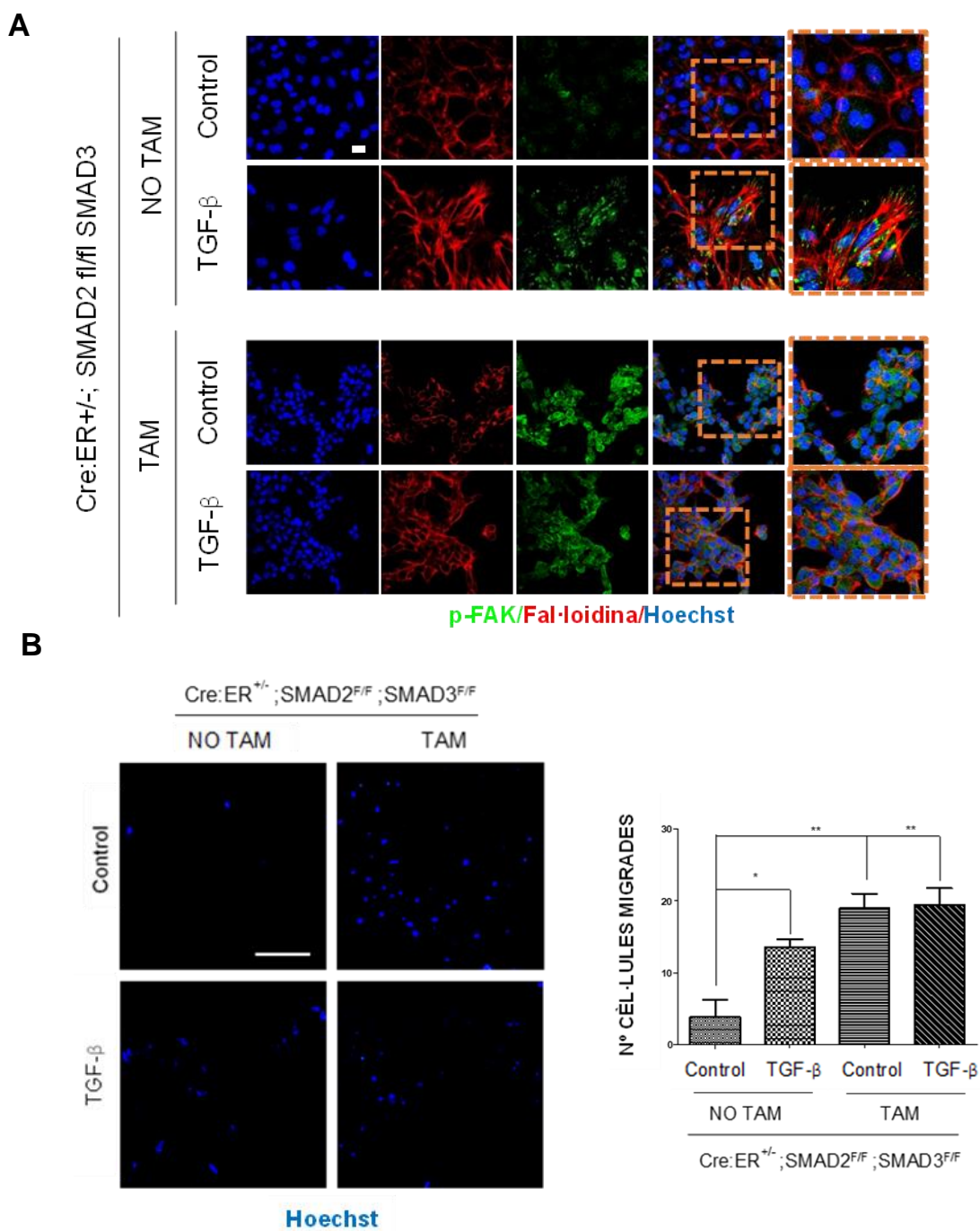


Figura 11. Les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí SMAD2/3 KO són resistents al fenotip migratori induït pel TGF-β. **A.** Immunofluorescència de p-FAK de cèl·lules epitelials d'endometri sense o amb TAM no tractades (Control) o tractades amb 10ng/ml del TGF-β durant 72h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 25 μM. **B.** Imatges de *transwell* i quantificació que mostren migració de cèl·lules sota les mateixes condicions. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ per *one-way ANOVA*, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

El Matrigel® bloqueja l'increment de l'expressió de Vimentina induïda per la deficiència de *Smad2/3*

A continuació, vam voler investigar si l'EMT parcial observada a les cèl·lules endometrials en 2D sense *Smad2/3* podia ser causada per l'absència de senyals de matriu extracel·lular.

Vam decidir doncs cultivar les cèl·lules en condicions 3D i realitzar anàlisis d'immunofluorescència de marcadors epitelials i de Vimentina com a marcador mesenquimal. Els organoides tridimensionals van mostrar una tinció positiva per als marcadors epitelials Citoqueratina, β -catenina i absència d'expressió de Vimentina. Com que les mateixes cèl·lules cultivades en 2D sí que expressaven Vimentina, aquests resultats ens suggerien que els senyals de matriu extracel·lular proporcionats per Matrigel podien estar inhibint l'expressió de Vimentina (Fig. 12A).

Per demostrar encara més que les senyals de matriu extracel·lular són necessàries per preservar el fenotip epitelial complet en absència de *Smad2/3*, les cèl·lules endometrials deficients en *Smad2/3* cultivades en 2D es van estimular de manera aguda amb Matrigel al 5% diluït en medi de cultiu durant 1 hora i es va avaluar l'expressió de Vimentina per immunofluorescència i RT-qPCR.

El que vam veure és que l'estimulació de Matrigel provocava una reducció marcada de la immunotinció de Vimentina, així com la seva l'expressió de mRNA (Fig. 12B).

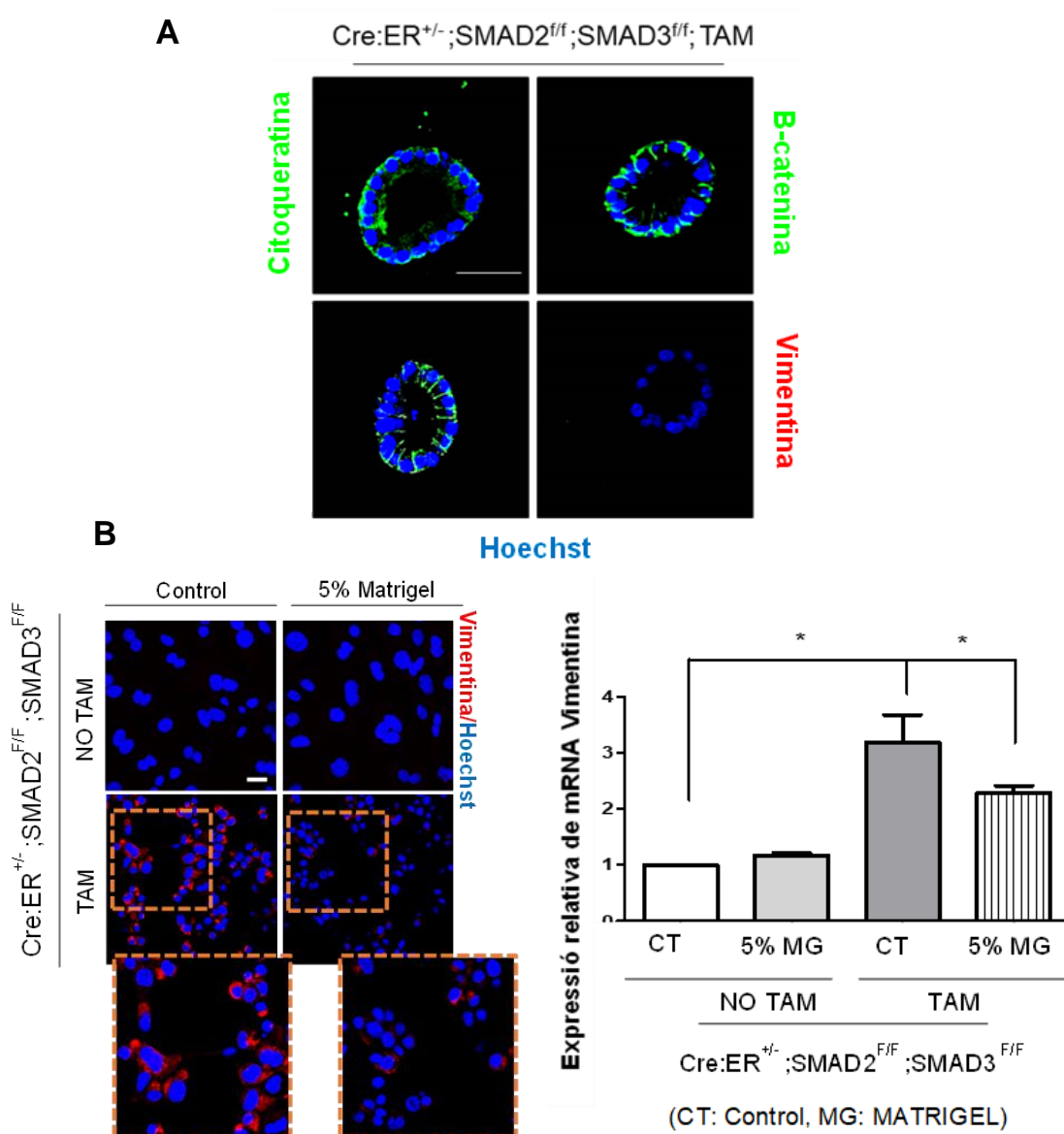


Figura 12. La matriu extracel·lular redueix l'expressió de Vimentina en cèl·lules epitelials endometrials amb pèrdua de *Smad2/3*. **A.** Immunofluorescència d'E-caderina, Citoqueratina, β -catenina i Vimentina de cèl·lules epitelials d'endometri CRE^{+/-}SMAD2^{F/F}SMAD3^{F/F} amb TAM en 3D. Escala: 100 μ M. **B.** Immunofluorescència i quantificació de Vimentina de cel·lules del mateix genotip sense o amb TAM després d'estimulació amb 5% de Matrigel®. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 25 μ M. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * P <0,05, per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

L'activació d'ERK és necessària per a l'expressió de Vimentina induïda per la deficiència de *Smad2/3*

Fins aquest punt havíem demostrat que per una banda, els canvis que cursen amb un procés d'EMT d'induïts pel TGF- β en cèl·lules epitelials d'endometri requereixen de l'activació d'ERK.

Per altra banda, el paper de SMAD2/3 és interessant perquè la seva pèrdua dona lloc a l'adquisició de l'expressió de Vimentina en cèl·lules no estimulades, però paradoxalment inhibeix la regulació a la baixa de marcadors epitelials induïda pel TGF- β , impedit l'adquisició d'un fenotip més migratori. Per tal de matissar i tancar el cercle d'aquests resultats, la següent pregunta que vam abordar va ser si l'expressió de Vimentina a les cèl·lules endometrials amb deficiència de *Smad2/3* també depenia de l'activació d'ERK.

Amb aquest propòsit, es van cultivar les cèl·lules epitelials endometrials SMAD2/3 KO i es van tractar amb l'inhibidor de MEK U0126 durant 72 hores. Posteriorment es va analitzar l'expressió dels marcadors EMT per immunofluorescència. El que vam obtenir és que el tractament amb U0126 va provocar una pèrdua completament de l'expressió de Vimentina sense afectar l'expressió de Citoqueratina de les cèl·lules endometrials deficientes per SMAD2/3 (Fig. 13). Aquest resultat semblava indicar que l'activació d'ERK també és necessària per augmentar la Vimentina en un context de pèrdua de *Smad2/3*.

Després d'haver demostrat que tant la presència de l'activitat ERK induïda pel TGF- β com la manca de *Smad2/3* augmenta l'expressió de Vimentina, vam fer la hipòtesi que la pèrdua de *Smad2/3* podria provocar i augmentar la fosforilació basal d'ERK. Per tal d'abordar aquest punt, vam realitzar Western Blot en lisats de dos cultius independents de ratolins Cre:ER^{+/+} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F} en què es va induir la supressió de SMAD2 i SMAD3 mitjançant l'addició de Tamoxifè. Els resultats van demostrar que la pèrdua d'expressió SMAD2/3 condueix a un augment dels nivells d'activitat ERK (Fig. 14).

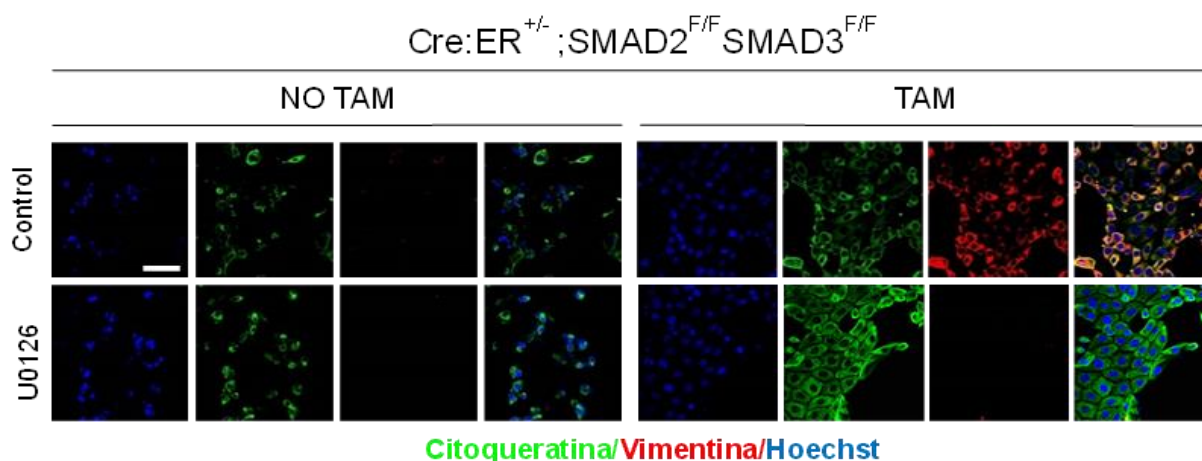


Figura 13. La inhibició d'ERK correlaciona amb una inhibició de l'expressió de Vimentina induïda per SMAD2/3. Immunofluorescència de Citoqueratina i Vimentina de cèl·lules epitelials d'endometri CRE^{+/-} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F} sense i amb TAM després del no tractament (Control) o tractament durant 72 h de U0126 10 µM. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 µM.

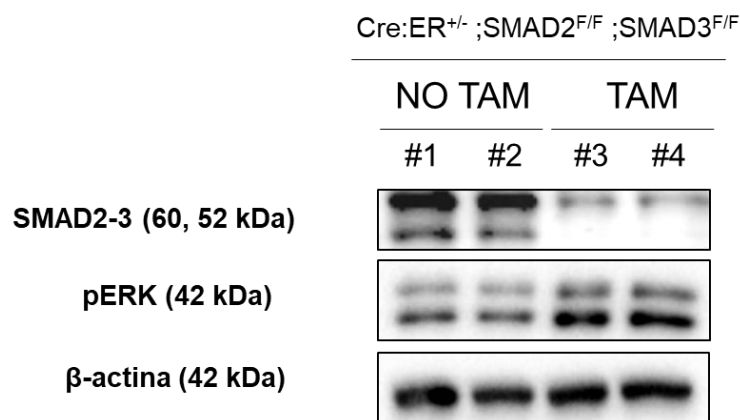
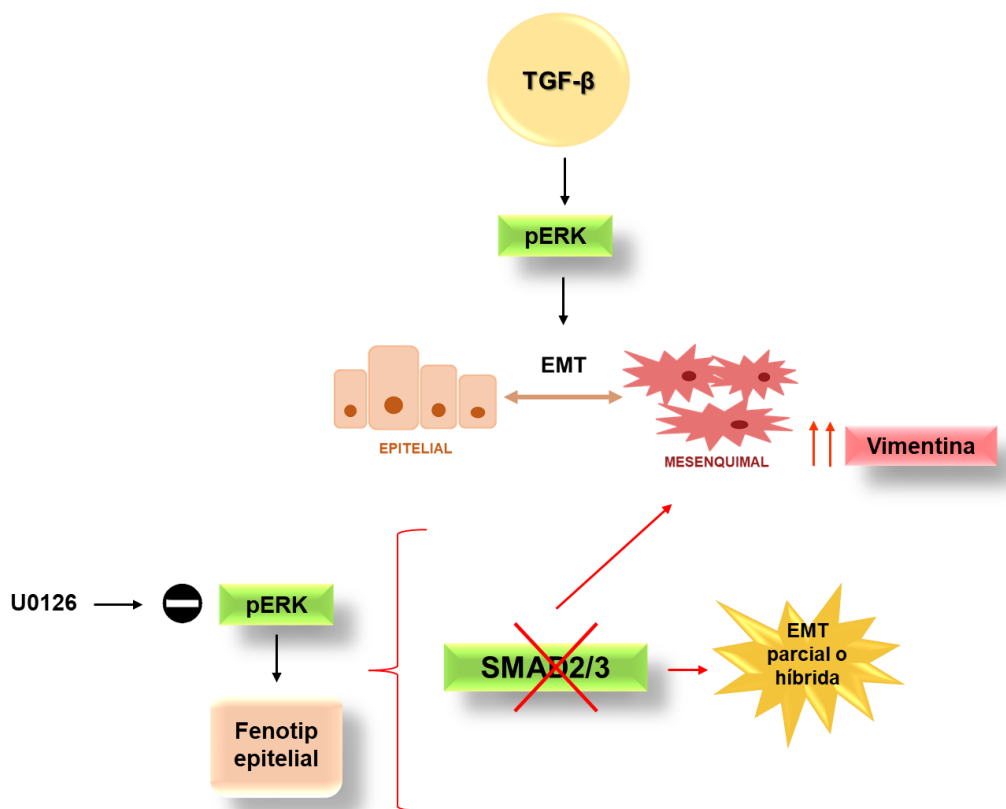


Figura 14. La inhibició de SMAD2/3 produeix un augment de l'expressió proteïca de pERK. Western Blot de 4 ratolins CRE^{+/-} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F} sense i amb TAM per veure com l'expressió de pERK es correlaciona amb una pèrdua de SMAD2/3.

Resum gràfic del bloc 1.2:



Esquema 9: Resum de la hipòtesi de les vies de senyalització de les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí en 2D en relació a TGF- β , SMAD2/3 i el fenotip d'EMT. TGF- β desencadena l'EMT a través d'ERK. La deficiència de *Smad2/3* activa l'expressió de Vimentina i dona lloc a un fenotip d'EMT parcial o híbrida en la cèl·lula. Per altra banda, la inhibició farmacològica de pERK restaura el fenotip epitelial en les cèl·lules deficientes en *Smad2/3*, posant de manifest el paper clau de pERK en l'adquisició d'un fenotip mesenquimal.

BLOC 2

2. ESTUDI DELS EFECTES DEL FÀRMAC METFORMINA EN PROCESSOS TUMORALS

La Metformina és un antidiabètic oral àmpliament utilitzat a nivell mundial contra la Diabetis Mellitus II, una patologia en què es produeix insulina però no sol ser suficient o la que es produeix resulta resistent a l'absorció o efecte en el teixit pancreàtic.

Amb la documentació de des fa un parell de dècades fins a dia d'avui, nombrosos estudis retrospectius han demostrat una associació entre l'ús de Metformina en pacients doblement diagnosticades de càncer d'endometri i diabetis mellitus II, i l'augment de l'OS (Chu et al., 2018; Feng & Qin, 2021; Lemon et al., 2022; Mu et al., 2020; Nevadunsky et al., 2014; Seebacher et al., 2016). S'ha documentat també la relació entre l'ús de Metformina i el menor risc de patir un càncer d'endometri (Tang et al., 2017).

A nivell molecular, també s'ha documentat que la Metformina podria tenir efectes antitumorals i antiproliferatius contra diferents càncers, entre ells el càncer d'endometri, a través de diversos mecanismes d'acció (M. Guo et al., 2019; Mu et al., 2020; Qiang et al., 2019; Xue et al., 2019; Y. Zhao et al., 2018; J. Zou et al., 2016).

2.1. Estudi *in vitro* de la Metformina en cèl·lules d'endometri i tiroide, la seva implicació en la resposta del TGF- β i els seus mecanismes moleculars de supressió tumoral

2.1.1. En cèl·lules d'endometri

El tractament amb Metformina redueix la proliferació de les línies cel·lulars humanes d'endometri ARK-1, HEC-1A, Ishikawa i MFE-293

Amb tots aquests antecedents de la Metformina, vam decidir caracteritzar els seus possibles efectes tumorals, primerament *in vitro*, i en diferents cultius cel·lulars.

Així que per tal d'avaluar des del nivell més bàsic els efectes potencials contra el càncer d'endometri, vam voler començar a testar la Metformina amb línies cel·lulars humanes d'endometri a nivell antiproliferatiu i modulador de vies de senyalització relacionades amb processos proliferatius.

Per aquest objectiu, vam utilitzar 5 línies cel·lulars humanes d'endometri:

ARK-1 i ARK-2 (derivades de CENE) i **HEC-1A, Ishikawa i MFE-296** (derivades de CEE).

Primerament vam realitzar assajos preliminars de MTT per tal d'avaluar l'activitat metabòlica cel·lular com a indicador de viabilitat cel·lular. Per això, es van plantar les 5 línies cel·lulars en 2D en plaques de m96 i es van deixar durant una nit. Al dia següent es van tractar amb Metformina 20 nM durant 48h i es van realitzar els assajos de MTT (Fig. 15A).

Per validar aquesta informació vam complementar els resultats amb assajos d'incorporació de BrdU, que consisteixen en la incorporació d'un nucleòtid sintètic anàleg de la timidina les noves cadenes d'ADN que es repliquen per tal d'avaluar les cèl·lules que estan en proliferació.

El que vam observar és que a través d'ambdós tipus d'assajos hi havia una reducció de la proliferació cel·lular en totes les línies cel·lulars menys ARK-2 després del tractament amb Metformina (Fig. 15B).

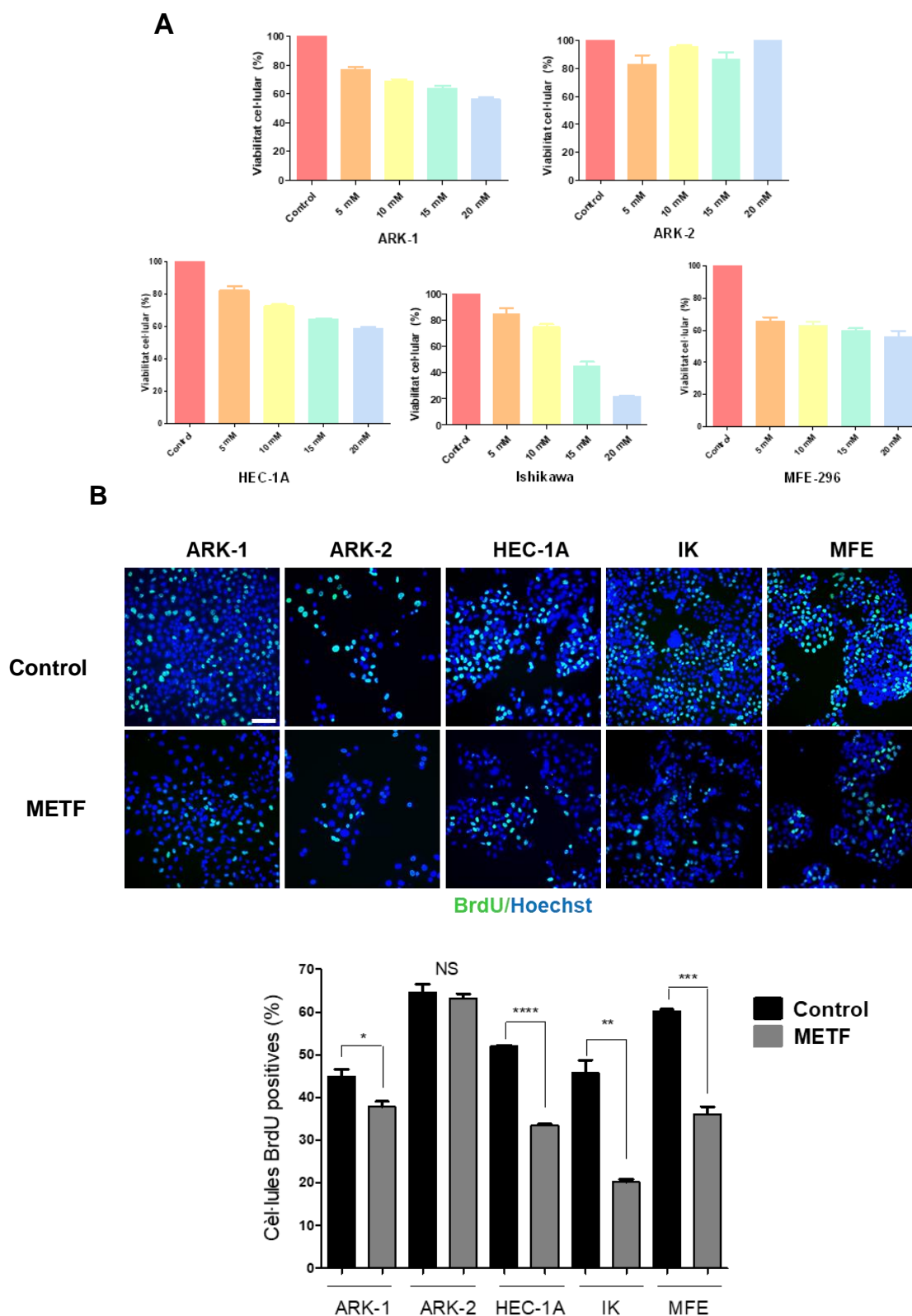


Figura 15. El tractament amb Metformina redueix la proliferació de les línies cel·lulars humanes d'endometri ARK-1, HEC-1A, Ishikawa i MFE-293. A. MTT de línies humanes cel·lulars d'endometri sense tractament (Control) i després del tractament amb Metformina a diferents concentracions durant 48h. **B.** Immunofluorescència i quantificació de BrdU durant 6h de tractament amb Metformina 20 mM. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads i MAPK/ERK en les línies cel·lulars humanes d'endometri ARK-1, ARK-2, HEC-1A, Ishikawa i MFE

Per tal d'analitzar quines vies podien estar implicades en els mecanismes d'acció de la Metformina, vam realitzar assajos de Western Blots amb mostres de les 5 línies sense tractar i amb el tractament de Metformina a curt termini (3 hores). També vam voler avaluar la Ciclina D1 com a marcador de proliferació cel·lular.

El que vam observar va ser una reducció de les vies TGF-β/Smads i MAPK/ERK en totes les línies cel·lulars i en l'expressió de la Ciclina D1, inclús en la línia ARK-2, tot i que aquesta mostrava una reducció de la Ciclina D1 menys marcada, correlacionada amb la no sensibilitat a la Metformina quant a disminució de la proliferació (Fig. 16).

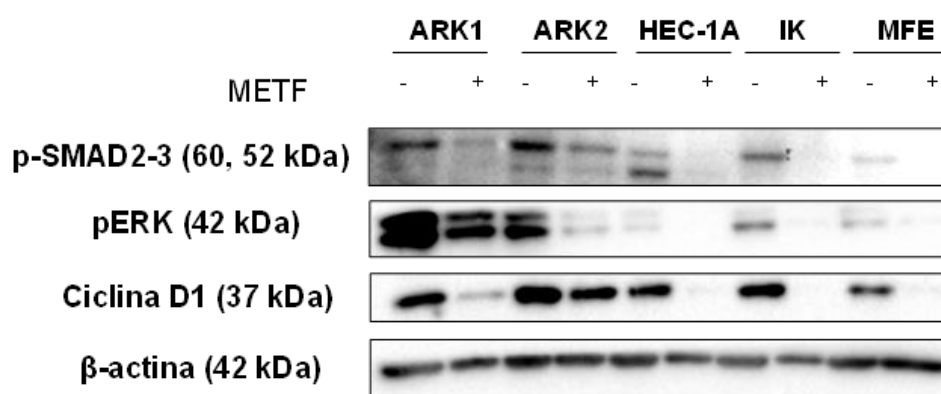


Figura 16. La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads i MAPK/ERK i baixa la Ciclina D1 en totes les línies cel·lulars humanes d'endometri estudiades. Western Blot de les línies humanes endometrials sense tractament (-) i després del tractament amb Metformina 20 nM durant 3 h (+) que mostra l'estat de les vies.

El tractament amb Metformina redueix la proliferació de les cèl·lules epitelials endometrials wt en condicions 2D

En aquest punt en vam plantejar testar la Metformina en **cèl·lules epitelials endometrials de ratolí**. Primerament vam fer un assaig de BrdU en cèl·lules epitelials endometrials wt en condicions 2D i vam observar una disminució de la proliferació degut al tractament amb Metformina (Fig. 17).

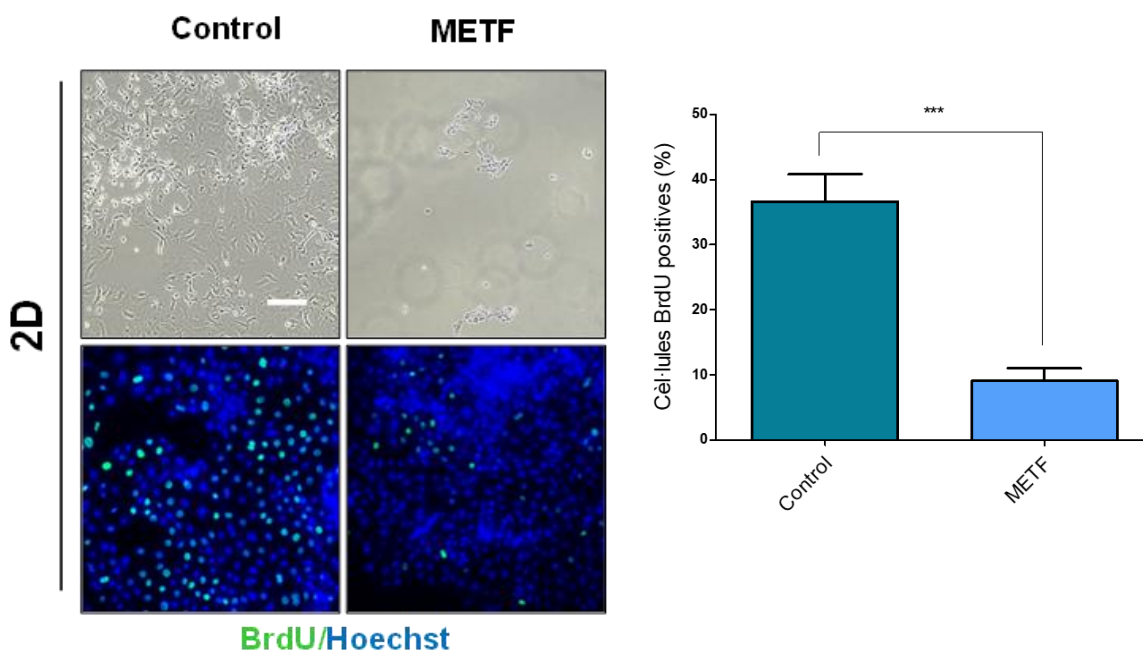


Figura 17. El tractament amb Metformina redueix la proliferació de les cèl·lules epitelials endometals *wt* en 2D. Imatges de microscopi de contrast de fases, immunofluorescència de BrdU i quantificació d'aquesta, de cèl·lules epitelials d'endometri *wt* sense tractament (Control) i després del tractament amb Metformina durant 48h i 6 hores respectivament sota condicions 2D. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 µM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *student's t* test.

La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads, MAPK/ERK i PI3K/AKT en les cèl·lules epitelials d'endometri *wt* en 2D

Novament, vam voler analitzar les vies involucrades en el tractament amb Metformina i vam veure un augment de p-AMPKα -que és la principal diana descrita en els mecanismes d'acció de la Metformina- i una regulació a la baixa de TGF-β/Smads, MAPK/ERK i PI3K/AKT (Fig. 18).

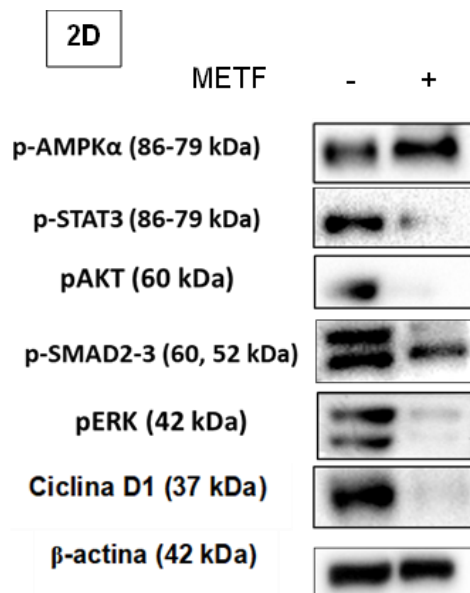


Figura 18. La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads, PI3K/AKT i MAPK/ERK en cèl·lules epitelials endometrials wt 2D. Western Blot de les cèl·lules epitelials endometrials sense tractament (-) i després del tractament (+) amb Metformina 20 nM durant 3h sota condicions 2D que mostra l'estat de les vies.

La Metformina inhibeix l'EMT desencadenada pel TGF-β en cultius epitelials endometrials wt

Per tal de seguir matisant la implicació de la Metformina en els efectes del TGF-β, vam estudiar-la en aquestes cèl·lules epitelials endometrials wt. Com ja hem descrit prèviament, el TGF-β desencadena una EMT en cèl·lules epitelials d'endometri no polaritzades. Vam voler comprovar si la Metformina podia inhibir aquest efecte.

Així que vam estudiar aquesta EMT amb la tècnica d'immunofluorescència i vam analitzar els marcadors epitelials Citoqueratina, β-catenina i E-caderina i el marcador mesenquimal Vimentina. A través d'imatges de contrast de fases i d'immunofluorescència, vam observar que, mentre que el TGF-β desencadena una disminució dels tres marcadors epitelials (E-caderina, Citoqueratina, i β-Catenina) i un augment de Vimentina, tot això és revertit per la Metformina (Fig. 19A, B).

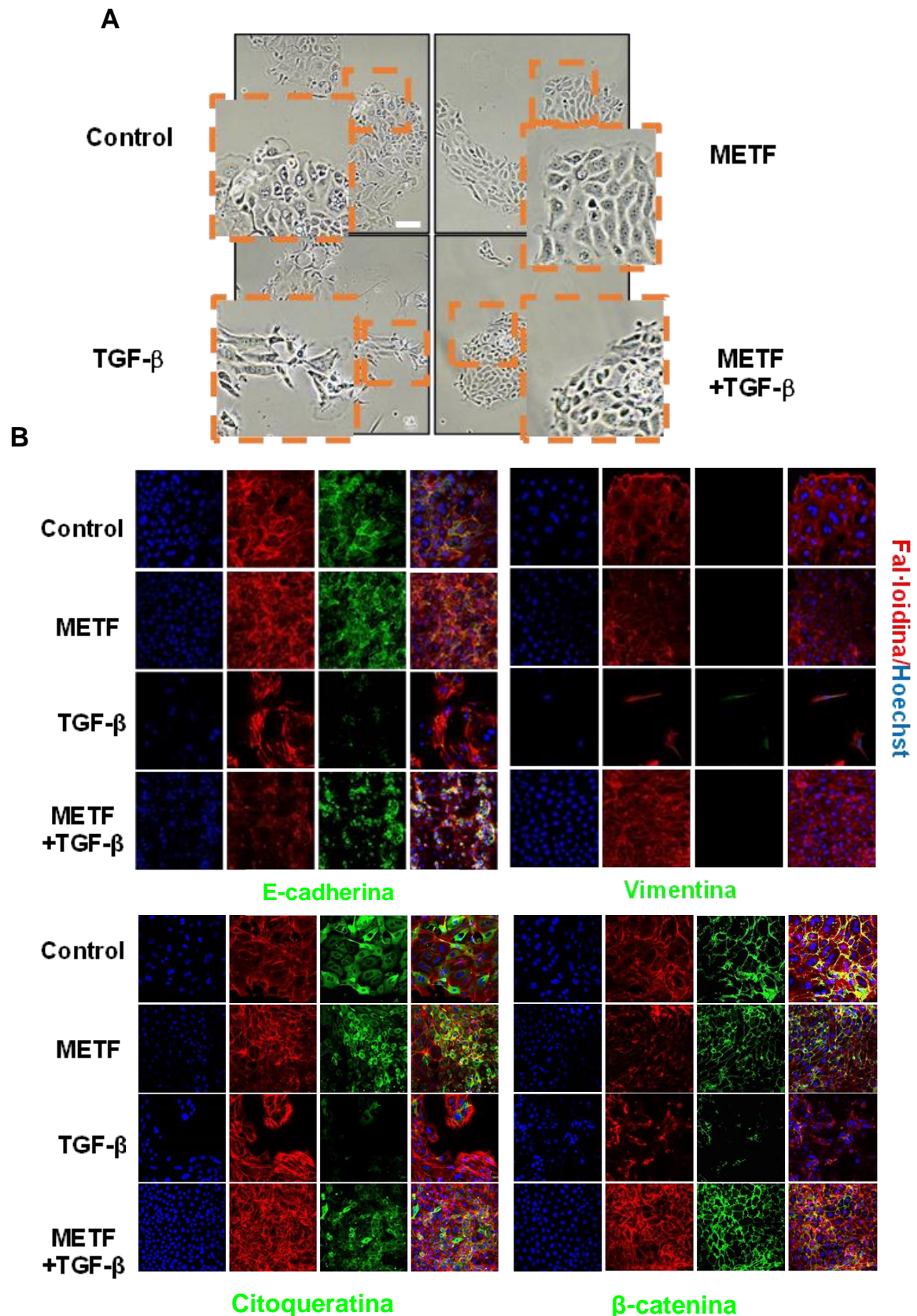


Figura 19. La Metformina inhibeix la Transició Epiteli-Mesènquima desencadenada pel TGF- β en cultius epitelials endometrials wt 2D. A. Imatges de microscopi de contrast de fases de cultiu 2D de cèl·lules epitelials endometrials wt no tractades (Control), tractades amb Metformina 20 nM, TGF- β 10 ng/ml o ambdòs durant 48 h. Els quadrats taronges assenyalen el fenotip d'EMT o no. **B.** Immunofluorescència de Citoqueratina, β -catenina, E-caderina i Vimentina sota les mateixes condicions. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M.

El tractament amb Metformina disminueix la proliferació de cèl·lules epitelials endometrials deficientes per *Smad2/3* i *Pten* sota condicions 3D

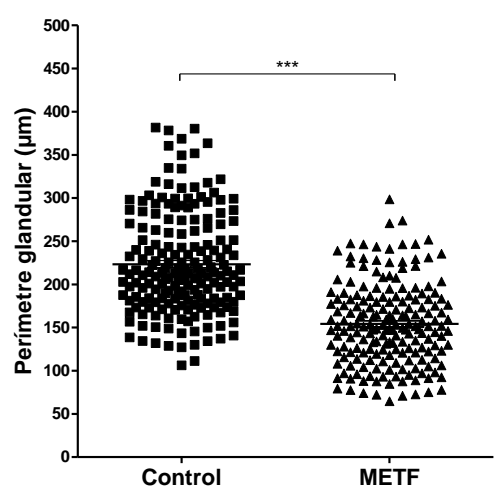
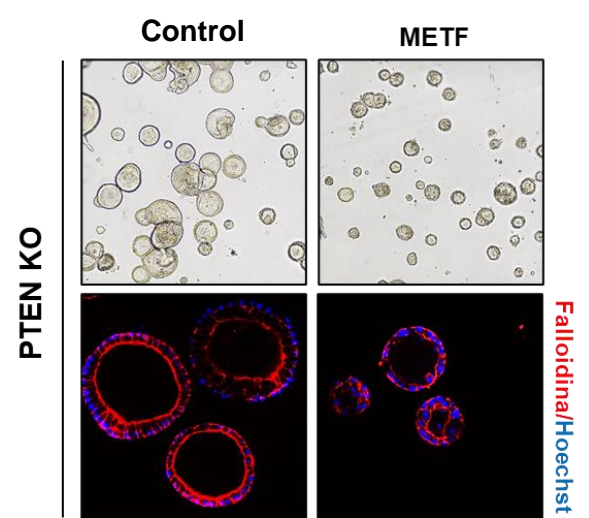
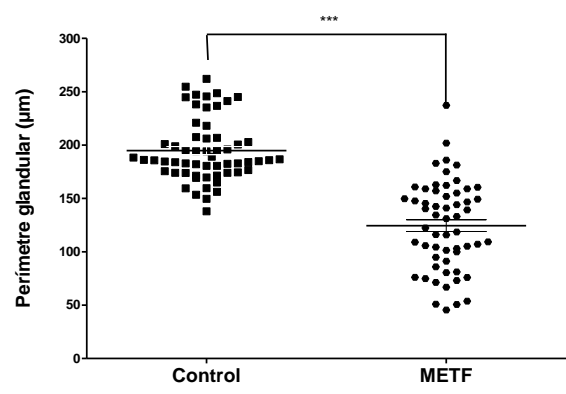
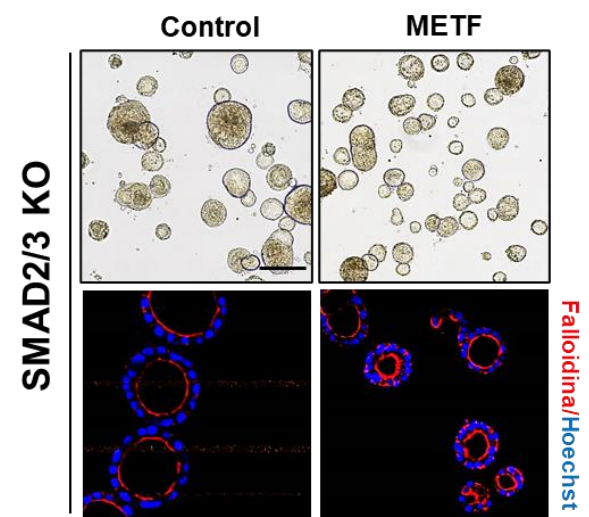
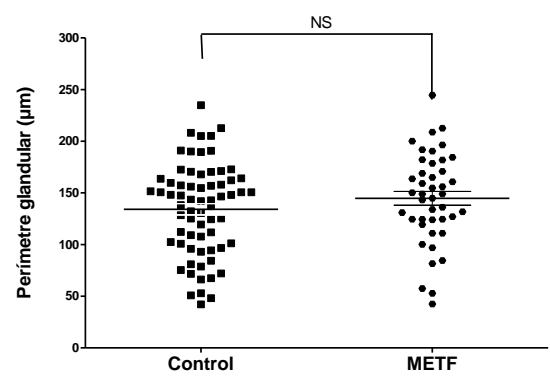
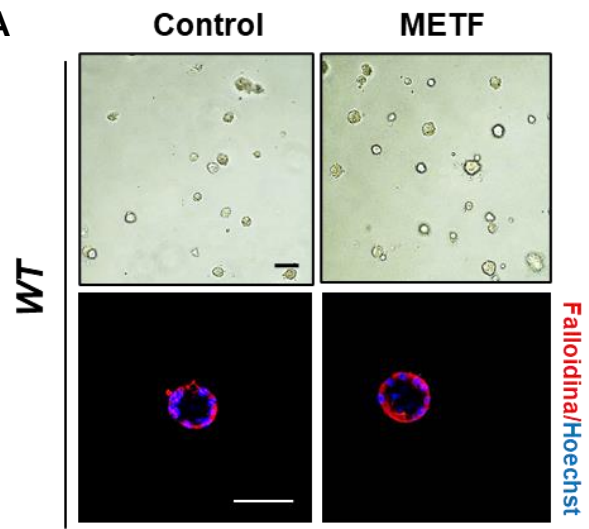
En aquest punt i conscients de la rellevància i la importància de la matriu extracel·lular en els cultius cel·lulars, vam decidir cultivar les cèl·lules epitelials endometrials en 3D per veure la implicació de la Metformina en els efectes del TGF- β en un context de tridimensionalitat.

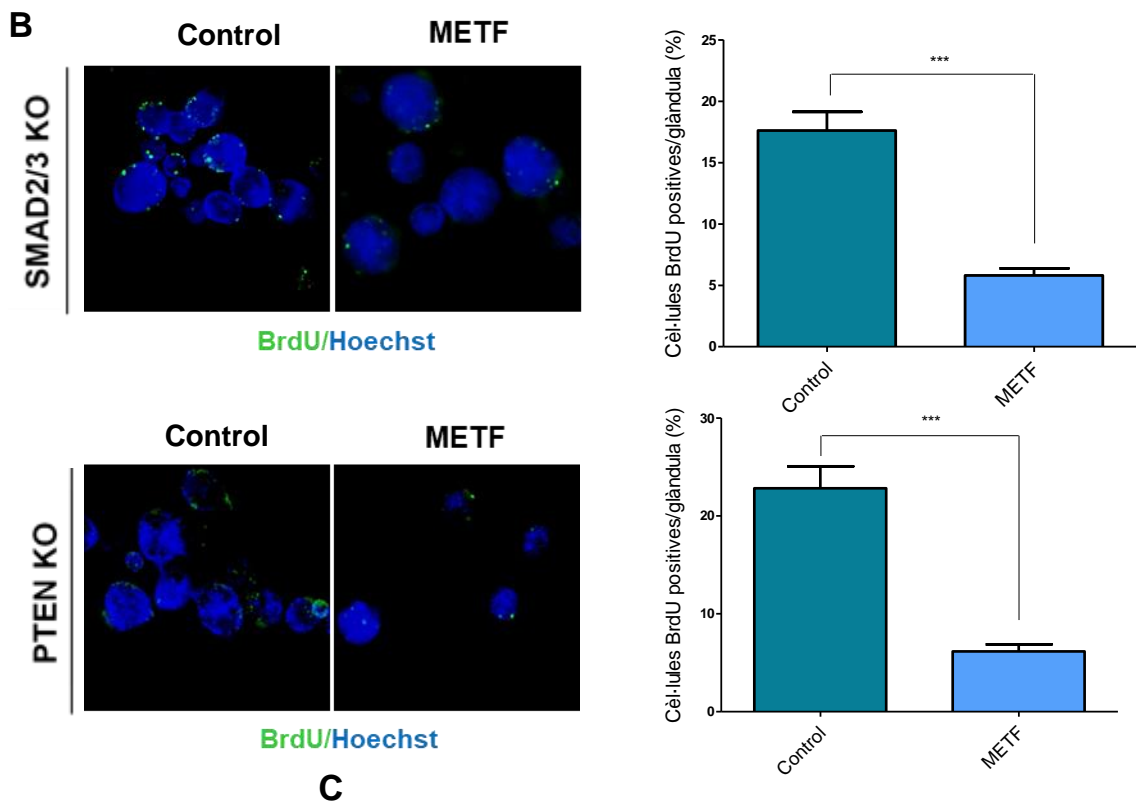
En estudis anteriors vam demostrar que una deficiència de *Smad2/3* i *Pten* en cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials endometrials implicava un augment en els perímetres glandulars dels organoides i en la proliferació (Eritja et al., 2017, 2021). El nostre objectiu amb la Metformina era investigar si aquesta podia tenir efectes supressors tumorals sobre els organoides endometrials deficientes de *Pten* o *Smad2/3*. Amb aquesta finalitat, es van cultivar cèl·lules epitelials endometrials Cre:ER^{+/-} SMAD2^{F/F}SMAD3^{F/F} i Cre:ER^{+/-} PTEN^{F/F} primerament en 2D i tractades o no amb Tamoxifè per induir l'ablació de *Pten* i *Smad2/3* (a partir d'ara les anomenarem **PTEN KO** i **SMAD2/3 KO** respectivament). Al dia següent es van plantar les cèl·lules en 3D i van ser cultivades durant 6 dies amb canvi de medi cada dos dies, fins la formació d'organoides madurs i estables. Posteriorment van ser tractats o no amb Metformina 20 mM durant 48 hores.

El perímetre glandular dels organoides, la incorporació de BrdU i l'expressió de ciclina D1 mitjançant western blot es van mesurar com a indicadors de la proliferació de les cèl·lules epitelials. El que vam observar va ser que tant els organoides amb deficiència de *Pten* com els organoides amb deficiència de *Smad2/3* tractats amb Metformina mostraven una disminució del perímetre glandular, però no els organoides *wt* (Fig. 20A).

D'igual manera, els organoides deficientes en *Pten* i els deficientes en *Smad2/3* també van mostrar una reducció de la incorporació de BrdU durant 3h (Fig. 20B) i de l'expressió de ciclina D1 (Fig. 20C), cosa que suggeria que la Metformina va inhibir la proliferació de cèl·lules epitelials de cèl·lules endometrials polaritzades amb deficiència de *Pten* i *Smad2/3*. L'acció farmacològica correcta de la Metformina es va analitzar mitjançant western blot. Com era d'esperar, la Metformina va provocar un augment la fosforilació AMPK α (Fig. 20C).

A





C

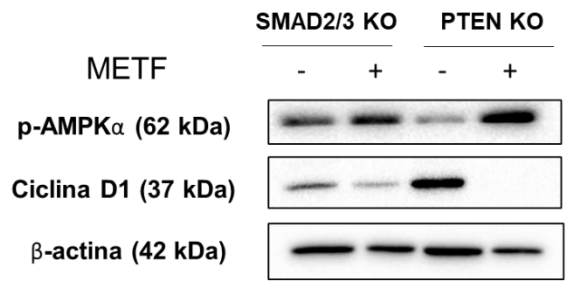


Figura 20. El tractament amb Metformina redueix el perímetre glandular dels organoides formats per cèl·lules epitelials endometrials SMAD2/3 i PTEN KO. A. Imatges de microscopi de contrast de fases, confocal i quantificació del perímetre glandular d'organoides WT, SMAD2/3 KO i PTEN KO tractats o no amb Metformina 20 nM durant 48 h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ***P<0,001 per student's t test. NS: no significatiu. **B.** Immunofluorescència de BrdU i quantificació de cultiu d'organoides SMAD2/3 i PTEN KO sota les mateixes condicions. Escala: 100 µM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ***P<0,001 per student's t test. **C.** Western Blot de p-AMPKα i Ciclina D1 d'organoides SMAD2/3 KO i PTEN KO tractats o no amb Metformina durant 3h.

La Metformina restaura la funció apoptòtica del TGF-β en cultius epitelials endometrials deficients per *Pten*, *Smad2/3* i *Smad2/3/Pten* en condicions 3D

A part de l'augment de la proliferació, també havíem descrit prèviament que les deficiències tant en *Pten* com en *Smad2/3* produeixen una resistència a la funció supressora tumoral d'apoptosi del TGF-β en organoides d'endometri (Eritja et al., 2017, 2021).

La família de factors de transcripció Smad són els principals transductors del receptor TGF-β (Aashaq et al., 2022). Igual que l'ablació de *Pten*, la supressió de *Smad3* dificulta la resposta apoptòtica al TGF-β a les cèl·lules endometrials epitelials polaritzades (Eritja et al., 2017). A més, també vam demostrar anteriorment que la deficiència de *Pten* condueix a la localització nuclear constitutiva de SMAD2/3 (Eritja et al., 2021). Aquestes observacions ens van permetre explorar els efectes de la Metformina sobre els organoides endometrials deficients en *Pten* i *Smad2/3*. Amb aquest propòsit, les cèl·lules epitelials endometrials aïllades van ser cultivades en 3D per a la formació dels organoides PTEN KO i SMAD2/3 KO. Al cap de 7 dies de 3D, els organoides van ser tractats amb 20 ng/ml del TGF-β, Metformina o la seva combinació i es va avaluar el nombre de cèl·lules apoptòtiques mitjançant tinció de Hoechst i immunofluorescència de *cleaved-Caspase3*. Curiosament, la Metformina va restaurar completament l'apoptosi induïda pel TGF-β en organoides endometrials amb deficiència de *Smad2/3*, *Pten* i *Smad2/3/Pten* (tKO), i es va observar un nombre similar de cèl·lules apoptòtiques a les observades en organoides wt tractats amb el TGF-β (Fig. 21).

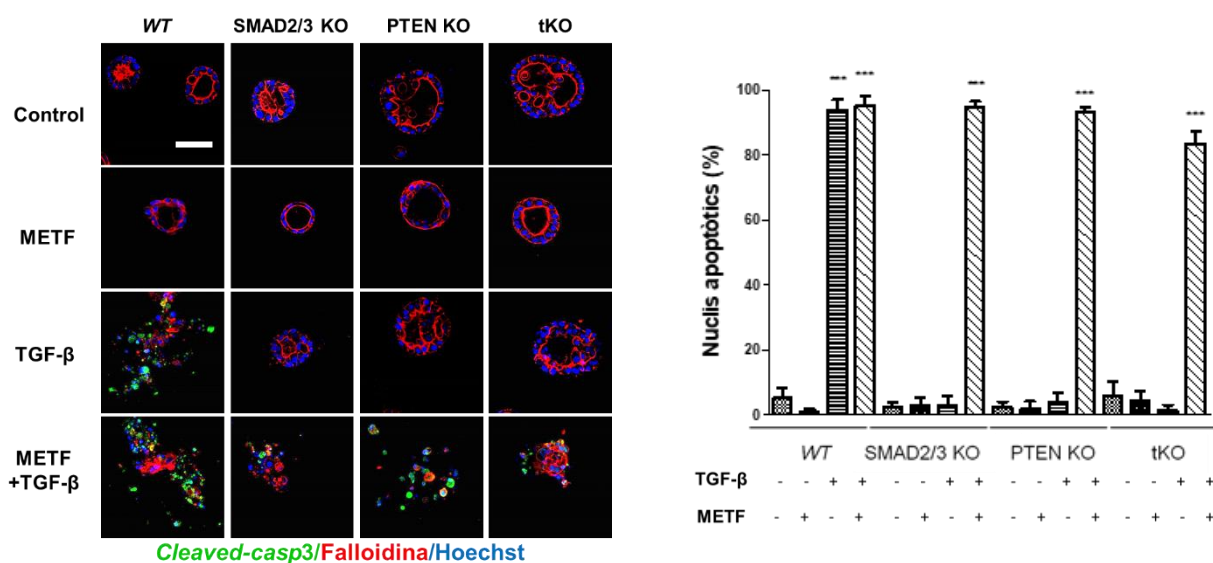


Figura 21. El tractament amb Metformina restuara la funció apoptòtica del TGF-β en cèl·lules epitelials endometrials amb pèrdua de *Smad2/3*, *Pten* i *Smad2/3/Pten* (triple KO: tKO). Immunofluorescència i quantificació de *cleaved-caspasa-3* de cultius 3D de cèl·lules epitelials d'endometri no tractades (Control), tractades amb Metformina 20 nM, 20ng/ml del TGF-β durant o ambdós tractaments durant 72h. Els cultius van ser contrastats amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ****P*<0,001 per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads, MAPK/ERK, MAPK/p38 i PI3K/AKT en cèl·lules epitelials d'endometri deficientes per *Pten* sota condicions 3D

Un cop demostrats els mecanismes cel·lulars de l'activitat anti-neoplàstica de la Metformina a les cèl·lules epitelials endometrials, vam investigar encara més els mecanismes moleculars de la seva acció. Amb aquest propòsit, vam realitzar una anàlisi western blot de les vies de senyalització que poden estar implicades en la proliferació endometrial, l'apoptosi o l'EMT. Així que vam estudiar les vies de senyalització implicades en el tractament amb Metformina. S'ha descrit que la Metformina pot modular les vies MAPK/ERK (Siddharth et al., 2022), PI3K/AKT (T. S. Kim et al., 2021; Sun et al., 2020) en diferents tipus de càncer.

Així doncs, vam voler centrar-nos en aquestes vies i en la via MAPK/p38, via involucrada en la senyalització de l'estrès, i vam observar una regulació a la baixa en MAPK/ERK, PI3K/AKT, MAPK/p38, així com en el marcador de proliferació Ciclina D1 en els organoides PTEN KO (Fig. 22).

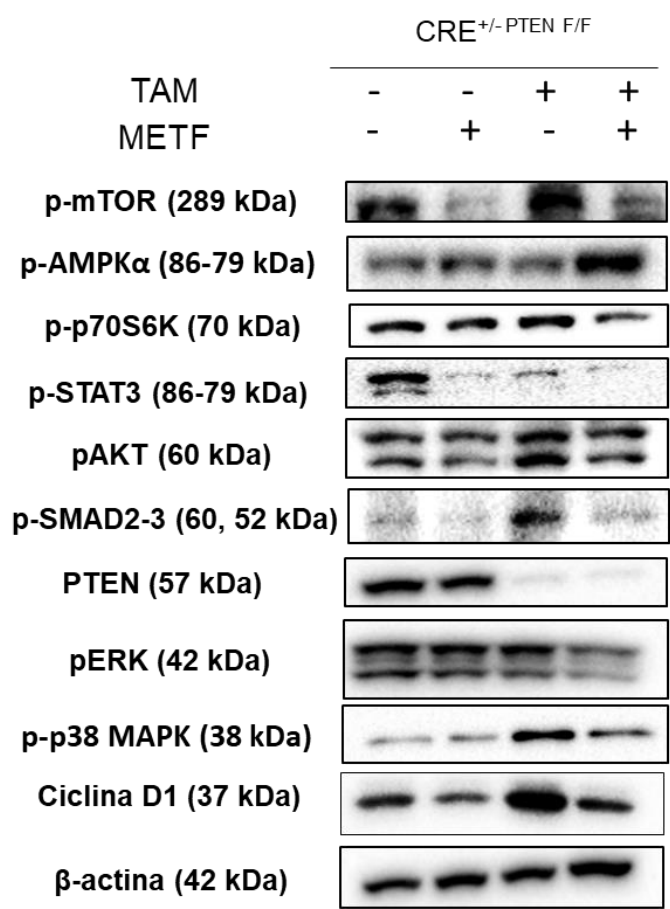


Figura 22. La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads, MAPK/ERK, MAPK/p38 i PI3K/AKT en organoides de cèl·lules epitelials endometrials PTEN KO. Western Blot de cèl·lules epitelials endometrials CRE^{+/-} PTEN^{F/F} sense i amb Tamoxifèn per deletar PTEN i/o Metformina 20 nM (- o +) durant 3 h sota condicions 3D que mostra l'estat de les vies.

La pèrdua de *Pten* augmenta la fosforilació de p38 en cultius epitelials endometrials sota condicions 3D i la Metformina ho reverteix

Com que prèviament havíem observat que p38 està regulada a l'alça en els cultius organoides deficients per *Pten* (Fig. 22) i és una via poc estudiada en relació a aquest fàrmac, vam decidir investigar si la Metformina podia regular aquesta via.

Vam comprovar per WB (Fig. 23A) i immunofluorescència (Fig. 23B) que la Metformina disminueix la fosforilació de p38. Vam corroborar aquesta disminució amb un inhibidor químic de p38, SB203580 a 15 µM, mitjançant el qual vam obtenir el mateix resultat (Fig. 23B).

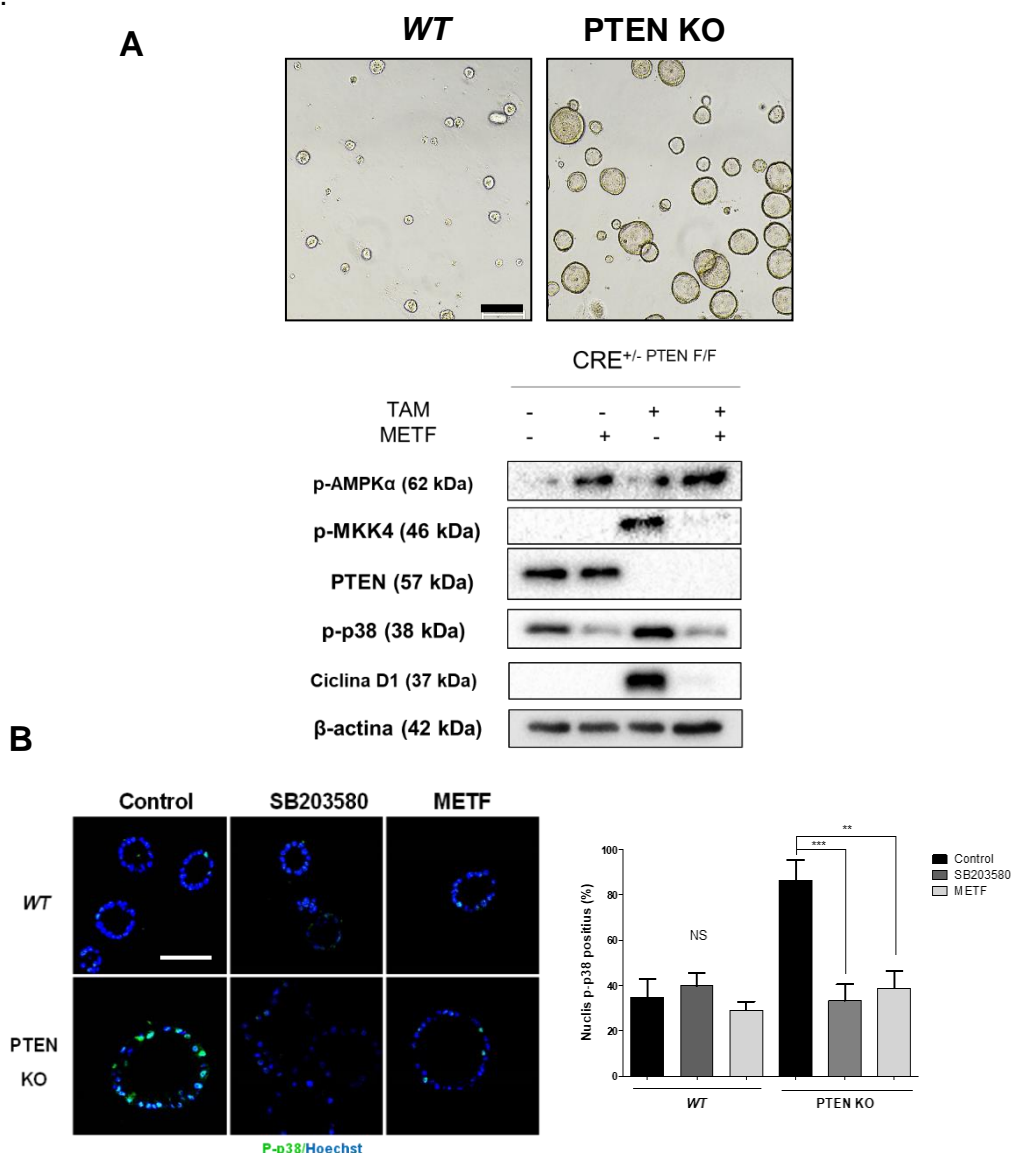


Figura 23. Els organoides 3D d'endometri PTEN KO tenen sobreexpressat p-p38 respecte els *wt* i això és revertit per la Metformina. **A.** (Dalt) Imatges de microscopi de contrast de fases d'organoides d'endometri *wt* i PTEN KO, (Baix) Western Blot dels dos genotips tractats i no amb Metformina 20 nM durant 3 h. Escala: 200 µM. **B.** Immunofluorescència p-p38 i quantificació d'organoides d'endometri *wt* versus PTEN KO no tractats (Control), tractats amb SB203580 15 µM o Metformina 20 nM durant 3 h. Escala: 100 µM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ***P*<0,01, ****P*<0,001 per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

La inhibició de p38 rescata l'apoptosi cel·lular del TGF- β en organoides 3D d'endometri PTEN KO

Prèviament ja havíem descrit la sobreexpressió de la via PI3K/AKT en els organoides de cèl·lules epitelials d'endometri deficients en *Pten*, així com la resistència a l'apoptosi del TGF- β a través d'aquesta via (Eritja et al., 2017).

Degut a la implicació de p38 en el mecanisme d'acció de la Metformina, ens vam plantejar si la restauració de l'apoptosi en els organoides PTEN KO podia ser a través de p38. Per tant, vam cultivar aquests models, així com els seus controls (*wt*) i vam utilitzar dos inhibidors químics específics de p38; SB203580 a 15 μ M i PH-797804 (PZ0259) a 2 μ M. El que vam observar és que tant l'SB (Fig. 24A) com PZ (Fig. 24B) a l'igual que la Metformina (Fig. 24B), restauraven l'apoptosi del TGF- β a través de la inhibició de p38.

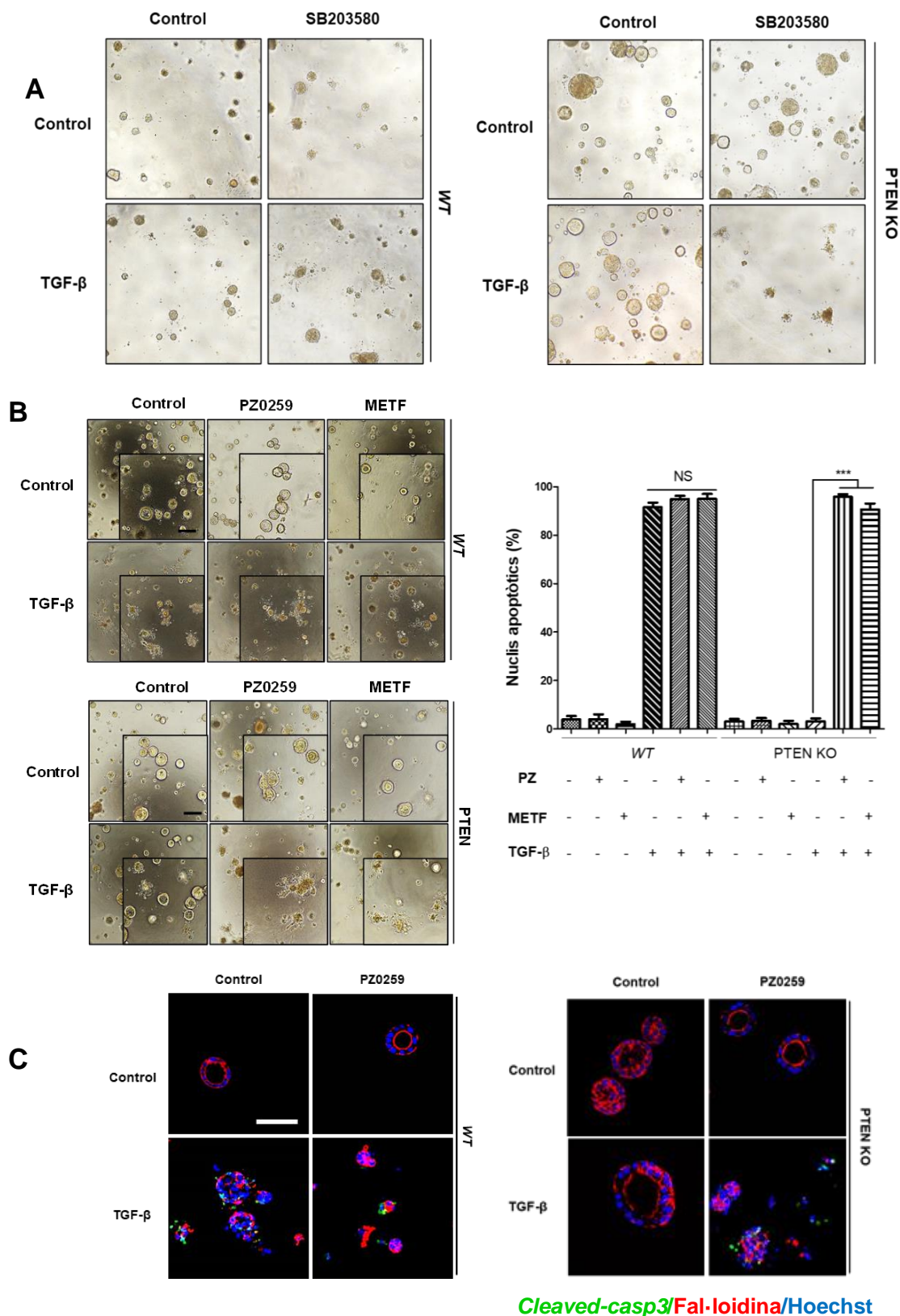


Figura 24. La inhibició de p38 rescata l'apoptosi cel·lular del TGF-β en organoides 3D d'endometri PTEN KO que eren resistents. A. Imatges de microscopi de contrast de fases d'organoides *wt* i PTEN KO no tractats (Control) o tractats amb SB203580 15 μM i co-tractats o no amb 20 ng/ml del TGF-β durant 48 h. **B.** Imatges de microscopi de contrast de fases i quantificació de nuclis apoptòtics d'organoides *wt* i PTEN KO no tractats (Control), tractats amb PZ0259 2 μM o Metformina 20 mM i co-tractats o no amb 20 ng/ml del TGF-β durant 48 h. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu. **C.** Imatges de microscopi confocal on es mostren els organoides no tractats, amb PZ0259, TGF-β o combinatòria. Escala: 100 μM.

La inhibició de p38 no inhibeix l'EMT desencadenada pel TGF- β en cèl·lules 2D d'endometri

A més de la reducció de la proliferació i el rescat de l'apoptosi, fins aquí havíem demostrat que la metformina bloqueja l'EMT de cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades cultivades en cultius 2D. Per tant, vam voler abordar els mecanismes moleculars implicats en aquesta inhibició. Com vam fer amb els organoides, vam realitzar una anàlisi de western blot de la fosforilació AKT, p38 i ERK en cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades després del tractament amb Metformina. La Metformina va reduir la fosforilació d'AKT, ERK i p38 en cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades (Fig. 25A). A continuació, vam exposar cèl·lules epitelials endometrials a l'inhibidor de p38 PZ0259 2 μ m. L'observació amb el microscopi de contrast de fases del cultiu tractat no va mostrar cap signe de reducció de l'EMT (Fig. 25B). En conseqüència, la inhibició de p38 no va bloquejar l'augment associat a l'EMT de l'expressió de Vimentina causat pel TGF- β a 20 ng/ml (Fig. 25C). En canvi, la inhibició de l'ERK per UO126 a 10 μ m va bloquejar completament la morfologia EMT de les cèl·lules endometrials (Fig. 25B). Aquests resultats estan en línia amb els nostres estudis anteriors que van demostrar que l'EMT induïda pel TGF- β es basava en l'activació d'ERK (Ruiz-Mitjana et al., 2022). Per corroborar això, vam realitzar una anàlisi de Western Blot amb cèl·lules d'endometri no polaritzades exposades a U0126, PZ, TGF- β i combinatòries a curt termini (30 min) per veure l'estat de la fosforilació d'ERK. En efecte, vam veure la inhibició de pERK en les cèl·lules tractades amb U0 i U0+TGF- β (Fig. 25D), posant de manifest que l'EMT es regula a través d'ERK.

Finalment vam realitzar una anàlisi de Western Blot que mostrava la inhibició de la fosforilació d'ERK en aquest tipus de cèl·lules amb el tractament i co-tractament a curt termini (30 min) del TGF- β 20 ng/ml i Metformina a la dosi de 20 mM per tal de corroborar els resultats (Fig. 25E).

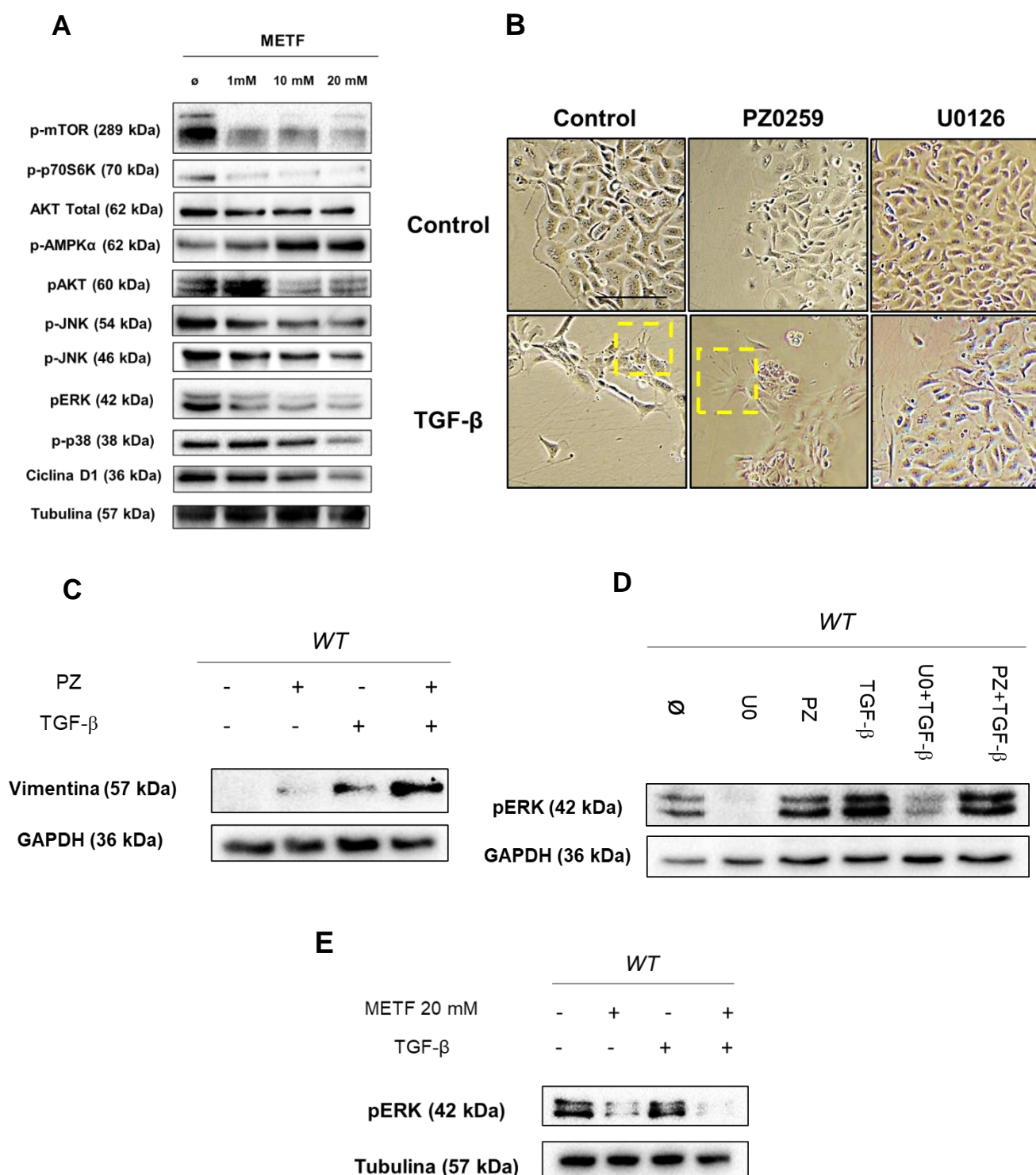


Figura 25. La inhibició de l'EMT induïda pel TGF-β que provoca la Metformina és independent de p38. A. Western Blot de les vies a concentracions creixents de Metformina durant 3h. **B.** Imatges de microscopi de contrast de fases de cultiu 2D de cèl·lules epitelials endometrials *wt* no tractades (Control), pre-tractades amb PZ0259 2 μm o U0126 10 μm i TGF-β 10 ng/ml durant 72 h. Els quadrats grocs assenyalen el fenotip mesenquimal. Escala: 100 μm. **C.** Western Blot que mostra l'expressió de Vimentina en les cèl·lules no tractades, tractades amb PZ, TGF-β i combinatòria durant 72h. **D, E.** Western blots que mostren l'expressió de la fosforilació d'ERK amb el tractament de U0, PZ, Metformina i/o TGF-β a curt termini (30 min).

2.1.2. En cèl·lules de tiroide

Com ja hem introduït prèviament, la llarga trajectòria en l'ús de la Metformina ha fet que durant molts anys hagi sigut objecte d'estudi en diversos càncers, degut a l'evidència dels estudis retrospectius i a la idoneïtat del fàrmac pel seu excel·lent perfil de seguretat així com el seu baix cost econòmic. L'ús de la Metformina com a possible agent antitumoral resulta d'especial interès en els càncers de tiroides, ja que moltes vegades aquests cursen amb hiperinsulinèmia i augment de la captació de glucosa -context idoni pel creixement de cèl·lules tumorals de tiroide– i la Metformina pot actuar en aquests nivells; augmentant la sensibilitat a la insulina i reduint la gluconeogènesi hepàtica.

En els últims anys s'han demostrat els efectes potencials de la Metformina com a agent antitumoral en càncer de tiroide a través d'estudis retrospectius (García-Sáenz et al., 2022; Klubo-Gwiedzinska et al., 2013) i amb estudis *in vitro* (Bikas et al., 2015; B. Han et al., 2015; Morale et al., 2022).

Per altra banda, BRAFV600E és una mutació freqüent en tots els tipus de càncers de tiroides (Laha et al., 2020), que desencadena en una hiperactivació de la via MAPK, i això s'associa a un fenotip de tumor més agressiu, major risc de recurrència, i persistència de la malaltia.

És per això que cada vegada més s'estudien inhibidors BRAFV600E com Vemurafenib, Dabrafenib o Trametinib sols o combinats amb fàrmacs que inhibeixen altres mecanismes oncogènics coneguts en l'inici i la progressió del càncer de tiroide, com per exemple la via PI3K/AKT/mTOR. En tot cas, tant la via MAPK com la via PI3K/AKT/mTOR -vies altament relacionades amb proliferació- són candidates ideals per a la seva inhibició. Tal i com hem explicat fins ara, les nostres línies de treball sempre tenen a *Pten* com a protagonista i regulador negatiu de la via PI3K/AKT.

Per totes aquestes raons vam trobar interessant posar el focus de la Metformina també en el càncer de tiroide; primerament amb models de línies humanes cel·lulars i organoides de tiroides de ratolí i posteriorment amb teixits de tiroides de ratolí *in vivo*.

El tractament amb Metformina redueix la proliferació de la línia cel·lular humana de tiroide FTC-133 però no de CAL-62 en condicions 2D

Com ja hem explicat prèviament, la Metformina actua inhibint tant l'eix MAPK/ERK com PI3K/AKT/mTOR entre d'altres (B. Zhao et al., 2020).

Amb això, vam decidir estudiar dues línies cel·lulars humanes de tiroides diferents, com és la línia FTC-133, derivada d'un carcinoma fol·licular de tiroide i que presenta pèrdua de *Pten*, i la línia CAL-62, derivada d'un carcinoma de tiroide anaplàstic.

Primerament vam plantar les dues línies en condicions 2D i al cap de 24h les vam tractar amb Metformina i vam realitzar un assaig d'incorporació BrdU durant 3h. El que vam observar és que mentre que la línia FTC-133 era sensible a la Metformina i mostrava una reducció en la proliferació, CAL-62 no ho feia (Fig. 26).

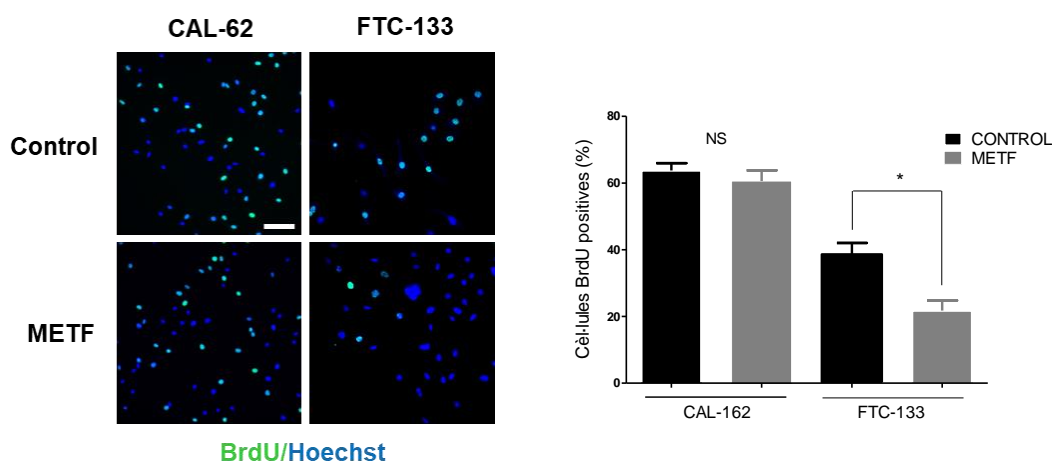


Figura 26. El tractament amb Metformina redueix la proliferació de la línia cel·lular humana de tiroide FTC-133 però no de CAL-62. Immunofluorescència de BrdU i quantificació de cultiu 2D de línies humanes de tiroides FTC-133 i CAL-62 no tractades (Control) i tractades amb Metformina 20 nM durant 48 h. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * P <0,05 per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

La Metformina regula les vies de senyalització TGF- β /Smads, MAPK/ERK i PI3K/AKT en les línies cel·lulars humanes de tiroides FTC-133 i CAL-62

Vam decidir doncs analitzar les *targets* principals d'actuació de la Metformina mitjançant assajos Western Blot i mirar els nivells de proteïna de les diferents vies d'interès. Vam veure una regulació a la baixa de molècules de les vies PI3K/AKT, MAPK/ERK, TGF- β /SMADs, així com augment de p-AMPK α en ambdues línies (Fig. 27). A més a més, vam observar la pèrdua de PTEN en FTC-133 en línia amb un augment en pAKT.

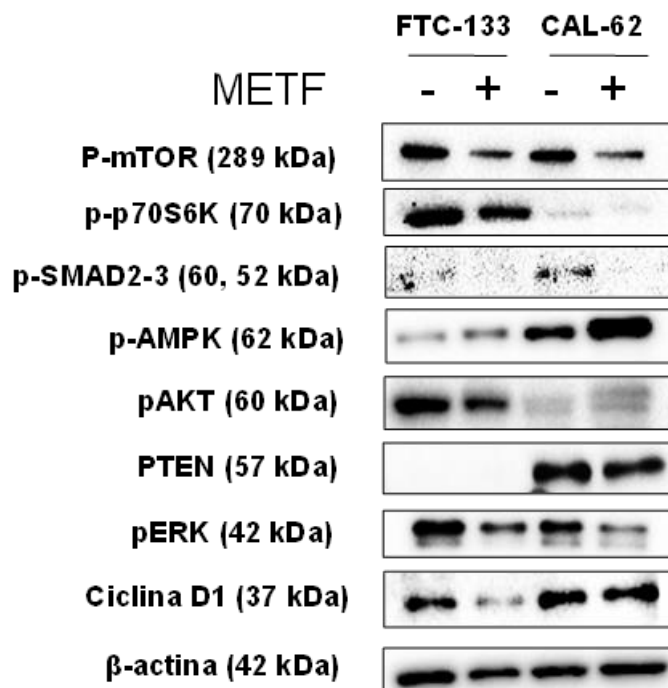


Figura 27. La Metformina regula les vies de senyalització TGF-β/Smads, MAPK/ERK i PI3K/AKT en les línies humanes de tiroides estudiades. Western Blot de línies humanes de tiroides FTC-133 i CAL-62 en 2D sense o amb Metformina 20 nM (- o +) durant 3 h que mostra l'estat de les vies.

El TGF-β desencadena un fenotip d'EMT en cultius tridimensionals de CAL-62 i aquest procés és inhibit per la Metformina

De nou, vam voler relacionar la Metformina amb els efectes del TGF-β. Així que vam cultivar FTC-133 i CAL-62 en condicions 3D i les vam tractar i co-tractar amb Metformina 20 nM i 10 ng/ml del TGF-β durant 48h. Tant FTC-133 com CAL-62 expressen Vimentina (Jeon et al., 2016). No obstant això, el que vam descobrir és que les cèl·lules CAL-62 amb el tractament del TGF-β patien un procés d'EMT ja que canviaven el fenotip de les cèl·lules arrodonies a un fenotip de cèl·lula més allargada i espiculada. Això va ser revertit per la Metformina (Fig. 28), resultats en concordança amb les cèl·lules epitelials endometrials *wt* descrites anteriorment (Fig. 19).

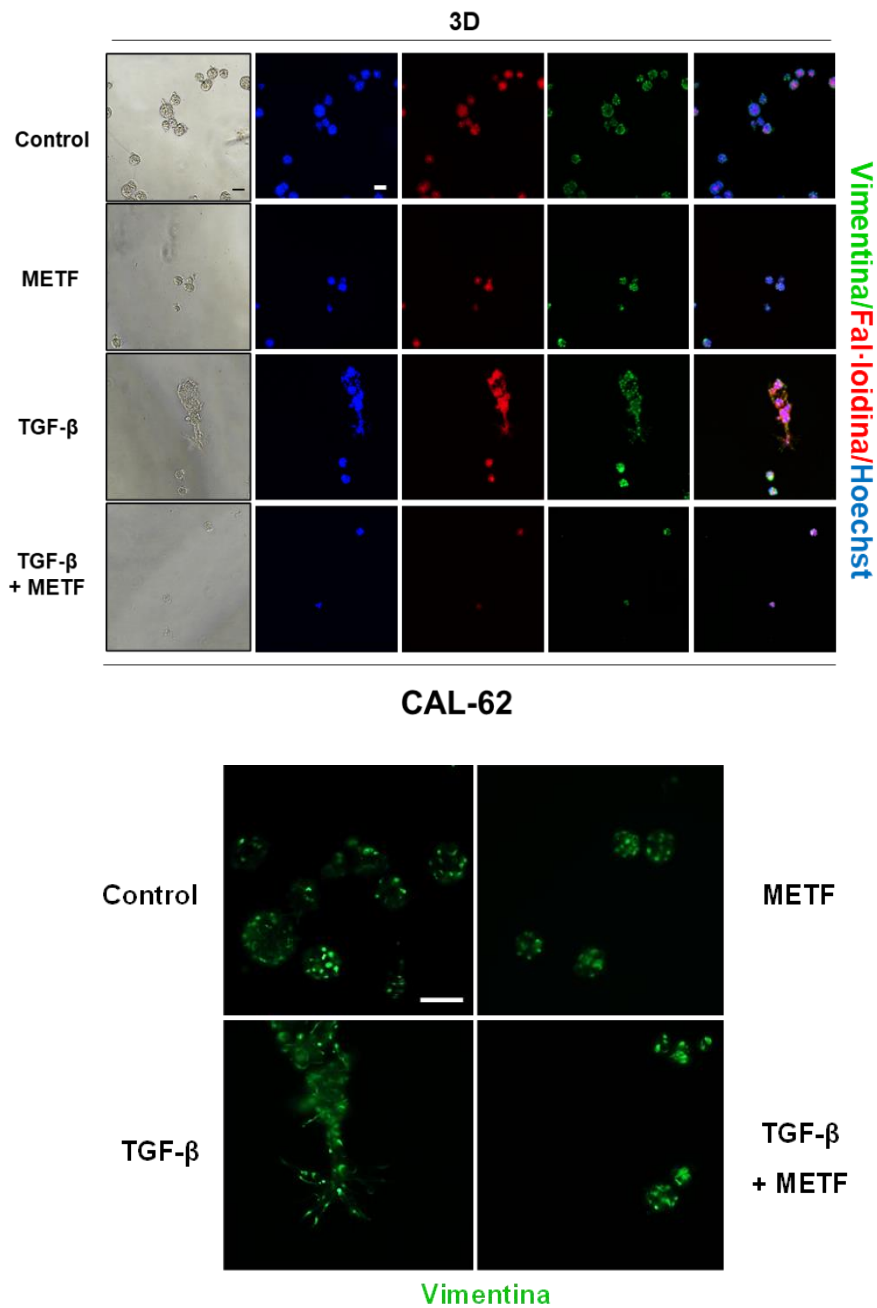


Figura 28. TGF-β desencadena la Transició Epiteli-Mesènquima en cultius 3D de CAL-62 i això és inhibit per la Metformina. Imatges de microscopi de contrast de fases i immunofluorescència de Vimentina de cultiu 3D de CAL-62 no tractat (Control), tractat amb Metformina 20 nM, 10 ng/ml del TGF-β o ambdòs durant 48 h. Els cultius van ser contrastats amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM.

El TGF-β no desencadena l'EMT en cultius tridimensionals de FTC-133

El tractament amb el TGF-β dels cultius tridimensionals de FTC-133 no va desencadenar un fenotip EMT (Fig. 29).

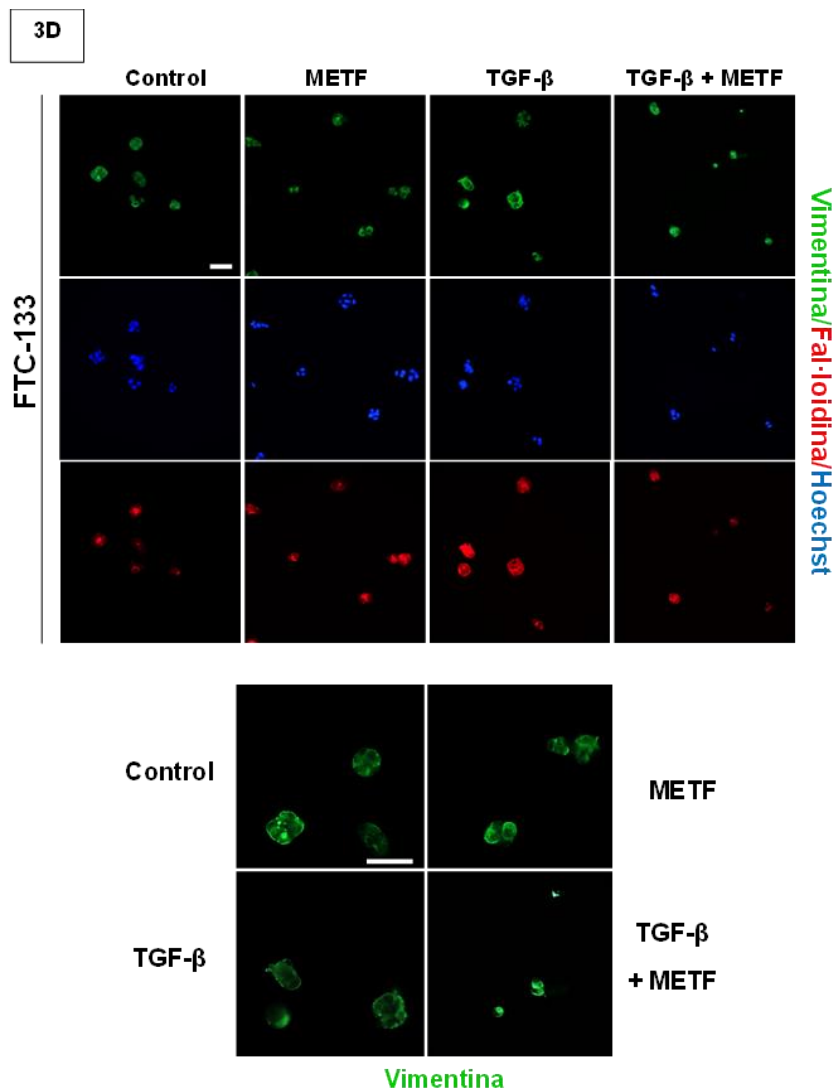


Figura 29. TGF-β no desencadena la Transició Epiteli-Mesènquima en cultius 3D de FTC-133. Immunofluorescència de Vimentina de cultiu 3D de FTC-133 no tractat (Control), tractat amb Metformina 20 nM, TGF-β 10 ng/ml o ambdòs durant 48 h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μM.

La Transició Epiteli-Mesènquima desencadenada pel TGF-β en cultius 3D de CAL-62 és mediada per pERK

Com que anteriorment ja havíem descrit que el procés d'EMT provocat pel TGF-β en cèl·lules epitelials d'endometri 2D era mediat per pERK, vam voler saber si en els cultius

CAL-62, l'EMT d'igualment era mediada per ERK. Vam cultivar CAL-62 en les mateixes condicions que abans, però aquest cop les vam tractar i co-tractar amb U0126 10 μ M enlloc de Metformina, i amb el TGF- β . El que vam obtenir, va ser concloent: es produïa inhibició d'EMT quan s'inhibia la fosforilació d'ERK (Fig. 30).

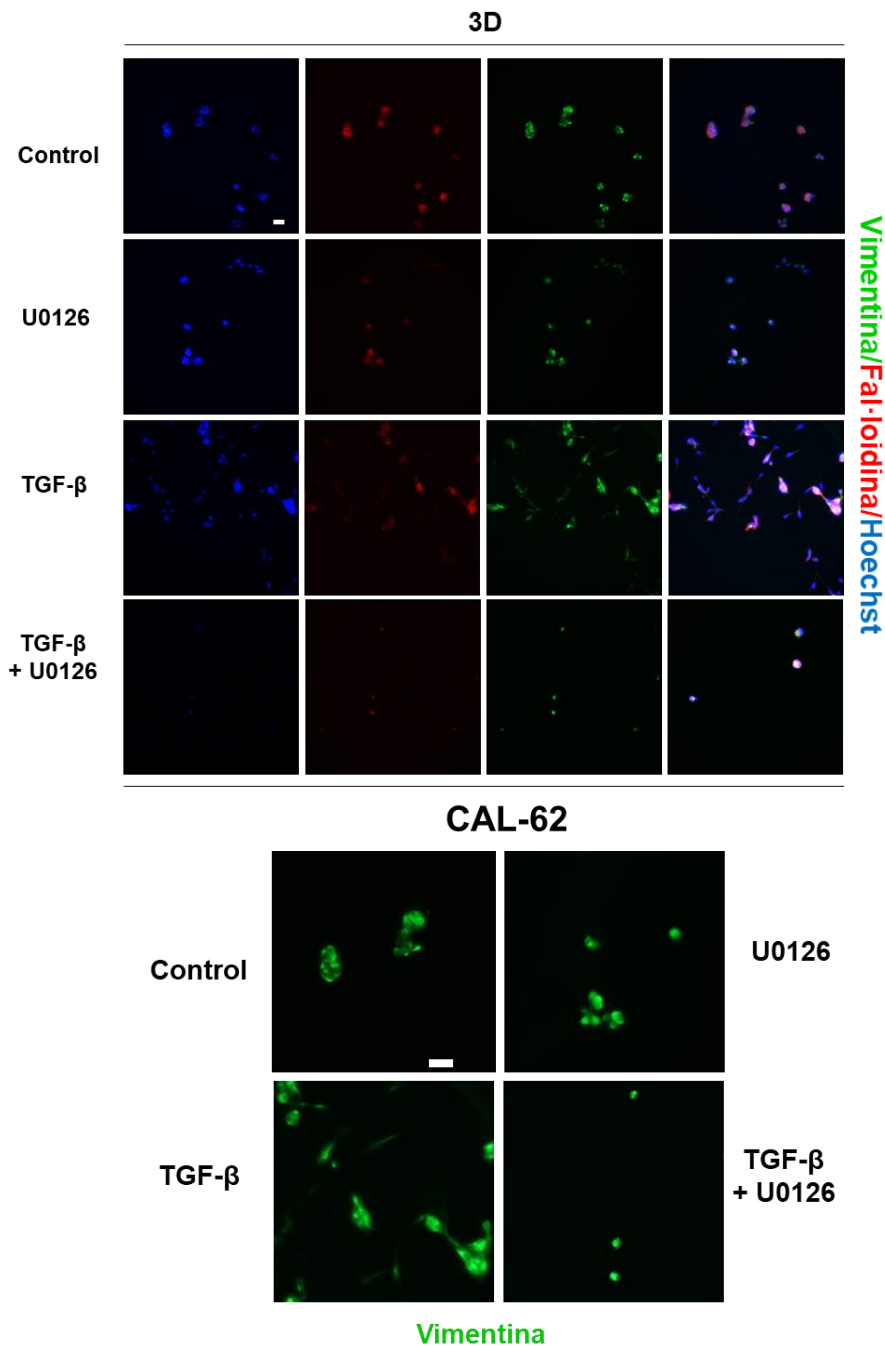


Figura 30. La Transició Epiteli-Mesènquima desencadenada pel TGF- β en cultius 3D de CAL-62 és inhibida per U0126. Immunofluorescència de Vimentina de cultiu 3D de CAL-62 no tractat (Control), tractat amb Metformina 20 nM, 10 ng/ml del TGF- β o ambdòs durant 48 h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M

Els organoides 3D de tiroide de ratolí deficientes en *Pten* tenen un perímetre glandular major que els *wt*

Seguidament, vam voler estudiar la Metformina amb organoides derivats de tiroide de ratolí, així que vam dissenyar i optimitzar un nou cultiu per generar organoides de tiroide. Vam utilitzar el model animal de ratolí CRE^{ERT} PTEN^{F/F} amb la injecció prèvia de l'animal de *Corn Oil* o TAM. Després de 4 setmanes, vam extreure les tiroides, les vam trossejar, digerir amb un medi de digestió, filtrar i plantar en condicions 2D + 2% matrigel al medi específic de tiroide amb suplement de Hormona Estimulant de la Tiroide o *Thyroid-stimulating hormone* (TSH). Al cap de 48 h, les vam plantar en condicions 3D, amb un llit base de matrigel i 3% de matrigel al medi. Aquests cultius aguantaven estables fins 5-6 dies sense cap canvi de medi.

Primerament vam corroborar la deleció de PTEN en aquest cultiu a través de Western Blot (Fig. 31A) i el primer que vam observar va ser que els dos genotips de cèl·lules (*wt* i PTEN KO) creixien formant glàndules de mides similars (Fig. 31B). Llavors vam pensar que la TSH estimulava tant la proliferació que potser no deixava veure canvis de creixement:

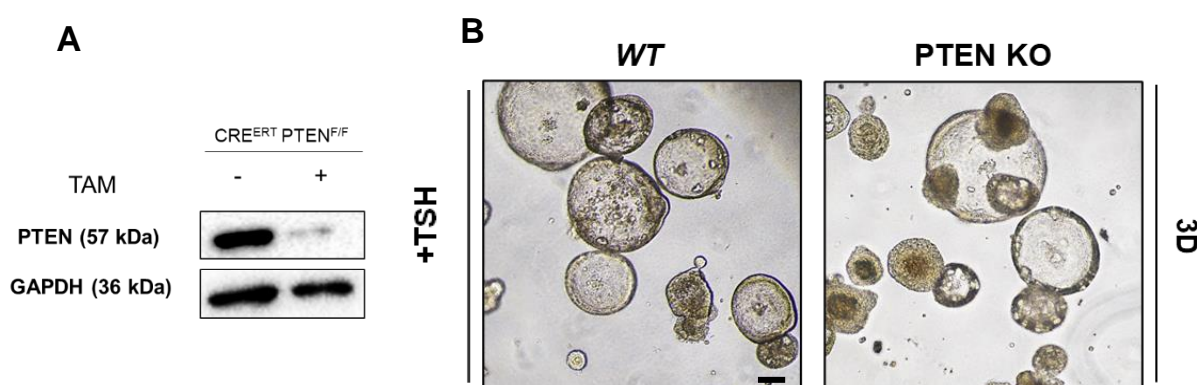


Figura 31. Els organoides de tiroides de ratolí tant *wt* com deficientes en *Pten* tenen perímetres glandulars comparables en medi amb TSH. A. Anàlisi de Western Blot que mostra l'estat de PTEN en ambdós cultius. **B.** Imatges de microscopi de contrast de fases i quantificació d'organoides *wt* i PTEN KO de tiroides de ratolí amb mides de les glàndules sense diferències significatives. Escala: 100 µM.

Així doncs, vam plantar els organoides amb TSH per al seu creixement òptim, i vam retirar del medi la TSH durant tres dies. Vam observar llavors que les cèl·lules deficientes en *Pten* creixien formant organoides amb un perímetre glandular major que les *wt* (Fig. 32).

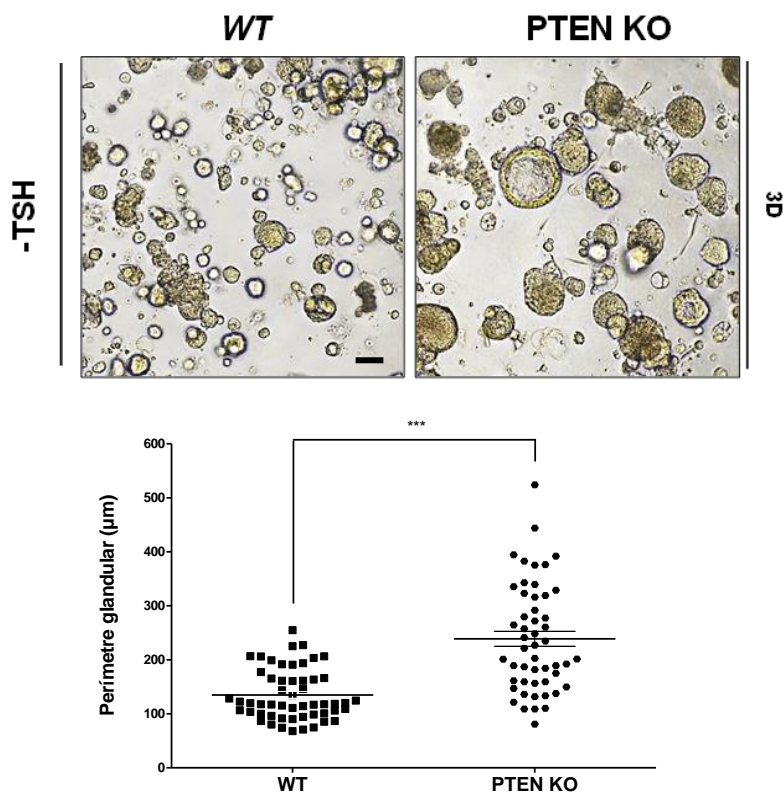


Figura 32. Els organoides de tiroides de ratolí deficientes en *Pten* tenen perímetres glandulars superiors als *wt* en medi sense TSH. Imatges de microscopi de contrast de fases i quantificació del perímetre glandular d'organoides *wt* i PTEN KO de tiroides de ratolí que mostren les diferències de mides de les glàndules. Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *student's t* test.

El tractament amb Metformina activa l'apoptosi cel·lular en organoides 3D de tiroide de ratolí *wt* però no PTEN KO

D'igual manera que en els procediments anteriors, en aquest punt ens vam plantejar caracteritzar la resposta de la Metformina en relació al TGF-β. Així que vam cultivar els organoides *wt*, PTEN KO, i vam tractar i co-tractar els organoides amb Metformina 20 nM i 20 ng/ml del TGF-β. El que vam observar va ser que, per una banda, el TGF-β no va produir cap alteració en el fenotip de cap dels dos grups d'organoides (Fig. 33A). Per altra banda, la Metformina va activar caspasa-3 els cultius *wt*, indicadora de l'inici d'un procés d'apoptosi, però els cultius PTEN KO van ser resistents a aquesta apoptosi (Fig. 33A, B).

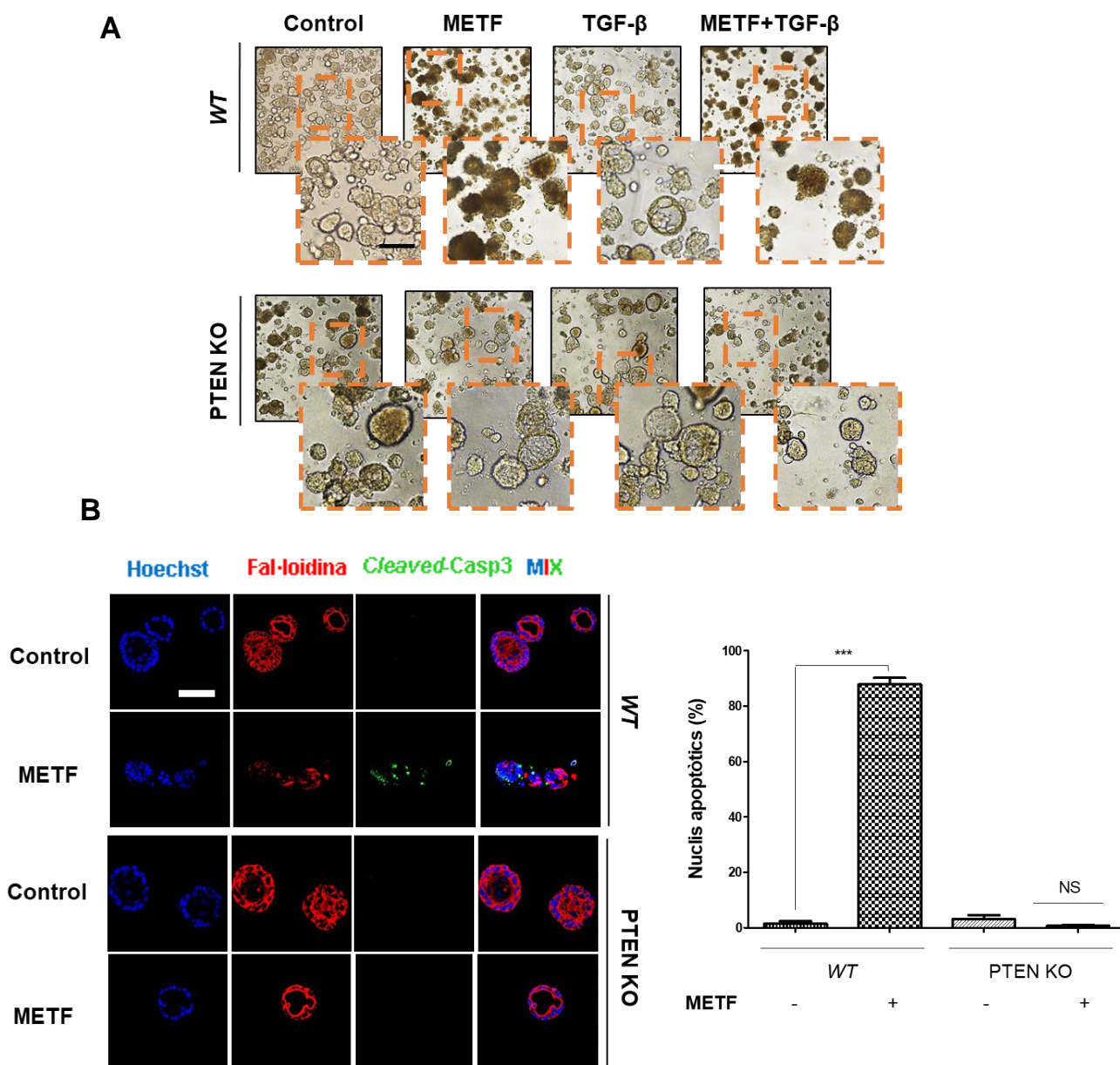


Figura 33. La Metformina activa l'apoptosi cel·lular en organoides de tiroides de ratolí *wt* però no PTEN KO. **A.** Imatges de microscopi de contrast de fases de nuclis apoptòtics d'organoides *wt* i PTEN KO de tiroides de ratolí sense tractar (Control), tractats amb Metformina 20 nM i/o 20 ng/ml del TGF-β durant 48h. **B.** Immunofluorescència i quantificació de cleaved-casp3 dels organoides tractats o no amb Metformina durant 48h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal-loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli i el fenotip apoptòtic. Escala: 100 μM. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

2.2. Estudi *in vivo* de la Metformina en tumors d'endometri, tiroide i pròstata deficients per *Pten* en ratolí

Un cop obtinguts els primers resultats *in vitro*, vam voler utilitzar el nostre model animal de ratolí CRE^{+/-} PTEN^{F/F} per testar la Metformina *in vivo*.

Un cop deletionat PTEN a través d'una dosi única d'injecció amb Tamoxifè, les femelles d'aquest model animal desenvolupen càncer d'endometri i tiroide a les 5-6 setmanes. Els mascles desenvolupen càncer de pròstata i tiroide igualment a les 5-6 setmanes. Per això, primerament vam dissenyar un protocol temporal per administrar la Metformina diàriament i a través de sondatge oral, un cop deletionat *Pten* i durant el període de desenvolupament de les neoplàsies.

El tractament amb Metformina durant 28 dies augmenta l'esperança de vida dels ratolins deficients per *Pten*

Basant-nos en la literatura científica (Schrauwen et al., 2015; TRAN et al., 2019), vam decidir que la dosi de Metformina a utilitzar seria de 250 mg/Kg/dia. Per això vam preparar una solució amb PBS partir de la Metformina *stock*, que va quedar a 50 mg de Metformina/ml de PBS. Els ratolins pesen una mitjana de 20 g a les 6 setmanes de vida, així que el volum a administrar al ratolí seria d'aproximadament 100 µL (5 mg).

Aquesta dosi pot semblar elevada però la Metformina és un fàrmac molt segur i per assegurar-nos que aquesta dosi no resultava letal pel ratolí, vam avaluar els pesos dels ratolins i els nivells de glucosa en sang.

Els ratolins CRE^{+/-} PTEN^{F/F} són destetats a les 3 setmanes de vida i posteriorment reben la injecció de Tamoxifè (**TAM**) o *Corn Oil* (**CON**) els controls a les 5-6 setmanes de vida. Després són tractats diàriament amb 250 mg de Metformina/Kg de pes corporal mitjançant sondatge oral durant 4 setmanes consecutives (**CON+METF** o **TAM+METF**) i sacrificats (Fig. 34A). El que primer vam observar va ser que els ratolins que van estar sondats per via oral amb Metformina durant 4 setmanes -tant mascles com femelles- tenien una esperança de vida major que els no tractats (Fig. 34B). Això ja ens va fer pensar que la Metformina tenia algun efecte de millora de les condicions de salut dels ratolins. Per altra banda vam corroborar que la Metformina no alterava els pesos dels ratolins ni els nivells de glucosa en sang (Fig. 34C, D).

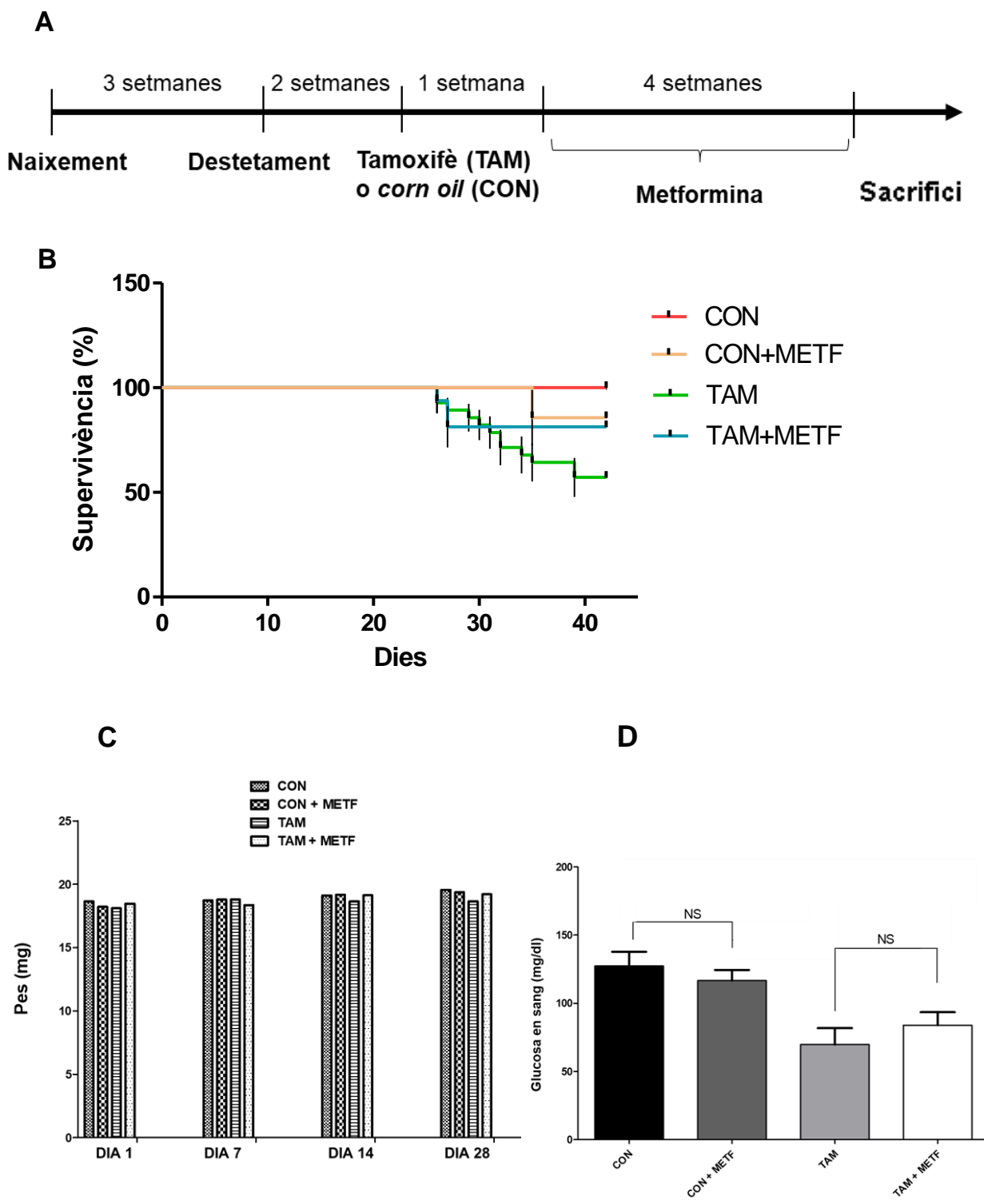


Figura 34. El tractament amb Metformina *in vivo* augmenta la supervivència dels ratolins deficients per *Pten* que desenvolupen neoplàsies. A. Esquema temporal que mostra els tractament del ratolins CRE^{+/-} PTEN^{F/F}. **B.** Gràfic de supervivència dels ratolins després del tractament de *Corn oil* (CON), *Corn oil* amb Metformina (CON+METF), Tamoxifè (TAM) i Tamoxifè amb Metformina (TAM+METF) durant 42 dies. **C.** Pesos dels ratolins dels 4 grups durant 28 dies. **D.** Glucosa en sang dels ratolins dels 4 grups. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *One-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

2.2.1. En endometri

La Metformina redueix el desenvolupament de neoplàsies d'endometri provocades per la pèrdua de *Pten in vivo*

En aquest punt, i un cop assegurats que la Metformina no alterava el fenotip dels ratolins control ($CRE^{+/-}$ $PTEN^{F/F}$ tractats amb *Corn Oil*) ni afectava la seva salut negativament, vam analitzar els endometris dels tres grups de ratolins d'interès: $CRE^{+/-}$ $PTEN^{F/F}$ tractats amb *Corn Oil* (**CON**), Tamoxifè (**TAM**) o Tamoxifè i Metformina (**TAM+METF**) per fer anàlisis d'H&E.

L'anàlisi patològica de l'endometri va mostrar que la Metformina va provocar una reducció marcada de la gravetat de la lesió endometrial (Fig. 35A). El percentatge de ratolins que pateixen neoplàsia intraepitelial endometrial de grau 3 (EIN) es va reduir del 55% al 0%. També l'EIN de grau 2 es va reduir del 45% al 33% i el 17% dels ratolins tenien un endometri normal (Fig. 35B).

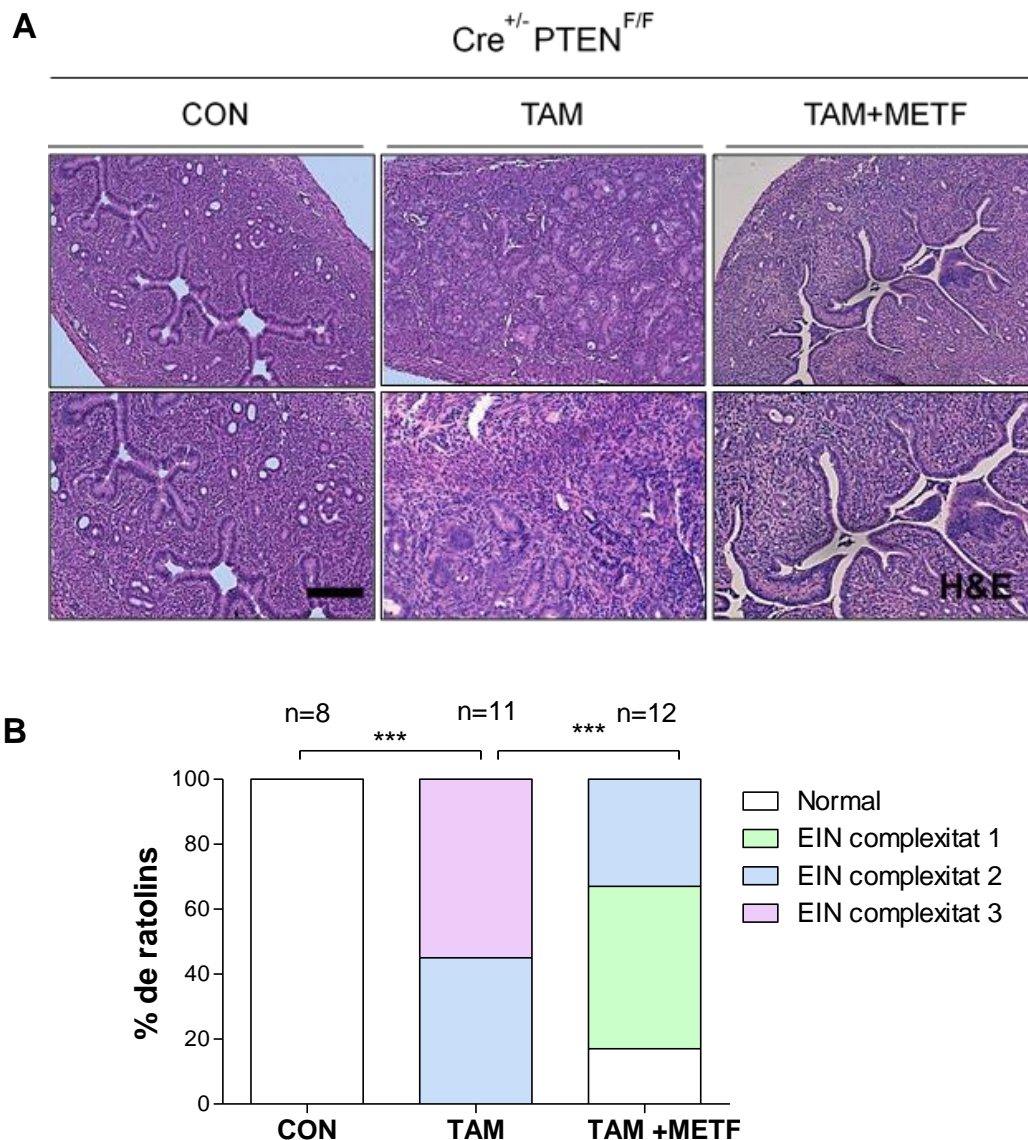


Figura 35. El tractament amb Metformina *in vivo* redueix les neoplàsies d'endometri causades per la pèrdua de *Pten* en ratolí. A. H&E de teixits d'endometri representatius de ratolí després d'injecció amb *Corn Oil* (CON), Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 4 setmanes (TAM+METF). Escala: 100 μ M. **B.** Gràfica de percentatges de ratolins amb diferents graus de lesions tumorals d'endometri segons el grup de tractament (EIN: *Endometrial Intraepithelial Neoplasia*, n indica el nombre d'animals utilitzats). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el *fisher's exact test*. Els valors del gràfic són els percentatges de ratolins i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M.***P<0,001.

Aquesta reducció de les lesions endometrials es va correlacionar amb una disminució de l'expressió Ciclina D1, que vam observar a través d'una anàlisi immunohistoquímica (IHC). Això suggeria que la Metformina va provocar una reducció de la proliferació cel·lular a les cèl·lules epitelials endometrials amb deficiència de *Pten* (Fig. 36A).

La proliferació de l'endometri depèn molt de l'activitat estrogènica. Per tant, vam plantejar la hipòtesi que els efectes antiproliferatius de la Metformina podrien relacionar-se amb una reducció de l'expressió del receptor d'estrògens.

Tanmateix, una IHC dels endometris deficients en *Pten* de ratolins tractats amb Metformina no va mostrar cap reducció de l'expressió del receptor d'estrògens (RE) en comparació amb els ratolins no tractats (Fig. 36B).

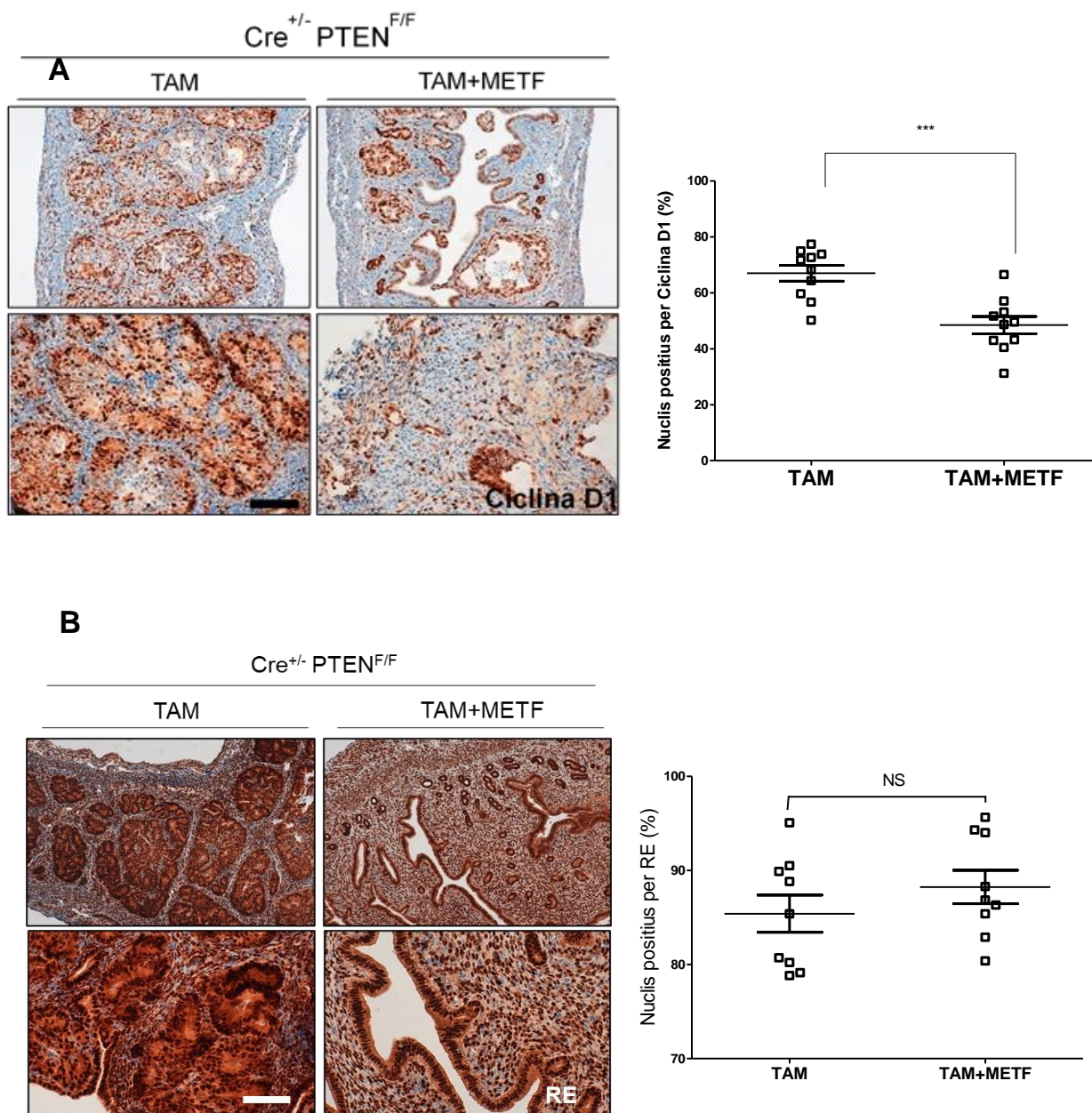


Figura 36. El tractament amb Metformina *in vivo* disminueix el marcador de proliferació cel·lular Ciclina D1 però no altera l'expressió de RE en l'endometri. A. IHC i quantificació de Ciclina D1 de teixits d'endometri representatius de ratolí després d'injecció amb Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 4 setmanes (TAM+METF). Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *student's t* test. **B.** IHC i quantificació de RE de teixits d'endometri representatius de ratolí sota les mateixes condicions. Es mostra com el patró de receptors d'estrògens es modifica per la diferència de teixit tumoral, però el % no s'altera significativament. Escala: 100 μ M. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *Student's t* test, NS: no significatiu.

Seguidament vam realitzar IHC de Citoqueratina 8 (CK8) –una queratina epitelial que es troba tant en endometri sa com tumoral- per veure el seu patró d'arquitectura en els endometris. Els endometris amb càncer mostren un patró de citoqueratina alterat respecte als endometris sans. El que vam observar va ser que el tractament amb Metformina restaurava aquest canvi de la distribució de la Citoqueratina 8, i els endometris tractats tenien un patró més semblant als endometris sans que als tumorals (Fig. 37).

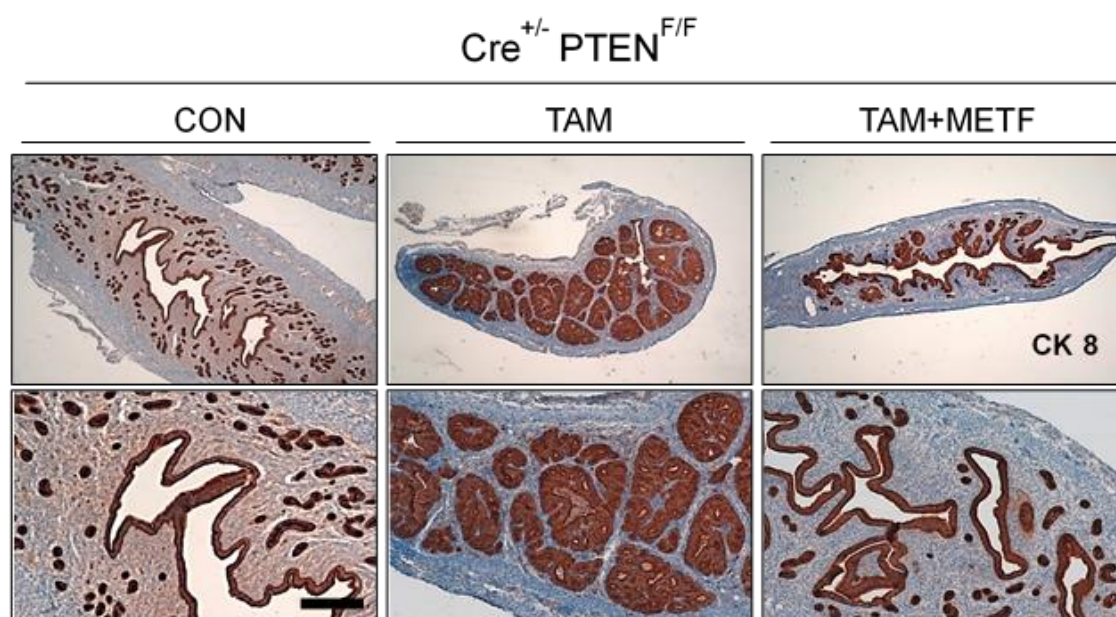


Figura 37. El tractament amb Metformina *in vivo* modifica el patró d'expressió de Citoqueratina 8 en teixit d'endometri. IHC de Citoqueratina 8 de teixits d'endometri representatius de ratolí dels 3 grups de tractament. Escala: 100 µM.

Prèviament ja havíem descrit amb el model d'organoides d'endometri que la Metformina redueix la fosforilació de p38. Així que vam voler comprovar si *in vivo* succeïa el mateix mitjançant una IHC de p-p38. En efecte, vam observar una disminució dels nivells de p-p38 en els endometris dels ratolins tractats amb Metformina (Fig. 38).

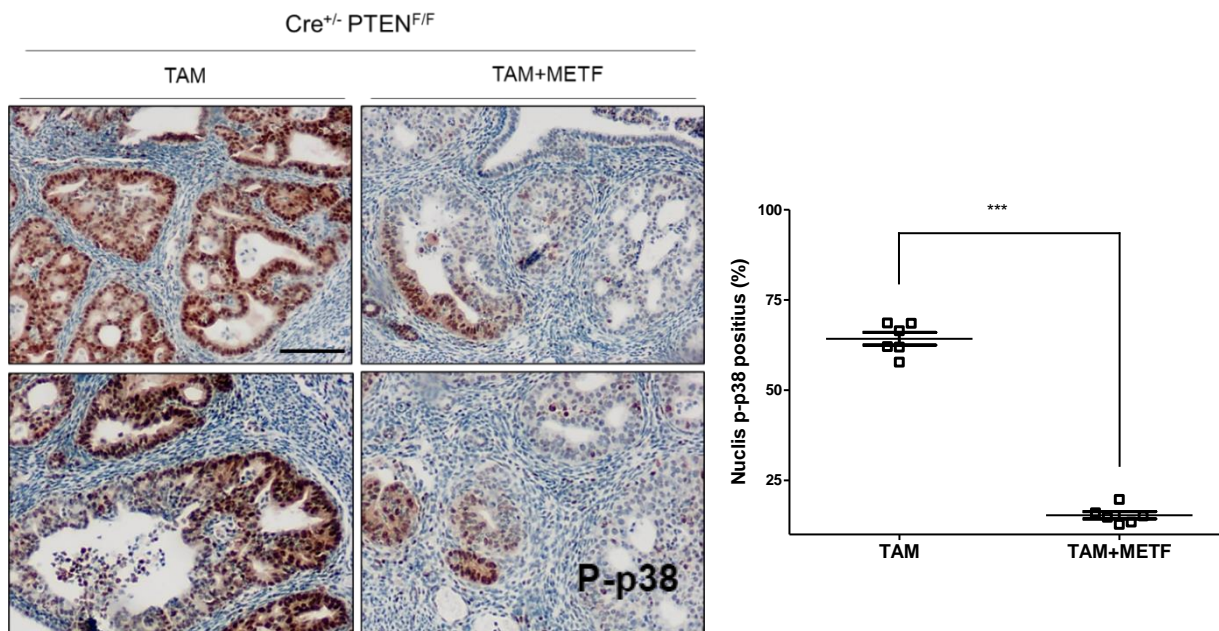


Figura 38. El tractament amb Metformina *in vivo* disminueix el marcador de proliferació cel·lular Ciclina D1 en teixit d'endometri. IHC i quantificació de p-p38 de teixits d'endometri representatius de ratolí després d'injecció amb Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 4 setmanes (TAM+METF). Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *** $P < 0,001$ per *student's t* test.

2.2.2. En tiroide

La pèrdua de *Pten* en tiroide de ratolí que deriva en el desenvolupament de neoplasia de tiroide produeix un augment de la via PI3K/AKT, l'adquisició un fenotip mesenquimal i es produeix un augment de proliferació cel·lular

Com ja hem comentat prèviament, els nostres ratolins CRE^{+/-} PTEN^{F/F} també generen neoplasia de tiroide (Fig. 39A). Aquestes neoplasies de tiroide desencadenades per la deleció de *Pten* pateixen un augment de la via PI3K/AKT, adquireixen un fenotip mesenquimal que s'aprecia amb l'augment de Vimentina i proliferen més (Fig. 39B).

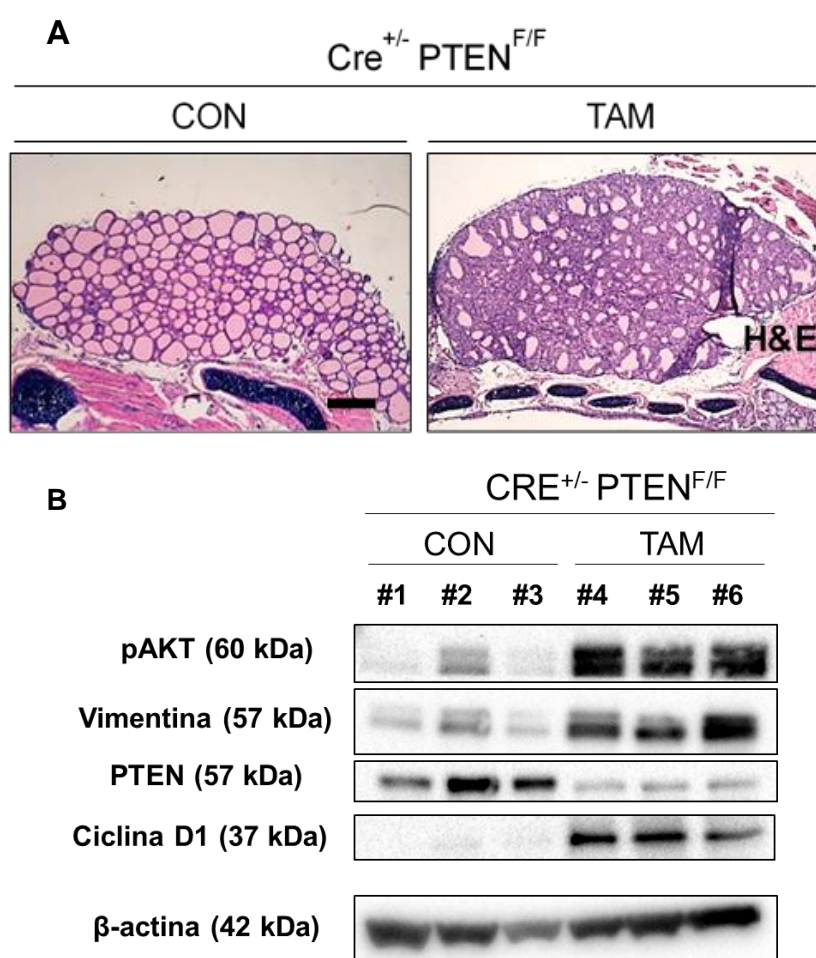


Figura 39. Les tiroïdes de ratolí amb deleció de PTEN que desencadenen neoplasies expressen un augment de pAKT, Vimentina i Ciclina D1. **A.** H&E de teixits de tiroïdes representatius de ratolí després d'injecció amb *Corn Oil* (CON) o Tamoxifè (TAM) després de 4 setmanes on es veu el teixit normal i tumoral respectivament. Escala: 100 µM. **B.** Western Blot de teixits de tiroïdes de 3 ratolins amb injecció de Corn Oil i de 3 ratolins amb injecció de TAM per tal de deleccionar *Pten*, que mostra l'estat de pAKT, Vimentina, PTEN i Ciclina D1. Els ratolins van estar 4 mesos des de la injecció fins el sacrifici.

La Metformina redueix el desenvolupament de neoplasia de tiroide provocada per la pèrdua de *Pten in vivo*

Igual que amb l'estudi de la Metformina en el carcinoma d'endometri, vam voler analitzar aquest fàrmac en el desenvolupament de les hiperplàsies de tiroides amb aquest model de ratolí. De nou, vam formar 3 grups de tractament: animals control negatius després de la injecció de *Corn Oil* (CON), controls tumorals després de la injecció de Tamoxifè (TAM) i tumorals després de la injecció de Tamoxifè i tractats amb Metformina (TAM+METF) durant 4 setmanes.

El que vam observar va ser que els ratolins tractats amb Metformina presentaven una reducció en la mida de les tiroides. Posteriorment i mitjançant tincions d'H&E de les tiroides, vam observar que aquestes tiroides després del tractament amb Metformina presentaven una reversió del fenotip tumoral (Fig. 40A) i una reducció del pes de la tiroide (Fig. 40B).

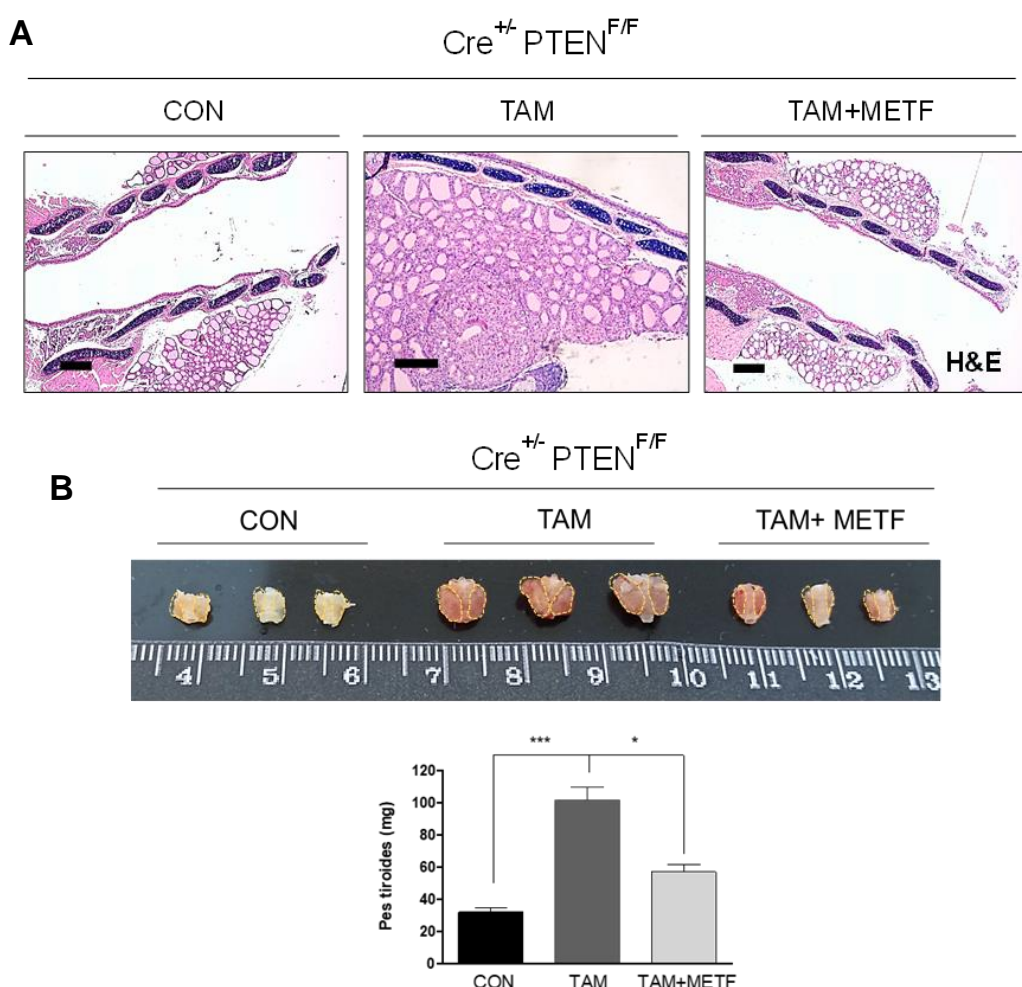


Figura 40. El tractament amb Metformina *in vivo* redueix la neoplasia de tiroide causada per la pèrdua de *PTEN* en ratolí. H&E de teixits de tiroides representatives de ratolí després d'injecció amb *Corn Oil* (CON), Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 4 setmanes (TAM+METF). Escala: 100 μ m. **B.** Imatges representatives i mitjana de pesos de tiroides dels 3 grups. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

Seguidament vam fer una IHC de Ciclina D1 per veure si la proliferació cel·lular es veia disminuïda en les tiroides tractades amb Metformina i, en efecte, hi havia una disminució significativa (Fig. 41).

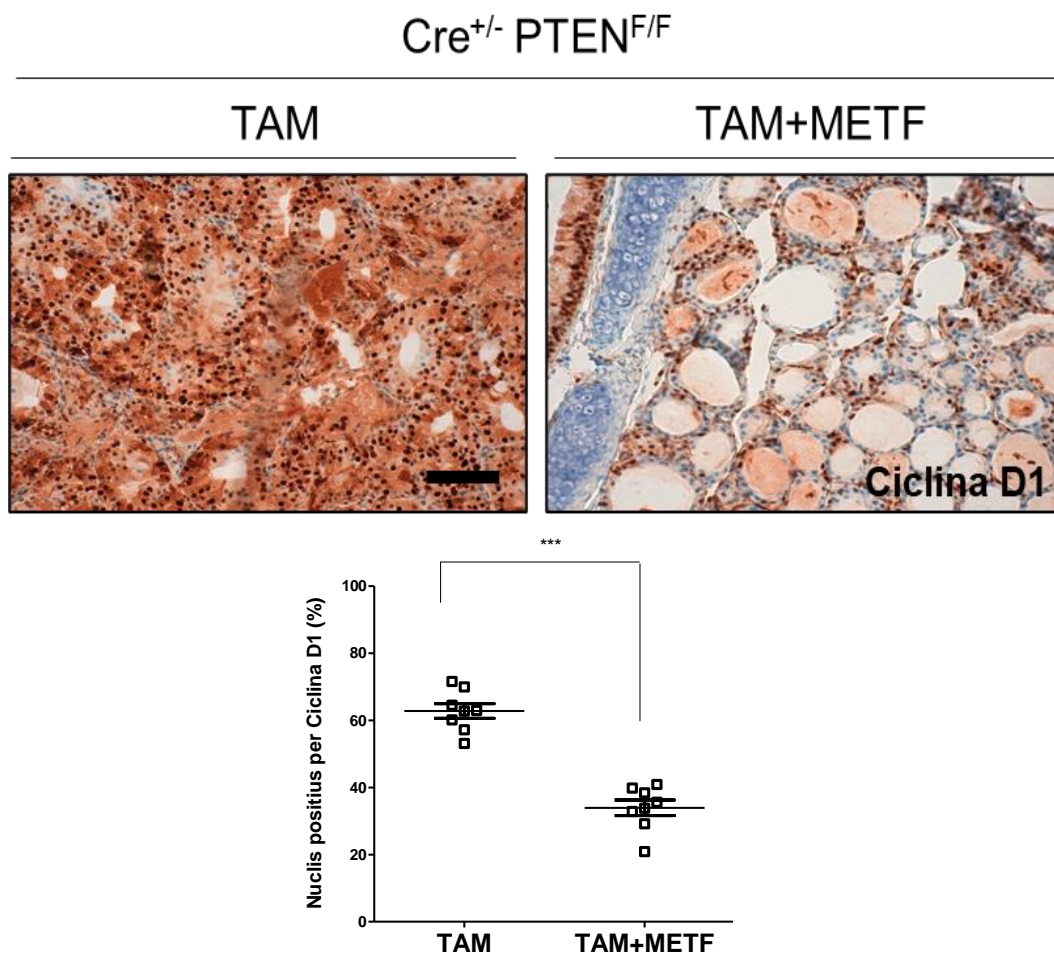


Figura 41. El tractament amb Metformina *in vivo* disminueix el marcador de proliferació cel·lular Ciclina D1 en teixit de tiroides. IHC i quantificació de Ciclina D1 de teixits de tiroides representatius de ratolí després d'injecció amb Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 5 setmanes (TAM+METF). Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ****P*<0,001 per *student's t* test.

2.2.3. En pròstata

La Metformina no modifica el desenvolupament de neoplàsies de pròstata provocades per la pèrdua de *Pten* *in vivo*

Conclòs el fet que la Metformina tenia efecte en el teixit d'endometri i de tiroide en la reducció del fenotip tumoral d'aquests teixits, vam voler estudiar la pròstata. De nou, vam utilitzar el model de ratolí $Cre^{+/-} PTEN^{F/F}$ i vam tractar els ratolins amb Metformina per veure si també aquesta podia interferir en el càncer de pròstata.

Contràriament a l'efecte que produïa la Metformina en els altres teixits, en les pròstates no es va apreciar cap efecte i, el que vam observar va ser que els ratolins injectats amb Tamoxifè per delecionar *Pten* i desenvolupar neoplàsia de pròstata i els injectats amb Tamoxifè i tractats amb Metformina, no presentaven diferències en el fenotip tumoral (Fig. 42A, B).

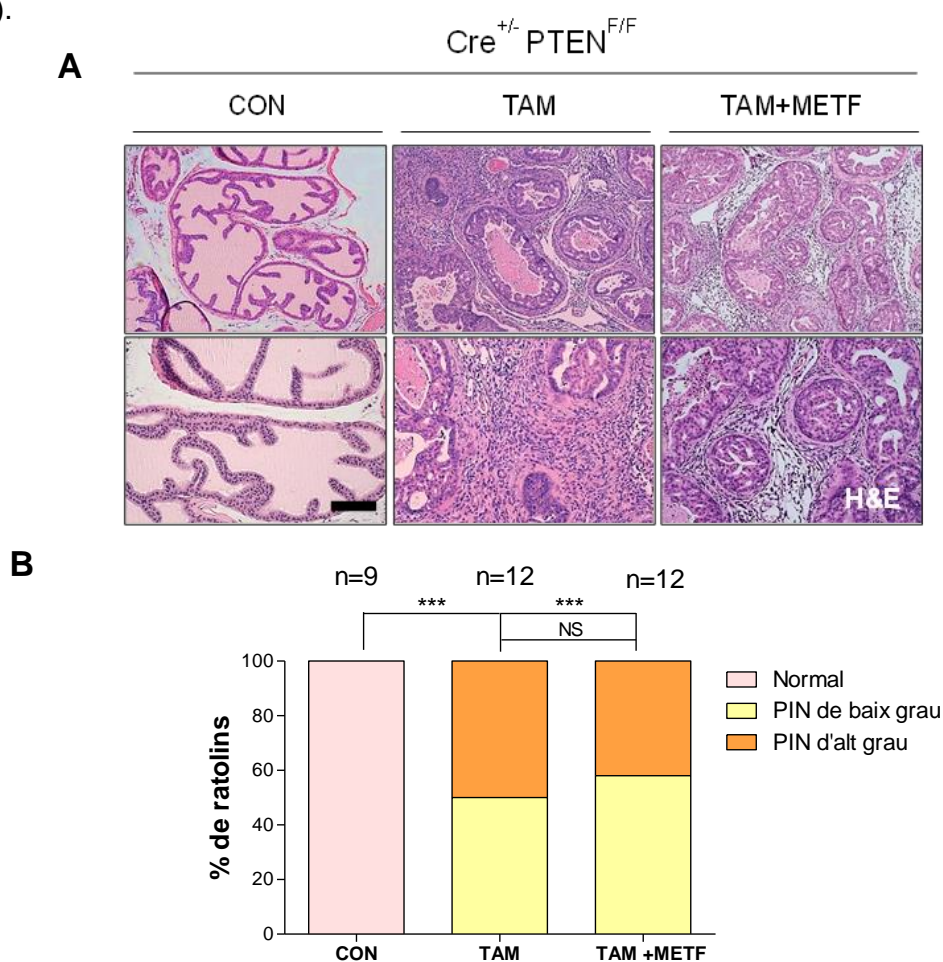


Figura 42. El tractament amb Metformina *in vivo* no altera les neoplàsies de pròstata causades per la pèrdua de PTEN en ratolí. A. H&E de teixits de pròstates de ratolí representatius després d'injecció amb *Corn Oil* (CON), Tamoxifè (TAM) o Tamoxifè més administració de Metformina durant 4 setmanes (TAM+METF). Escala: 100 μ M. **B.** Gràfica de percentatges de ratolins amb diferents graus de lesions tumorals de pròstata segons el grup de tractament (PIN: *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*, n indica el nombre d'animals utilitzats). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el *fisher's exact test*. Els valors del gràfic són els percentatges de ratolins i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. ***P<0,001. NS: no significatiu.

Tampoc s'apreciaven diferències de pes de les tiroides dels ratolins punxats amb Tamoxifè respecte als punxats amb Tamoxifè i tractats amb Metformina (Fig. 43).

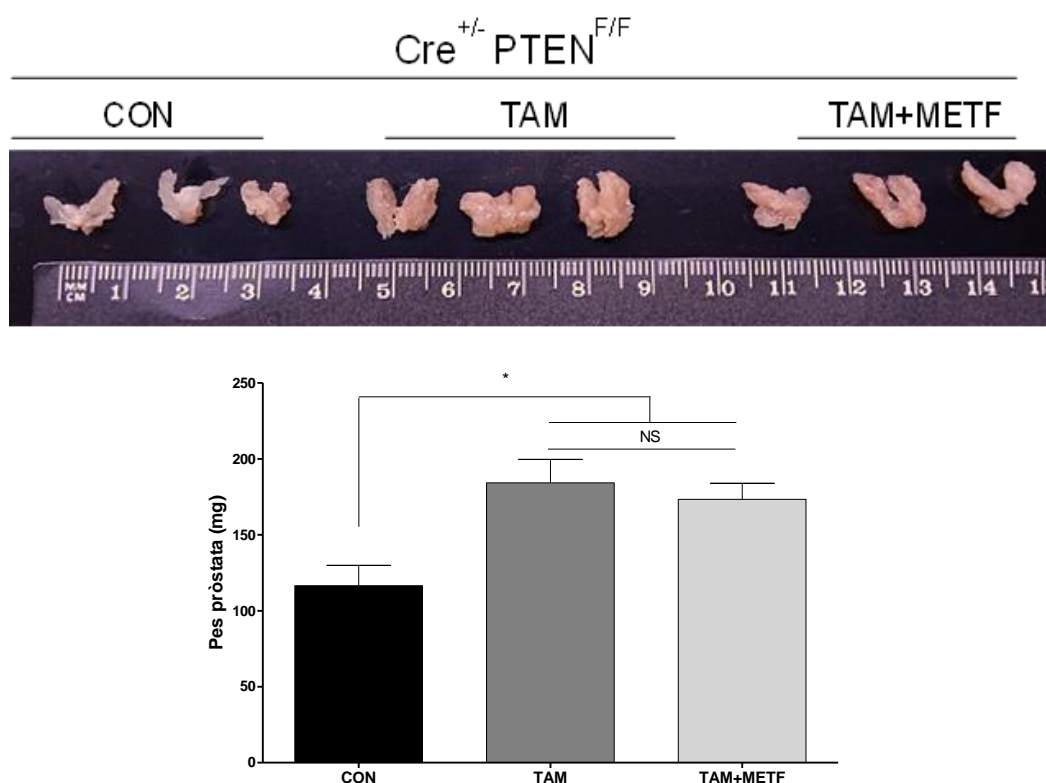
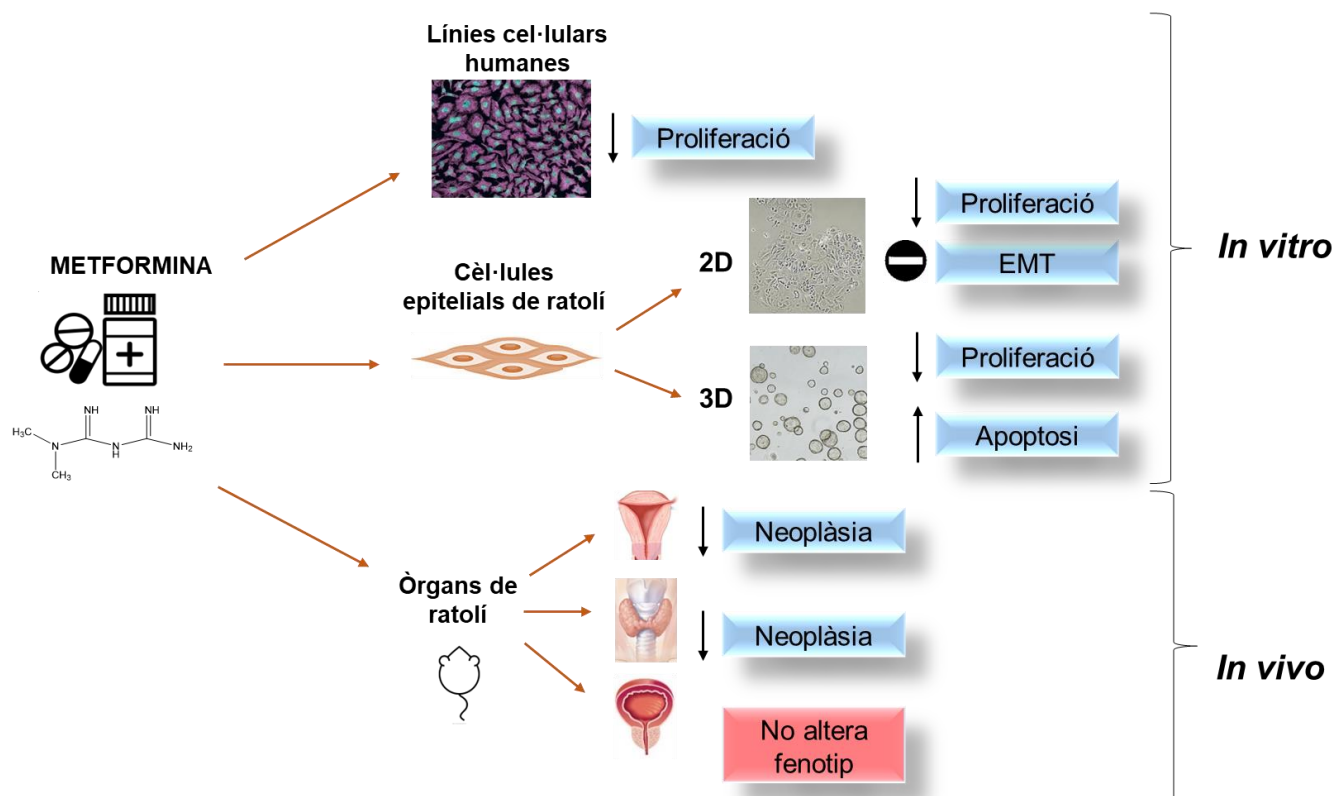


Figura 43. El tractament amb Metformina *in vivo* no altera els pesos de les pròstates amb neoplàsies causades per la pèrdua de *Pten* en ratolí. Imatges representatives i mitjana de pesos de pròstates dels 3 grups. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * $P < 0,05$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

Amb aquests resultats vam concloure que la Metformina no produïa diferències significatives en el desenvolupament de neoplàsies de pròstata en el nostre model animal CRE^{+/-} PTEN^{F/F}.

Resum gràfic del bloc 2:



Esquema 10: Acció de la Metformina en diferents contextos cel·lulars *in vitro* i *in vivo*. La Metformina *in vitro* a 20 mM redueix la proliferació en línies humanes d'endometri: ARK-1, HEC-1A, Ishikawa i MFE-296 i FTC-133 de tiroide. En cèl·lules epitelials d'endometri redueix la proliferació i inhibeix l'EMT desencadenada pel TGF-β en cultius 2D. En cultius 3D redueix la proliferació i rescata l'apoptosi induïda pel TGF-β en aquells cultius deficients en *Pten*. En cèl·lules epitelials de tiroide provoca l'apoptosi en cultius 3D. *In vivo* la Metformina a raó de 250 mg/Kg redueix les neoplàsies de ratolí d'endometri i tiroide induïdes per la pèrdua de *Pten*, però no modifica les neoplàsies de pròstata.

BLOC 3

3. ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DE SMAD2 I SMAD3 EN PROCESSOS TUMORALS INDUÏTS PER LA PÈRDUA DE *Pten*

La via canònica del TGF- β és la via SMAD2/3 i, nombrosos son els estudis que atribueixen funcions de supressió tumoral a aquesta via (Gao et al., 2017; Kriseman et al., 2019; Monsivais et al., 2019). La literatura és molt extensa quant al paper dicotòmic del TGF- β . Es coneix que el TGF- β actua de supressor tumoral en cèl·lules normals i pre-malignes però com de promotor tumoral en cèl·lules canceroses. Aquestes funcions contradictòries del TGF- β són causades per diferents contextos cel·lulars, incloent factors tant intracel·lulars com ambientals.

Prèviament al nostre grup vam descriure ja que tant la deficiència de *Smad3* com de *Pten* augmenta l'activació de l'eix PI3K/AKT i aquesta sobreactivació pot generar resistència a les funcions supressores tumorals del TGF- β en l'endometri, com seria per exemple la resistència a l'apoptosi (Eritja et al., 2017). Aquesta resistència a l'apoptosi per l'activació de PI3K/AKT també és avalada per altres estudis (Conery et al., 2004; K. Song et al., 2006).

Tant en carcinoma d'endometri com en carcinoma de pròstata, s'ha descrit que tant alteracions de la via PI3K/AKT com del TGF- β /Smads poden estar implicades en el desenvolupament d'aquestes neoplàsies (Gao et al., 2017; Kriseman et al., 2019; Monsivais et al., 2019; Qin et al., 2016; Williams et al., 1996). Amb aquestes premisses, vam voler aprofundir en la caracterització de la via TGF- β /Smads en models de càncer a través del model de ratolí PTEN KO que desencadena càncer d'endometri i càncer de pròstata.

Per això, vam utilitzar model animal CRE^{+/-} PTEN^{F/F}, CRE^{+/-} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F} i finalment CRE^{+/-} PTEN^{F/F} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F}, tots ells induïbles per Tamoxifè. A partir d'ara els anomenarem **PTEN KO**, **SMAD2/3 KO** i **tKO** respectivament.

3.1. Estudi *in vitro* de la implicació de SMAD2 i SMAD3 en cèl·lules d'endometri

Primerament, vam estudiar *in vitro* les cèl·lules epitelials endometrials d'aquests tres models de ratolí per tal d'estudiar la via TGF- β /Smads en un context deficient per *Pten*.

La deficiència de *Pten* comporta la localització nuclear de SMAD2/3

Primerament vam voler detectar i localitzar on es troben les proteïnes SMAD2/3 en el model de PTEN KO. Per això vam cultivar les cèl·lules epitelials endometrials en 3D per tal de generar els organoides i vam realitzar immunofluorescències de SMAD2, SMAD3 i SMAD2/3. El que vam veure va ser que mentre que en els organoides *wt* SMAD2/3 es troba en el citoplasma, quan es deletiona *Pten*, SMAD2/3 transloca a nucli (Fig. 44).

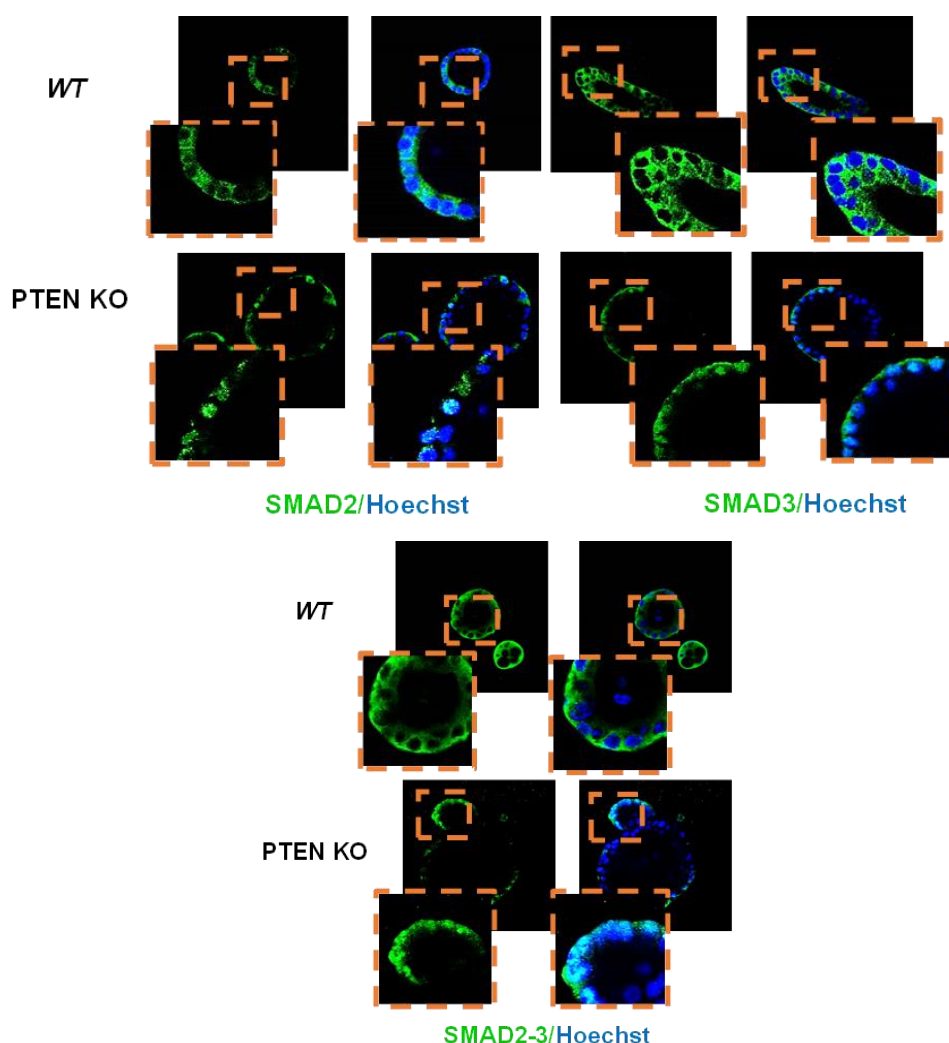


Figura 44. La deficiència de *Pten* en organoides de cèl·lules epitelials endometrials comporta la localització nuclear de SMAD2/3. Immunofluorescència de SMAD2, SMAD3 i SMAD2/3 de cèl·lules epitelials d'endometri *wt* i PTEN KO en 3D. Els cultius van ser contratenyits amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M.

La deficiència de *Smad2/3* aporta augment de la proliferació i resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β en cèl·lules d'endometri deficients en *Pten*

Amb aquesta informació vam voler estudiar la funció de SMAD2/3 en els models deficients per *Pten*. Per això, vam analitzar la triple deleció de *Smad2/3/Pten* (tKO) en cèl·lules d'endometri que després vam cultivar en 3D per obtenir els organoides.

Les cèl·lules tKO van resultar tenir una major proliferació cel·lular i major mida dels organoides endometrials en comparació amb les que sí expressaven *Pten* (Fig. 45), suggerint que la translocació nuclear de SMAD2/3 limita la tumorigènesi induïda per la deficiència de *Pten*.

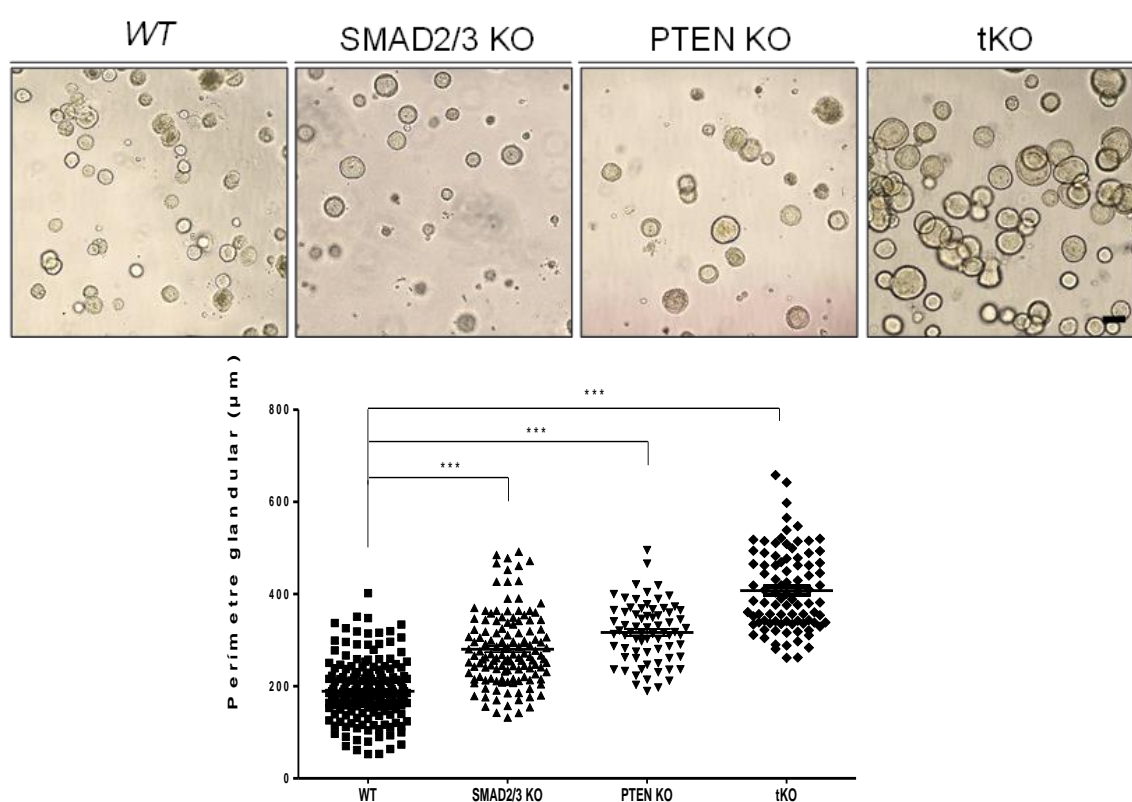


Figura 45. La deficiència de *Smad2/3* i *Pten* desencadena un augment de la proliferació dels organoides formats per cèl·lules epitelials endometrials de ratolí. Imatges de microscopi de contrast de fases de cultius de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolins *wt*, SMAD2/3 KO, PTEN KO i tKO en 3D i quantificació del perímetre glandular. Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*.

A més a més vam observar que tant les cèl·lules SMAD2/3 KO com les tKO mostraven una resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β (Fig. 46), com ja havíem vist amb l'ablació única de *Pten* o *Smad3*.(Eritja et al., 2017).

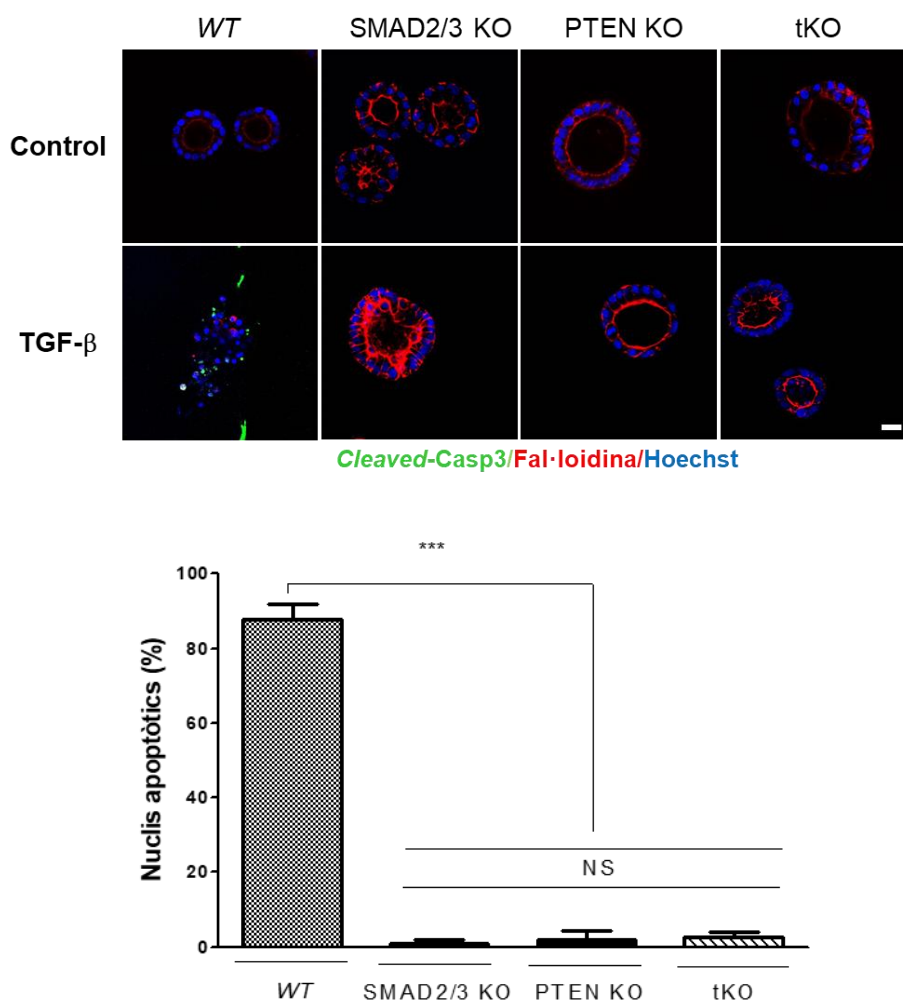


Figura 46. La pèrdua de *Smad2/3* i *Pten* produeix una resistència a l'apoptòsis induïda pel TGF- β en organoides formats per cèl·lules epitelials endometrials de ratolí. Immunofluorescència de *Cleaved-casp3* i quantificació de cèl·lules epitelials d'endometri dels 4 genotips en 3D tractats amb TGF- β durant 48h. Els cultius van ser contratenyits amb Fal·loidina per visualitzar el citoesquelet i amb Hoechst per visualitzar el nucli. Escala: 100 μ M. Les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. *** P <0,001 per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS, no significatiu.

Tot això ens suggeria que la translocació a nucli de SMAD2/3 induït per la pèrdua de *Pten* podia ser un mecanisme de supressió tumoral generat per un context de tumorigènesi.

3.2. Estudi *in vivo* de la implicació de SMAD2 i SMAD3 en endometri i pròstata

3.2.1. En endometri

La deficiència de *Smad2/3* en el model de ratolí no comporta l'aparició de neoplàsies d'endometri

A continuació vam voler estudiar la implicació de SMAD2/3 en el model de ratolí *in vivo* deficient per *Pten*. Vam utilitzar novament els ratolins anomenats ja, que són tractats amb una injecció única de Tamoxifè i els controls amb una de *Corn Oil*, que tractarem com a *wt*.

Amb la hipòtesi inicial en ment que SMAD2/3 té funcions de supressor tumoral a l'endometri, vam mirar si la deleció de SMAD2/3 podia derivar en l'aparició d'un fenotip tumoral en l'endometri. Així que vam punxar amb Tamoxifè (o *Corn Oil* pels controls) les femelles CRE^{+/-} SMAD2^{F/F} SMAD3^{F/F} i aproximadament al cap de 5 setmanes les vam sacrificar. Vam extreure els endometris i, mitjançant proves d'H&E vam observar i concloure que no s'observaven diferències en el fenotip (Fig. 47). També vam realitzar proves d'IHC de Ciclina D1 per veure la proliferació cel·lular i ens va donar informació en línia al punt anterior; no hi havia canvis entre els grups ratolí *wt* i els SMAD2/3 KO (Fig. 48).

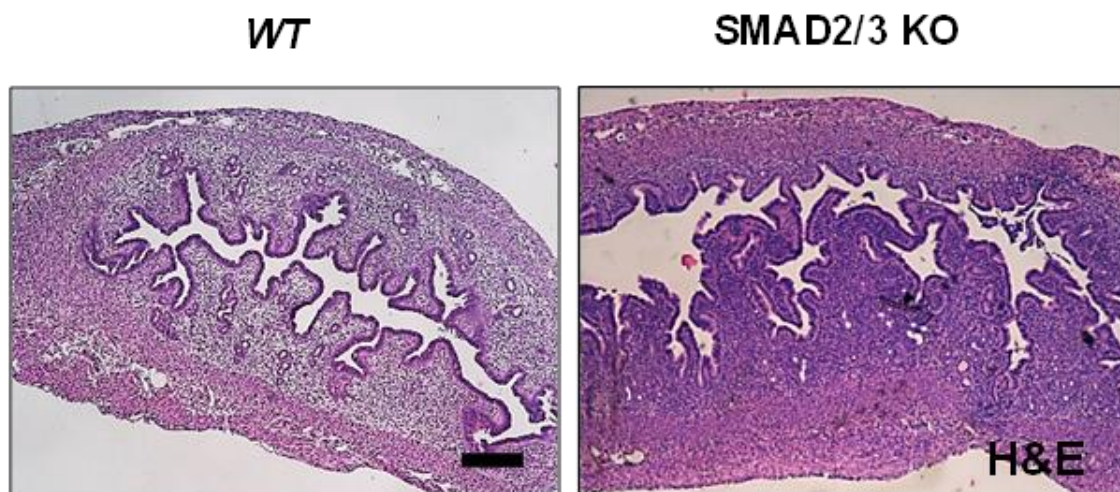


Figura 47. La deficiència de *Smad2/3* *in vivo* no comporta l'aparició de neoplàsies d'endometri en el model de ratolí. H&E de teixits d'endometri de ratolí representatius de *wt* i SMAD2/3 KO. Escala: 100 µM.

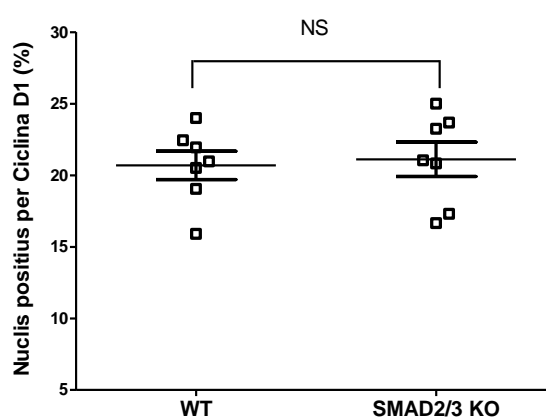
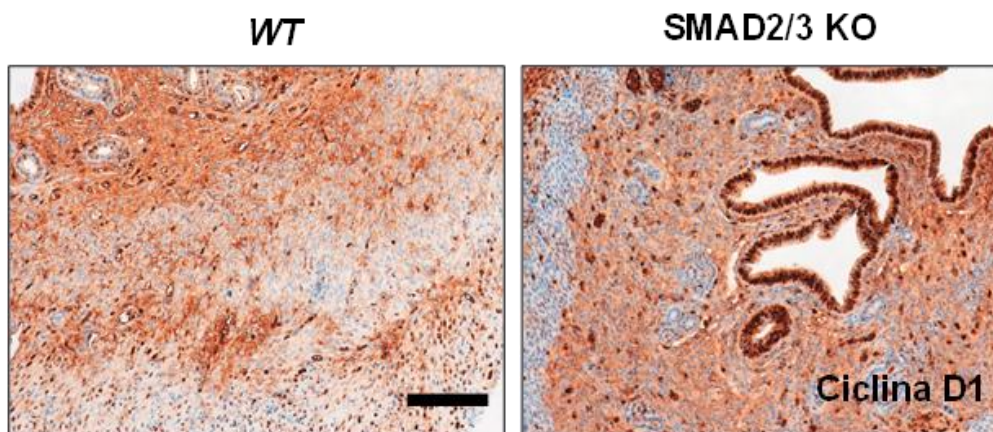


Figura 48. La deficiència de *Smad2/3 in vivo* no produeix canvis en la ciclina D1 en el teixit d'endometri. IHC i quantificació en endometri *wt* i SMAD2/3 KO de Ciclina D1 Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *Student's t* test, NS: no significatiu.

La deficiència de *Smad2/3* en el model de ratolí deficient per *Pten* no genera canvis en el fenotip tumoral d'endometri

Posteriorment vam realitzar el mateix procediment que el punt anterior, però comparant femelles deficientes PTEN KO i tKO. El que vam concloure és que no s'aprecien diferències en la generació de carcinomes d'endometri entre els ratolins amb pèrdua de *Pten* i pèrdua de *Smad2/3/Pten* (Fig. 49A). La IHC de Ciclina D1 tampoc va mostrar un increment en la proliferació cel·lular (Fig. 49B).

Les proporcions dels diferents graus de lesions en l'endometri dels ratolins van confirmar que la deleció de *Smad2/3* no genera un fenotip tumoral més agressiu al generat per la deleció de *Pten* (Fig. 49C).

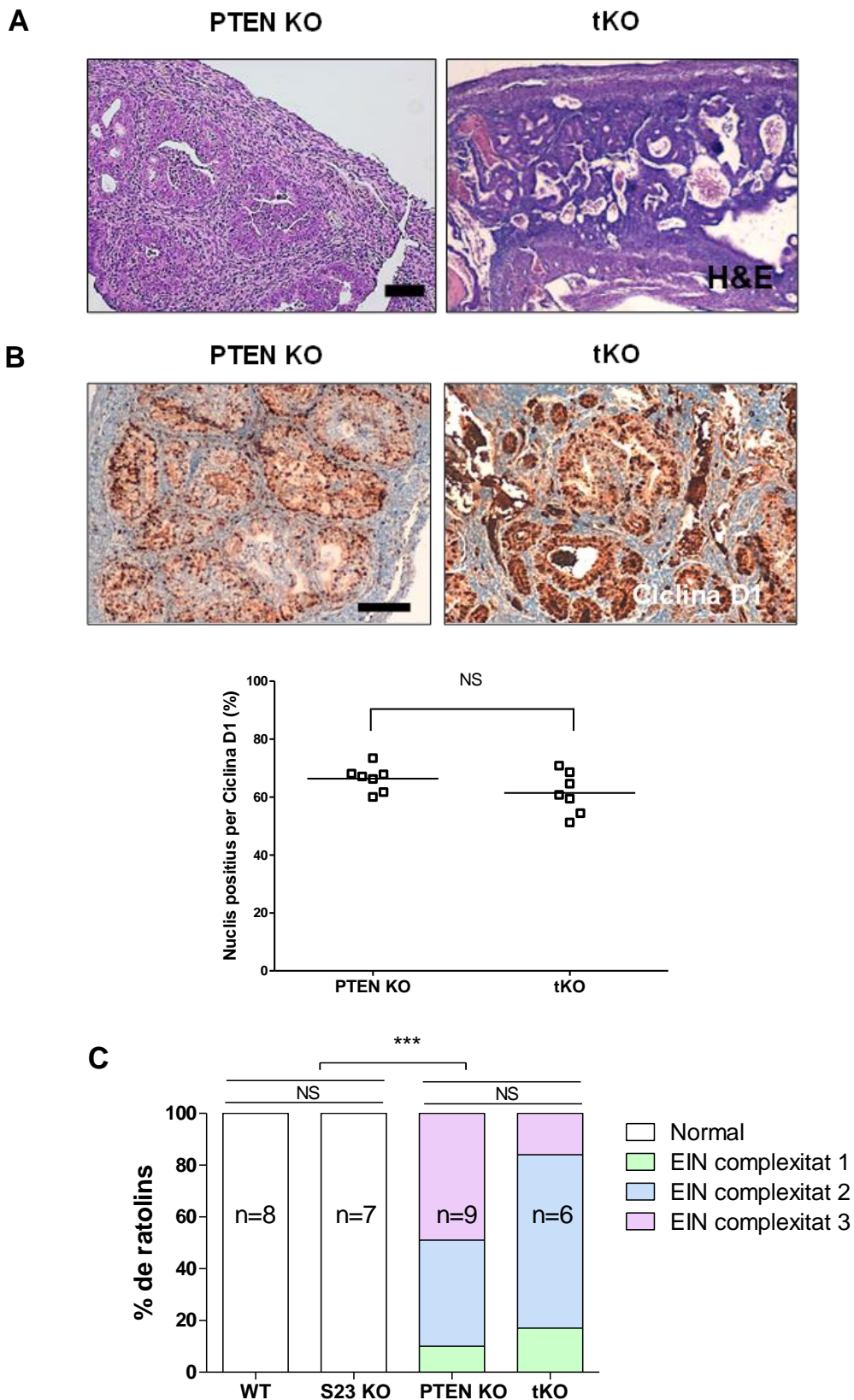


Figura 49. La pèrdua de *Smad2/3 in vivo* no altera el fenotip de teixit normal d'endometri ni aporta més agressivitat en en el model de pèrdua de *Pten*. **A.** H&E de teixits d'endometri de ratolí representatius de PTEN KO i SMAD2/3/PTEN KO (tKO). **B.** IHC i quantificació de Ciclina D1 dels genotips esmenats. Escala: 100 µM. Les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. *Student's t* test, NS: no significatiu. **C.** Gràfica de percentatges de ratolins amb diferents graus de lesions tumorals d'endometri segons el genotip (EIN: *Endometrial Intraepithelial Neoplasia*, n indica el nombre d'animals utilitzats). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el *fisher's exact test*. Els valors del gràfic són els percentatges de ratolins i les barres d'error representen la mitjana ± S.E.M. ***P<0,001. NS: no significatiu.

3.2.2. En pròstata

La pèrdua de *Pten* en ratolí desencadena carcinomes de pròstata *in situ* amb un augment de pAKT, la via de les SMADs, Vimentina i Ciclina D1

Finalment ens vam centrar en la pròstata per a l'estudi de SMAD2/3. Primerament i seguint la línia de l'endometri, vam voler analitzar SMAD2/3 en el model de pròstata deficient en *Pten*. Per això vam extreure les pròstates de ratolins mascles CRE^{+/-} PTEN^{F/F} 5 setmanes després de la injecció amb Tamoxifè (TAM) o *Corn Oil* (CON). Una part la vam utilitzar per analitzar les biòpsies mitjançant tinció d'H&E (Fig. 50A) i l'altra per Western Blot (Fig. 50B). Tal i com es veu a la figura següent, la pèrdua de *Pten* implica l'augment de pAKT, de SMAD2, SMAD3 així com la seva fosforilació, i un fenotip més mesenquimal que s'aprecia a través d'un augment de Vimentina, així com un augment de proliferació mitjançant augment de Ciclina D1.

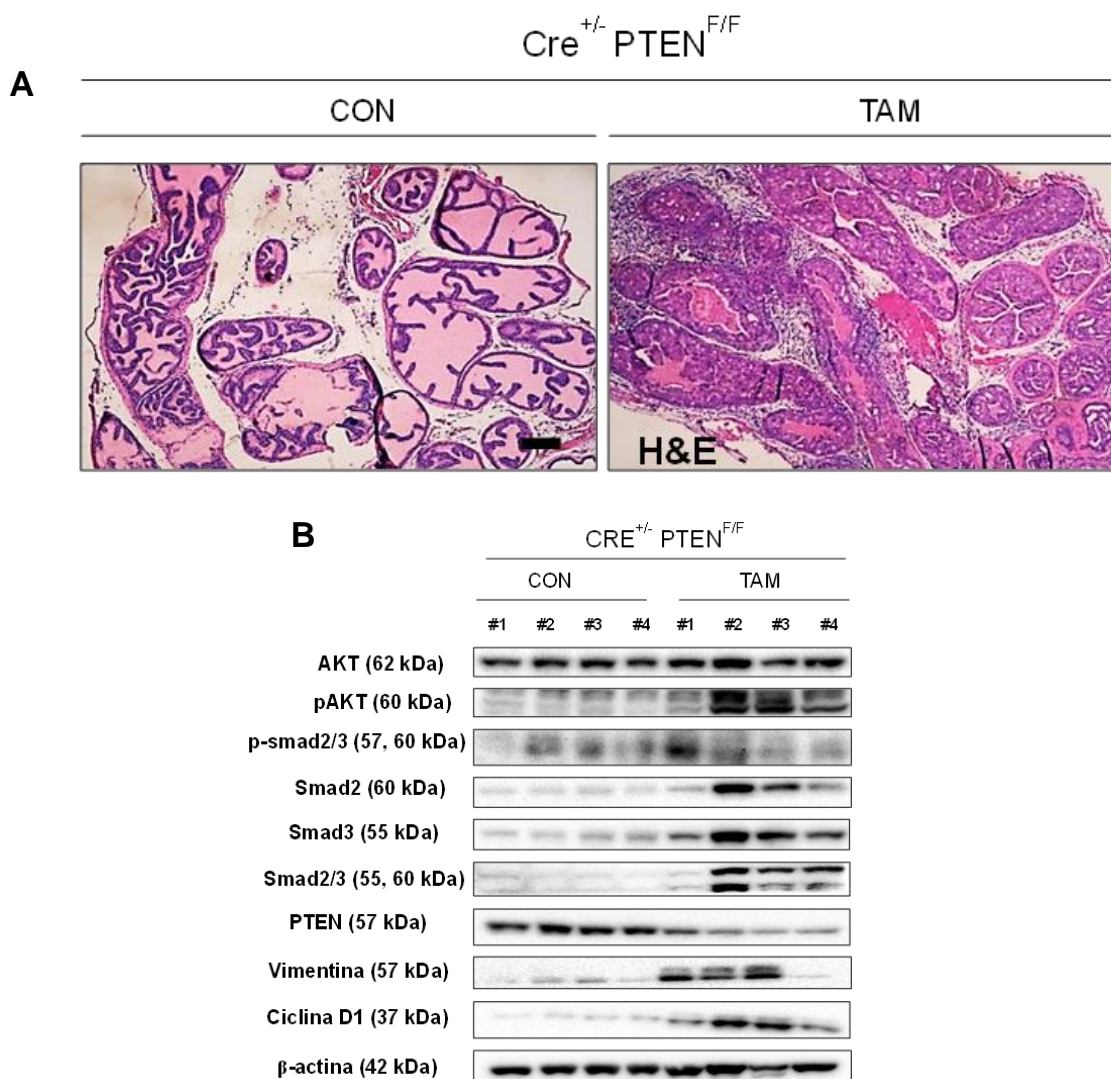


Figura 50. Les pròstates de ratolí amb deleció de *Pten* que desencadenen carcinomes *in situ* expressen un augment de pAKT, Smad2/3, Vimentina i Ciclina D1. A. H&E de teixits representatius de pròstata de ratolí CRE^{+/-} PTEN^{F/F} després de 5 setmanes de la injecció de Corn Oil (CON) o tamoxifè (TAM) on es veu el teixit normal i tumoral respectivament. Escala: 100 μm **B.** Western Blot de 4 ratolins després de 5 setmanes de la injecció de CON i 4 ratolins després de la de TAM. Es mostra l'estat de les vies de senyalització.

La deficiència de *Pten* comporta la localització nuclear de SMAD2/3 en teixit de pròstata de ratolí

Seguidament vam mirar per IHC l'estat de les proteïnes PTEN i de SMAD2/3 en les pròstates *wt* i PTEN KO, el que vam observar va ser que SMAD2/3 es trobava augmentada i a nucli en les pròstates PTEN KO i que PTEN es deleccionava correctament en l'epiteli (Fig. 51).

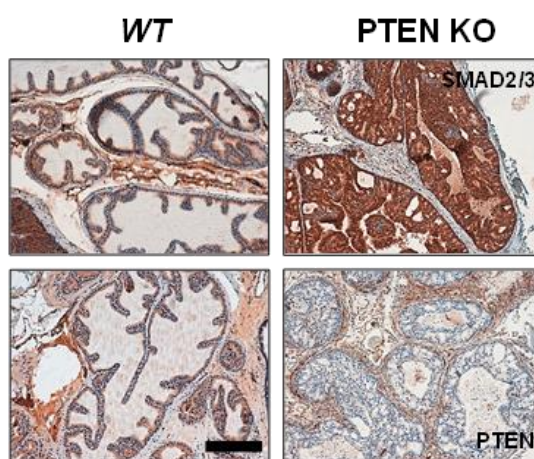
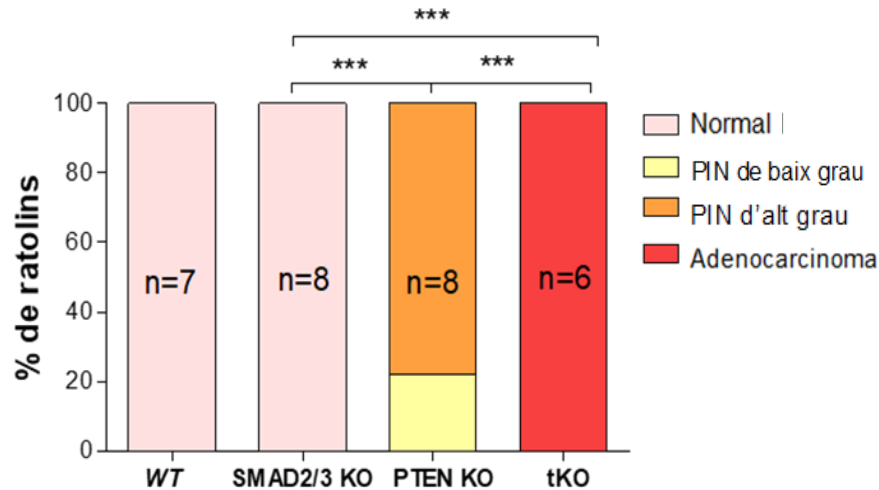
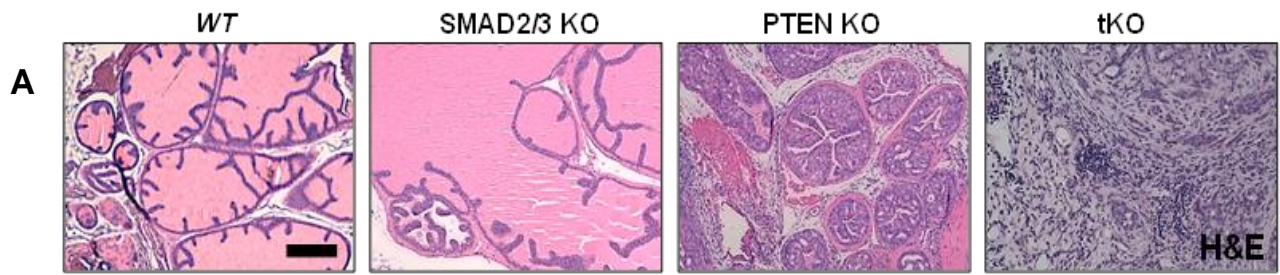


Figura 51. La pèrdua de *Pten in vivo* produeix una translocació a nucli de SMAD2/3 en teixit de pròstata. IHC de SMAD2/3 i PTEN de teixits de pròstata de ratolí representatius de ratolí *WT* i PTEN KO. Escala: 100 µM.

La deficiència de *Smad2/3* en el model de ratolí deficient per *Pten* comporta el desenvolupament de neoplàsies de pròstata invasives respecte al model de deleció de *Pten* única

A continuació vam voler estudiar la implicació de SMAD2/3 en el model de ratolí *in vivo* PTEN KO i vam obtenir resultats sorprenents: mentre que els ratolins SMAD2/3 KO no van generar carcinomes de pròstata i els PTEN KO van generar carcinomes de pròstata *in situ*, és a dir, que no s'estenia fora de l'òrgan, els ratolins tKO van generar adenocarcinomes invasius, és a dir, carcinomes que ja envaeixen l'estroma i les glàndules adjacents (Fig. 52A). Mentre que totes les pròstates de ratolí *wt* i SMAD2/3 KO presentaven teixit normal, el 75% dels ratolins PTEN KO mostraven PIN d'alt grau i el 25% de baix grau. Els 100% dels tKO van mostrar adenocarcinomes invasius (Fig. 52A). Respecte als pesos de les pròstates, mentre que les pròstates de ratolins SMAD2/3 KO tenen uns pesos similars a aquelles de ratolins *wt*, les de PTEN KO tenen significativament un pes superior, i les dels tKO encara més (Fig. 52B).



B

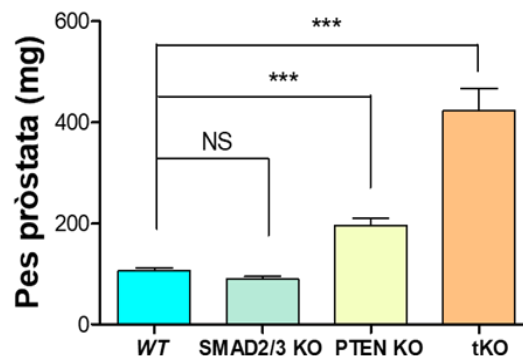


Figura 52. La pèrdua de *Smad2/3* conjuntament amb *Pten* *in vivo* desencadena carcinomes de pròstata invasius respecte als la pèrdua de *Pten* sola que desencadena carcinomes de pròstata *in situ*. **A.** H&E de teixits de pròstates de ratolí representatius dels 4 grups i gràfica de percentatges de ratolins amb diferents graus de lesions tumorals de pròstata segons el genotip (PIN: *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*, n indica el nombre d'animals utilitzats). Escala: 100 μ M. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el *fisher's exact test*. Els valors del gràfic són els percentatges de ratolins i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. *** $P < 0,001$. **B.** Imatges representatives i mitjana de pesos de pròstates dels 4 grups després de 4 setmanes de la injecció de tamoxifè. Els valors són mitjanes i les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. *** $P < 0,001$ per *one-way ANOVA*, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu.

Finalment vam realitzar una sèrie d'IHC: primerament de Ciclina D1 per veure la proliferació cel·lular que tal i com es mostra es veu augmentada en els PTEN KO i més encara en els tKO (Fig. 53A).

Un cop avaluats per dos patòlegs diferents l'aparició d'invasió en els carcinomes de pròstata dels tKO, vam realitzar IHC d' α -racemasa, un marcador de carcinoma de pròstata (Fig. 53B). I finalment de Citoqueratina 8 per veure l'arquitectura dels tumors, i com aquesta última es perd en els tKO (Fig. 53C).

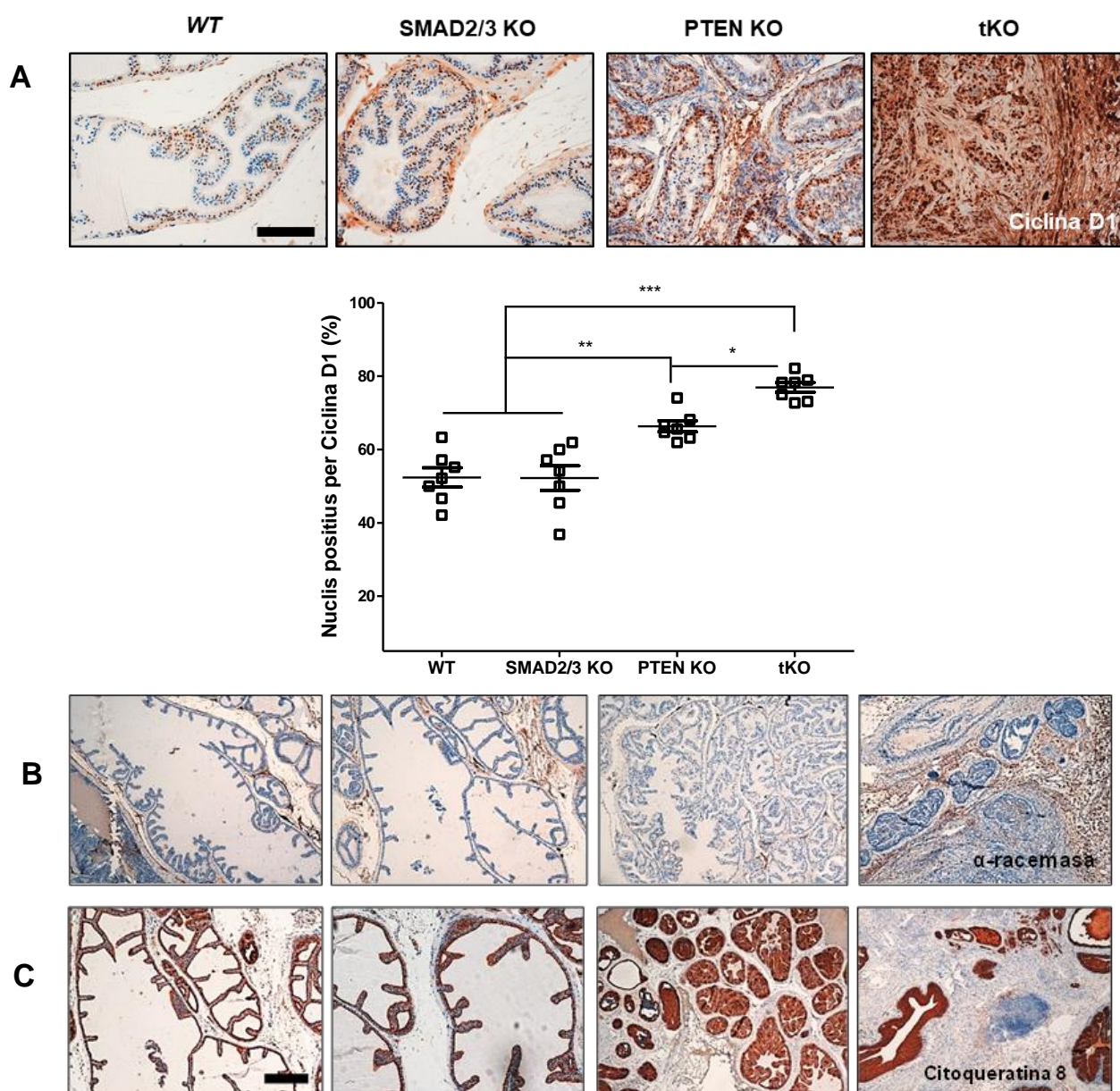
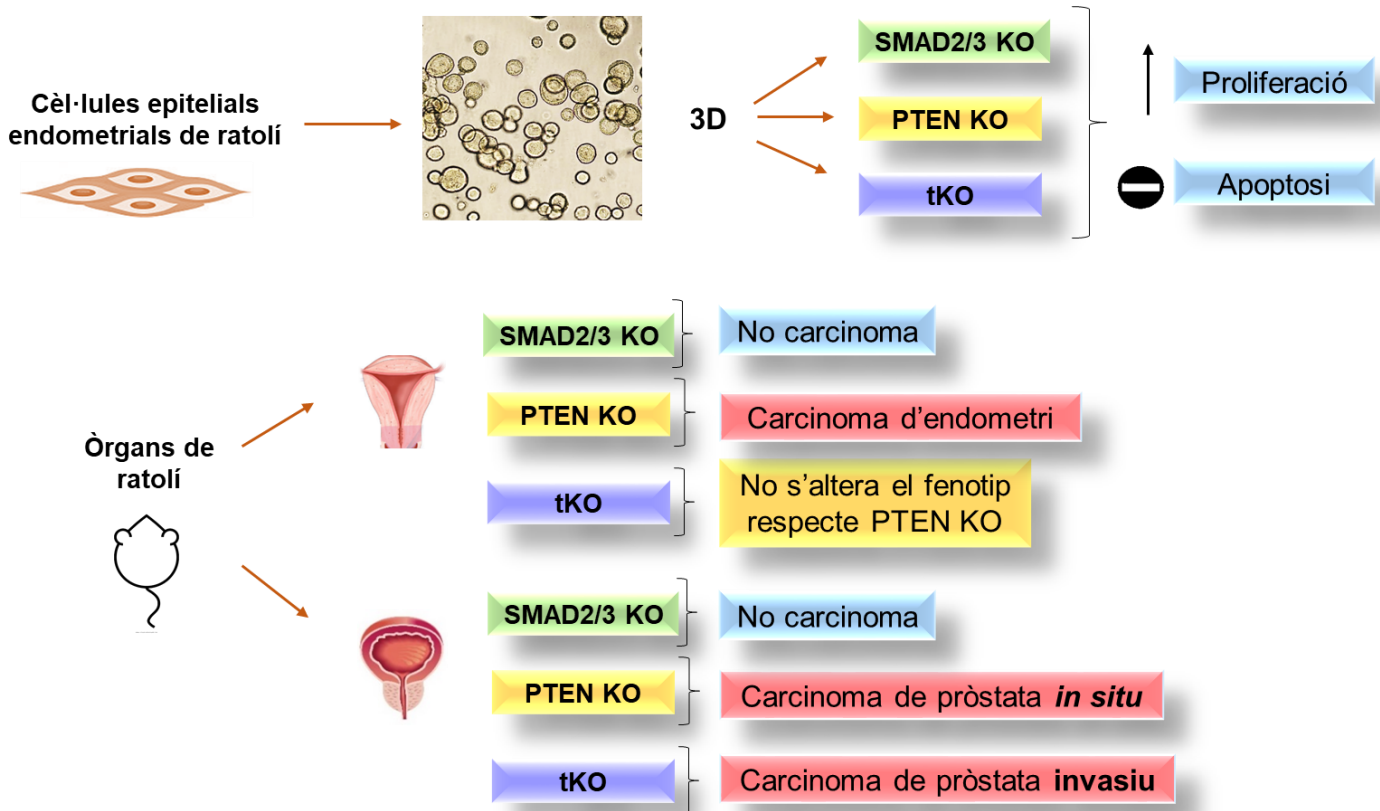


Figura 53. La pèrdua de *Smad2/3* conjuntament amb *Pten* *in vivo* produeix un augment de Ciclina D1 i α -racemasa i modifica el patró d'expressió de Citoqueratina 8 en teixit de pròstata. **A.** IHC i quantificació de Ciclina D1 de teixits de pròstata de ratolí representatius de *wt*, SMAD2/3 KO, PTEN KO i PTEN-SMAD2/3 KO (tKO). Les barres d'error representen la mitjana \pm S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ per *one-way* ANOVA, seguit pel test de comparació múltiple *Tukey*. NS: no significatiu. **B, C.** IHC d' α -racemasa i Citoqueratina 8. Escala: 100 μ m.

Resum gràfic del bloc 3:



Esquema 11: Caracterització de SMAD2/3 com a supressor tumoral en endometri i pròstata. La deleció de *Smad2/3*, *Pten* i *Smad2/3/Pten* (tKO) produeix un augment de la proliferació i una resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β en cultius 3D de cèl·lules epitelials endometrials. *In vivo* en endometri la deleció única de *Smad2/3* no genera carcinoma d'endometri i la triple deleció *Smad2/3/Pten* no altera el fenotip de carcinoma d'endometri que genera la deleció única de *Pten*. En pròstata en canvi, la deleció única de *Smad2/3* no desencadena carcinoma de pròstata, però la triple deleció *Smad2/3/Pten* genera carcinomes de pròstata *invasius* respecte la deleció única de *Pten* que genera carcinomes de pròstata *in situ*.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1. ESTUDI DE LA PÈRDUA DE POLARITAT EN CÈL·LULES EPITELIALS D'ENDOMETRI

El coneixement dels factors biològics que determinen les respostes cel·lulars després de l'estimulació amb el TGF- β és un tema complex. A l'úter, el TGF- β té un paper important en el seu desenvolupament, estructura i funció (Q. Li, 2014; Monsivais et al., 2017). Els models de ratolí modificats genèticament que alberguen alteracions en els elements de senyalització del TGF- β han donat suport al paper del TGF- β en la fisiologia i la patologia uterina. La supressió condicional del receptor T β RI a l'úter condueix a defectes estructurals i funcionals en aquest òrgan (Q. Li et al., 2011).

A més del seu paper en el desenvolupament uterí, la interrupció de la senyalització del TGF- β té un paper important en la carcinogènesi endometrial (Luo et al., 2021; Zakrzewski, 2021). Com en altres tumors malignes, el TGF- β pot tenir una doble funció en la progressió del càncer d'endometri, actuant com a supressor de tumors en les primeres etapes i com a promotor del tumor en etapes posteriors. El càncer d'endometri pot cursar amb una senyalització del TGF- β disfuncional (Piestrzeniewicz-Ulanska et al., 2004) donant lloc a la pèrdua de senyals inhibitoris de creixement (Parekh et al., 2002) i l'adquisició d'un fenotip invasor (Muinelo-Romay et al., 2011) que correlaciona amb un mal pronòstic (Mhaweck-Fauceglia et al., 2011). A més, s'ha demostrat que el TGF- β augmenta l'agressivitat de les línies cel·lulars de càncer d'endometri (Muinelo-Romay et al., 2011; Yabushita et al., 2000). El rol de la via TGF- β /SMAD en carcinogènesi endometrial també s'ha posat de manifest mitjançant la supressió condicional d'elements de l'eix de senyalització del TGF- β a través de la deleció de T β RI (Monsivais et al., 2019), doble deleció condicional de *Smad2* i *Smad3* (Kriseman et al., 2019) o deleció condicional de T β RI combinat amb la inactivació de *Pten* a l'endometri (Gao et al., 2017). Totes aquestes condicions donen lloc a càncer d'endometri metastàtic en ratolí. D'acord amb aquests resultats, anteriorment vam demostrar que l'eix de senyalització TGF- β /SMAD és un mecanisme de supressió tumoral en cèl·lules endometrials de ratolí (Eritja et al., 2017, 2021). Prèviament, en el nostre laboratori vam establir un mètode de cultiu en 3D per fer créixer cèl·lules epitelials endometrials com a organoides en presència de Matrigel® com a membrana extracel·lular artificial (Eritja et al., 2010). Basant-nos en aquest model, vam demostrar que el TGF- β indueix l'apoptosi en organoides endometrials 3D de ratolí, procés que és impedit per la deleció genètica de SMAD2 i SMAD3 (Eritja et al., 2017, 2021). En aquest treball demostrem que el cultiu de cèl·lules epitelials endometrials sense Matrigel® com a matriu extracel·lular (ECM) artificial condueix al creixement de

monocapes tradicionals 2D que conserven el fenotip epitelial, tal com indica la immunofluorescència de marcadors epitelials i mesenquimals. No obstant això, el tractament d'aquests cultius 2D amb el TGF- β indueix canvis semblants a l'EMT en lloc de la mort cel·lular apoptòtica observada en organoides 3D. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'organització epitelial 3D polaritzada podria actuar com a supressor de tumors no canònic que impedeix la manifestació de característiques neoplàstiques. La disrupció de l'estructura glandular, que cursa amb la pèrdua de polaritat apicobasal, és un segell distintiu càncers epitelials. Diverses proteïnes crucials de la polaritat cel·lular es consideren proto-oncogens o supressors de tumors, i els mecanismes bàsics de la polaritat cel·lular estan sovint involucrats en les vies de senyalització oncogènica (Lee & Vasioukhin, 2008). Entre tots aquests factors involucrats en l'establiment correcte de la polaritat cel·lular i l'organització glandular, l'ECM juga un paper essencial. S'ha demostrat que aquesta juga un paper clau en la carcinogènesi (Najafi et al., 2019) i la regulació de les funcions del TGF- β (Horiguchi et al., 2012). Els nostres resultats suggereixen que la disponibilitat d'ECM pot ser un determinant de la resposta cel·lular de les cèl·lules epitelials endometrials a l'exposició al TGF- β . En aquest sentit, també s'ha demostrat que l'ECM i la polaritat cel·lular regulen les respostes cel·lulars al TGF- β en línies cel·lulars de càncer d'endometri (Sahoo et al., 2017). Els nostres resultats sostenen la hipòtesi que l'organització epitelial 3D polaritzada actua com un supressor de tumors no canònic impedit la manifestació de característiques neoplàstiques com l'EMT. De fet, l'ECM es pot considerar com un dels determinants que converteix les funcions supressores de tumors del TGF- β en funcions promotores tumorals. Nosaltres hem aprofundit en els mecanismes implicats en el canvi de resultats cel·lulars mediat per la presència d'ECM després del tractament amb el TGF- β . Hem trobat que l'absència d'ECM augmenta la fosforilació AKT i ERK amb diferents conseqüències funcionals: l'augment de la fosforilació AKT condueix a la inhibició de l'apoptosi induïda pel TGF- β i l'augment de la fosforilació ERK a un procés d'EMT. L'eix PI3K/AKT té un paper crucial en la regulació de la supervivència i l'apoptosi de les cèl·lules endometrials i, per tant, en la carcinogènesi endometrial (Bell & Ellenson, 2019). De fet, resultats anteriors nostres van demostrar que l'augment en la senyalització PI3K/AKT causada per la pèrdua de *Pten* és suficient per conferir resistència a cèl·lules epitelials endometrials a l'apoptosi induïda pel TGF- β (Eritja et al., 2017). Per una altra banda, la senyalització ERK té un paper central en la regulació de l'EMT en molts tipus tumorals, incloses les cèl·lules epitelials endometrials (Mirantes, Espinosa, et al., 2013; Olea-Flores et al., 2019). En càncers d'endometri, resultats previs del nostre laboratori van demostrar que un augment en la senyalització d'ERK és degut a mutacions en BRAF que el fan constitutivament actiu (Montserrat et al., 2012). Malgrat que està acceptat de manera consensuada que l'ECM impacta en la senyalització intracel·lular (Hastings et al.,

2019), les seves implicacions funcionals encara són objecte de controvèrsia. Per una banda, l'activació intracel·lular de vies de senyalització per l'ECM com PI3K/AKT i RAS/ERK s'ha associat amb un augment en la supervivència cel·lular, proliferació i supressió d'*Anoikis* -apoptosi resultant de la pèrdua d'interaccions cèl·lula-matriu-. Per altra banda, l'adquisició de polaritat cel·lular degut a l'ECM actua com un mecanisme de supressió tumoral no-canònic (Lee & Vasioukhin, 2008). Els nostres descobriments demostren que la presència d'ECM i adquisició de polaritat cel·lular determina les respostes del TGF- β , però també pot ser important per la sensibilitat de certes drogues o agents anticancerígens. Per exemple, el desenvolupament de cultius 3D de línies humanes de càncer colorectal redueix la fosforilació d'ERK i AKT, i millora la sensibilitat de certes drogues anticancerígenes (Riedl et al., 2016). Els nostres resultats sostenen la hipòtesi que l'ECM pot funcionar com un supressor tumoral i que la seva absència dona lloc a la resistència a l'apoptosi i l'aparició d'EMT, ambdues característiques pròpies del fenotip tumoral.

Un altre concepte que mereix discussió és el rol de la senyalització SMAD en les respostes del TGF- β mediades per l'ECM. Els nostres resultats previs van demostrar que la pèrdua de *Smad2/3* impedeix completament l'apoptosi en organoides 3D d'endometri (Eritja et al., 2017, 2021). Amb això vam demostrar que la deleció de SMAD2/3 també influència en l'EMT induïda pel TGF- β en monocapes de cultiu cel·lular 2D. SMAD2/3 pot dur a terme diverses i contràries funcions al TGF- β en funció del context cel·lular (Massagué, 2012; Y. E. Zhang, 2018). Les SMADs interaccionen amb altres factors de transcripció que influencien en el programa transcripcional induït pel TGF- β . Aquestes interaccions SMADs-factors de transcripció són específiques de teixit i poden integrar senyals d'altres vies de senyalització, en conseqüència generant una gran versatilitat per part del TGF- β en el programa transcripcional que desencadena en una manera context dependent. Per una banda, els nostres resultats demostren que la pèrdua de SMAD2/3 produeix un augment en l'expressió de marcadors mesenquimals inclús sense l'estimulació per part del TGF- β . Per altra banda, la deficiència de *Smad2/3* bloqueja completament la disminució de l'expressió de marcadors epitelials, resultant en la coexistència de marcadors epitelials i mesenquimals. Aquest fenomen conegut com a EMT parcial o híbrida ha sigut objecte d'estudi per la seva implicació en les metàstasis i resistència a les teràpies antitumorals (Nieto et al., 2016; Pastushenko & Blanpain, 2019; J. Yang et al., 2020). D'acord amb això, la deficiència de SMAD2/3 augmenta la capacitat migratòria de les cèl·lules. Aquest fenotip d'EMT híbrida causada per la deficiència de SMAD2/3 ha estat suprimit per la inhibició en la senyalització d'ERK, indicant que ERK és necessari per a l'adquisició d'una EMT completa. A més a més, la fosforilació d'ERK ha estat augmentada en les cèl·lules deficients en SMAD2/3, suggerint que la pèrdua de

SMAD2/3 incrementa l'activitat d'ERK i, en conseqüència, l'increment de marcadors mesenquimals.

En resum, els nostres resultats demostren que l'ECM és un dels factors que participen en les respostes cel·lulars del TGF- β en cèl·lules d'endometri. Les interaccions adequades entre ECM-cèl·lula poden funcionar com un mecanisme de supressió tumoral no canònic, que pot col·laborar amb altres supressors tumorals tradicionals per tal de mantenir l'homeòstasi endometrial.

2. ESTUDI DELS EFECTES DEL FÀRMAC METFORMINA EN PROCESSOS TUMORALS

La Metformina és un antidiabètic oral de primera línia utilitzat àmpliament a escala mundial contra la Diabetis Mellitus II. A dia d'avui es disposa de nombrosos estudis retrospectius que han demostrat una associació significativa entre l'ús de Metformina i la prevenció a desenvolupar diversos càncers o la millora de la supervivència global en pacients ja diagnosticats de càncer d'endometri, pròstata o tiroide (Feng & Qin, 2021; Klubo-Gwiedzinska et al., 2013; Lemon et al., 2022; Nevadunsky et al., 2014; Nordström et al., 2015; Preston et al., 2014; H. Xu et al., 2015). El seu perfil de seguretat avalat pel seu consum des de fa dècades, així com els estudis que li confereixen propietats antitumorals, el converteixen en un fàrmac molt interessant des del punt de vista del reposicionament farmacèutic.

Tot i que la seva acció antineoplàsica està ben documentada, els mecanismes moleculars i cel·lulars de l'acció anticancerígena de la Metformina encara són controvertits i s'han descrit accions disperses entre diferents tipus de cèl·lules canceroses (Lord & Harris, 2023).

Com estem introduint, s'han estudiat mecanismes d'acció de la Metformina molt diversos (Triggle et al., 2022). La diana molecular de la Metformina més acceptada implicada en els seus efectes anticancerígens és l'AMPK, descrita en els tres càncers estudiats en aquesta tesi (Ahn et al., 2020; Cai et al., 2016; Morale et al., 2022; Vancura et al., 2018). En aquest context, els efectes de la Metformina es poden dividir en els dependents de l'activació d'AMPK i els independents. Els dependents d'AMPK impliquen la inhibició de mTOR; el major regulador del creixement cel·lular i de proliferació. Els independents d'AMPK contemplen la inhibició de ROS i la consegüent reducció del dany cel·lular, la regulació a la baixa de la Ciclina D1, important regulador del cicle cel·lular o l'augment de l'apoptosi de cèl·lules canceroses.

L'interval de dosi de Metformina que s'utilitza avui en dia en la pràctica clínica és de 500-2400 mg/dia. Això fa que al ser una dosi relativament alta, pugui tenir moltes dianes terapèutiques desconegudes que tinguin altres efectes a part del tractament de la

Diabetis Mellitus II. A més a més, els efectes beneficiosos de la Metformina poden ser indirectes, i derivar de les seves accions com a fàrmac antihiperglucemiànt, sensibilitzant a la insulina o reductor dels nivells de lípids, o resultar d'altres accions cel·lulars, inclosa la inhibició de mTOR.

Com ja hem explicat, avui en dia es disposa de molta informació relativa als diversos mecanismes d'acció de la Metformina. Un estudi va demostrar que la Metformina pot estar implicada en el microambient tumoral a través de la inhibició de la respiració oxidativa. En aquest estudi es va veure que la Metformina reduïa la hipòxia tumoral en pacients de càncer de cèrvix tractats amb quimioradioteràpia (K. Han et al., 2022). També s'ha vist que la Metformina pot fer sinergia amb teràpies anti-PDL1, ja que fosforila, glicosila i facilita degradació de PDL1 a través de l'activació d'AMPK (Cha et al., 2018). Així mateix, s'ha estudiat que la Metformina pot intervenir en la reprogramació metabòlica a través de la microbiota. Un estudi va demostrar que la transferència fecal de ratolins tractats amb Metformina a altres ratolins xenografts reduïa la mida del tumor d'aquests últims, sense alterar la mida del ratolí ni els nivells de glucosa o insulina (Broadfield et al., 2022). La Metformina també disposa d'estudis clínics, com un que va demostrar la potencial funció de la Metformina en la prevenció de la hiperplàsia d'endometri induïda per Tamoxifè (Davis et al., 2018).

Primerament ens centrem en el càncer d'endometri. Nosaltres hem estudiat els efectes de la Metformina en una primera aproximació en línies cel·lulars humanes de càncer d'endometri endometrioides (HEC-1A, Ishikawa, MFE-296) i no endometrioides (ARK-1, ARK2). Diferents estudis moleculars ja havien descrit l'efecte de la Metformina en cèl·lules humanes d'endometri (Qiang et al., 2019; Xue et al., 2019; Y. Zhao et al., 2018; J. Zou et al., 2016). Nosaltres el que primerament vam veure a través de les línies cel·lulars va ser una disminució de la proliferació en totes les línies a excepció d'ARK-2.

L'estat mutacional del CE així com el d'altres tumors malignes poden ser determinants en els resultats del tractament antineoplàsic, ja que les alteracions moleculars que condueixen a la sensibilitat als fàrmacs poden donar lloc a la manca de resistència (Crosbie et al., 2022). És per això que l'estudi de les alteracions moleculars individuals en relació a la sensibilitat/resistència als fàrmacs resulta essencial. Per això seguidament nosaltres vam investigar la Metformina en un model de ratolí de CE impulsat per la pèrdua de *Pten*, que és la mutació més freqüent en aquest tipus de càncer (Kong et al., 1997; Risinger et al., 1997; Tashiro et al., 1997).

Tot i que nombrosos estudis han abordat els efectes de la Metformina en el CE, les alteracions moleculars no s'ha abordat extensament. Fins ara, un únic estudi amb ratolins amb pèrdua heterozigota de *Pten* va demostrar la ineficàcia de la Metformina per prevenir la hiperplàsia endometrial i per modificar la fosforilació de la senyalització d'insulina com

AKT o ERK (Iglesias et al., 2017). En canvi, el nostre estudi demostra que el CE causat per l'ablació homozigota completa de *Pten* es redueix notablement per l'acció de la Metformina i, com s'esperava pel mecanisme d'acció molecular de la Metformina, s'inhibeix la fosforilació de mTOR i les seves dianes moleculars. Aquesta discrepància pot ser deguda de nou a diferències de model de ratolí i dosificació.

En la mateixa línia que els nostres resultats actuals amb el model animal, prèviament al nostre grup s'havia descrit que el tractament amb Everolimus, un fàrmac que com la Metformina, inhibeix mTOR, va provocar la reducció de la gravetat de les lesions endometrials del nostre model de ratolí, disminuint el percentatge de ratolins que patien adenocarcinoma d'endometri *in situ* del 100% al 25% (Mirantes, Eritja, et al., 2013). La resta d'endometris dels ratolins tractats amb Everolimus va ser normal (25%) o hiperplàsic (50%). A més a més, es va observar una reducció de Ki-67. Aquests resultats es correlacionen als obtinguts en aquesta tesi, amb una reducció de la gravetat de les lesions endometrials, i baixada en la proliferació cel·lular.

Un cop demostrats els efectes de la Metformina en CEs deficientes de *Pten*, vam investigar els mecanismes moleculars i cel·lulars de la seva acció antineoplàsica. La Metformina té uns mecanismes altament pleotròpics d'activitat anticancerígena i hi ha una manca d'un mecanisme d'acció molecular consensuat (M. Li et al., 2018; Schulten, 2018; B. Zhao et al., 2020). Així mateix, diversos processos com l'aturada del creixement cel·lular, la inducció de l'apoptosi i l'autofàgia o la inhibició de l'EMT es troben entre els mecanismes cel·lulars de la seva acció supressora del tumor (Sacco et al., 2016; Schulten, 2018; Wu et al., 2023). Aquí, hem demostrat que la Metformina s'adreça a diferents vies de senyalització per provocar la supressió del tumor a les cèl·lules endometrials. En primer lloc, la Metformina interfereix amb la senyalització del TGF- β que nosaltres i altres grups hem demostrat anteriorment que té un paper supressor de tumors fonamental al CE. Resultats nostres previs utilitzant organoides endometrials van demostrar que els organoides *wt* pateixen apoptosi després del tractament amb el TGF- β , però la pèrdua de *Pten* o *Smad2/3* provoca una pèrdua de sensibilitat a l'apoptosi induïda pel TGF- β (Eritja et al., 2017, 2021) i, per tant, la seva activitat supressora del tumor. En conseqüència, és probable que la restauració de l'apoptosi induïda pel TGF- β en organoides endometrials deficientes en *Pten* o *Smad2/3* produïda per la Metformina sigui un mecanisme cel·lular important per a la seva activitat anti-neoplàsica.

El paper de la via TGF- β /SMADs en la carcinogènesi endometrial també s'ha demostrat de manera indefinida mitjançant l'abrogació condicional dels elements de senyalització del TGF- β mitjançant la supressió condicional de T β RI (Monsivais et al., 2019), la doble supressió condicional de *Smad* i *Smad3* (Kriseman et al., 2019) o la supressió condicional

de T β RI en combinació amb *Pten* inactivat en endometri (Gao et al., 2017). Totes aquestes inhibicions donen lloc a ratolins amb carcinoma d'endometri metastàtic.

El paper de p38 en el càncer és intrigant, ja que podria actuar com a promotor o supressor del tumor segons el tipus de cèl·lula i el context (Canovas & Nebreda, 2021; Martínez-Limón et al., 2020). Per tant, l'augment de la fosforilació de p38 en CE amb deficiència de *Pten* i la seva disminució després del tractament amb Metformina va plantejar diverses preguntes que resten sense resposta: en primer lloc, és la fosforilació de p38 un esdeveniment que promou o suprimeix el tumor consegüent a la deficiència de *Pten*? En segon lloc, pot ser p38 un objectiu terapèutic per a CE amb deficiència de *Pten*? I tercer, els efectes antineoplàstics de la Metformina estan mediat per l'activitat p38? Tot i que recentment s'ha proposat la inhibició de la via de senyalització PI3K/AKT com a mecanisme d'acció neoplàstica de la Metformina (M. Guo et al., 2019; Qiang et al., 2019; Y. Zhao et al., 2018), se sap poc sobre els mecanismes moleculars que condueixen la seva acció a l'endometri. En cas de modificacions de p38 com a resposta al tractament amb Metformina, s'han descrit resultats oposats que demostren la seva activació (Liang et al., 2017; WANG et al., 2014; WU et al., 2011; J. Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2016) o inhibició (Jin et al., 2020; Ling et al., 2017; Tseng et al., 2013). Els nostres resultats demostren que la inhibició farmacològica de p38 restaura l'apoptosi induïda pel TGF- β en la mateixa mesura que la Metformina, cosa que suggereix fortament que p38 actua com a mecanisme promotor del tumor consegüent a la deficiència de *Pten* i que, la inhibició de la fosforilació de p38 per Metformina és un dels mecanismes moleculars de la seva acció antineoplàstica a l'endometri. Val la pena esmentar que p38 s'ha proposat com a biomarcador del càncer i objectiu molecular per al tractament del càncer (García-Hernández et al., 2021; Martínez-Limón et al., 2020). En aquest sentit, les nostres observacions permeten l'avaluació futura de p38 com a biomarcador potencial en la deficiència de *Pten* i objectiu putatiu per al tractament del CE.

Curiosament, la inhibició de p38 no va afectar la proliferació d'organoides endometrials o EMT induïda pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades. Aquests resultats són coherents amb els nostres estudis anteriors. En primer lloc, a diferència de la Metformina, la inhibició de p38 no va tenir cap efecte sobre la proliferació d'organoides endometrials, cosa que suggereix que altres dianes moleculars de la Metformina serien responsables d'impulsar aquesta resposta antineoplàstica. En aquest sentit, anteriorment havíem demostrat que AKT impulsa la proliferació de cèl·lules endometrials de cèl·lules endometrials amb deficiència de *Pten* (Eritja et al., 2017). Per tant, és fàcil especular que la reducció de la fosforilació AKT causada per la Metformina és responsable de la reducció de la proliferació de cèl·lules endometrials. En segon lloc, també vam demostrar prèviament que ERK/MAPK és la principal via de senyalització implicada en l'EMT

desencadenada pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials no polaritzades (Ruiz-Mitjana et al., 2022). De manera consistent, aquí demostrem que la inhibició de l'EMT per Metformina es correlaciona amb una reducció de la fosforilació ERK.

Respecte al càncer de tiroide, existeixen estudis amb un model murí de carcinoma fol·licular agressiu de tiroide amb pèrdua heterozigota de *Pten*. Aquests ratolins exposats a una dieta alta en greixos (HFD: *High-fat diet*) desenvolupaven un fenotip d'obesitat i un càncer més invasor i agressiu (W. G. Kim et al., 2013). Posteriorment, es va demostrar que el tractament amb Metformina d'aquests ratolins exposats a HFD bloquejava completament la invasió vascular del tumor (Park et al., 2016) sense alterar la mida del tumor. En el nostre estudi, la Metformina redueix tant la hiperplàsia de tiroide desencadenada per la pèrdua homozigota de *Pten* com la proliferació cel·lular mesurada a través del marcador Ciclina D1. Sembla que la Metformina pot actuar en diversos punts del procés tumoral -i en funció del model animal-, amb especial interès en obesitat, ja que és un factor de risc important en el desenvolupament de càncer de tiroide. A més a més, el context de deficiència en *Pten* i la consegüent activació de la via PI3K/AKT/mTOR és interessant des del punt de vista de l'acció de la Metformina, degut al fet que aquesta actua inhibint aquest eix.

En la mateixa línia que els nostres resultats actuals, experiments anteriors amb el model murí deficient per *Pten* van demostrar que els ratolins tractats amb Everolimus tenien una reducció de la mida de les tiroides i una disminució del nombre de cèl·lules positives per Ki-67 (Mirantes, Eritja, et al., 2013). Per altra banda, en els organoides de tiroide hem vist que la Metformina desencadena directament l'activació de l'apoptosi, un altre mecanisme cel·lular que posa en evidència les accions pleotròpiques de la Metformina en funció del tipus cel·lular.

Respecte al càncer de pròstata, la literatura científica demostra que la Metformina pot tenir efectes anticancerígens (Yin et al., 2013). En el nostre model de ratolí amb ablació homozigota completa de *Pten* que desenvolupa neoplàsies de pròstata, no hem observat una reducció en aquestes neoplàsies després del tractament amb Metformina. Els potencials efectes antitumorals de la Metformina enfront aquest tipus de tumor no queda sempre demostrat i els resultats poden ser subòptims en alguns estudis (P. Zhang et al., 2013; Z.-J. Zhang & Li, 2014). A dia d'avui només hi ha un model murí de càncer de pròstata deficient en *Pten* (Pb-Cre+;Pten^{fl/fl}) que avalua l'acció de la Metformina (Hayashi et al., 2019). L'administració de Metformina va reduir els pesos de la pròstata i els MDSC (*myeloid-derived suppressor cell*) dels ratolins alimentats amb dieta alta en greixos (HFD) però no en els ratolins tractats amb dieta control. A més a més aquest augment de pes en la pròstata i MDSC era major en els ratolins alimentats amb HFD que en els controls. Això suggeria que la Metformina podria inhibir el creixement del càncer de pròstata induït per

HFD, mitjançant cèl·lules immunitàries locals, MDSC. La Metformina per tant, no modulava en si el càncer produït per la pèrdua sola de *Pten*, només la seva invasió. Tenint en compte aquests resultats en conjunt, la Metformina podria estar actuant a un nivell del carcinoma de pròstata més avançat que aquell produït només per la pèrdua de *Pten* a través d'un mecanisme d'acció específic. Tot això posa de manifest la complexitat en els mecanismes d'acció de la Metformina i les variàncies en funció el model animal estudiat.

En conclusió, s'ha demostrat que la Metformina és un potencial antitumoral en el tractament de diversos càncers. En aquest treball es caracteritza l'efecte de la Metformina en diferents models en relació a la via p38/MAPK, PI3K/AKT i la seva resposta al TGF- β en endometri i tiroide deficientes en *Pten*. Els resultats postulen la Metformina com un fàrmac interessant des del punt de vista de reposicionament farmacèutic, que permet tenir una nova utilitat potencial en l'àmbit oncològic.

3. ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DE SMAD2 I SMAD3 EN PROCESSOS TUMORALS INDUÏTS PER LA PÈRDUA DE *PTEN*

Les vies de senyalització del TGF- β estan alterades en nombrosos càncers (Colak & ten Dijke, 2017). Respecte a la via canònica TGF- β /Smads s'han reportat diversos estudis que atribueixen funcions de supressió tumoral a aquesta via en endometri (Gao et al., 2017; Kriseman et al., 2019; Monsivais et al., 2019) i en pròstata (Aitchison et al., 2008; Ding et al., 2011, 2012). La literatura és molt extensa quant al paper dicotòmic del TGF- β . Es coneix que el TGF- β actua de supressor tumoral en cèl·lules normals i pre-malignes amb funcions tals com aturada de cicle cel·lular i apoptosi, però fa de promotor tumoral en cèl·lules canceroses, amb funcions d'invasió, EMT, metàstasi i quimioresistència. Aquestes funcions contradictòries del TGF- β són causades per diferents contextos cel·lulars, incloent-hi factors tant intracel·lulars com ambientals.

En condicions fisiològiques el TGF- β és segregat per les cèl·lules estromals en el teixit normal i desenvolupa funcions inhibidores en el creixement i la proliferació de cèl·lules epitelials. Les cèl·lules que esdevenen tumorals acaben adquirint una resistència a aquests senyals inhibitoris que desencadenen una proliferació descontrolada i tot això juga un paper clau en el desenvolupament de la carcinogènesi. En alguns contextos, el TGF- β o algun element de la via de les SMADs està mutat o té disminuïda la seva expressió (Y. Chen et al., 2020) i això explicaria aquesta resistència, però no sempre és així. Referent a la carcinogènesi endometrial, ja hem explicat que durant els últims anys s'ha descrit el paper del TGF- β /SMAD a través de la supressió condicional dels receptors TGF- β i membres de la família de les SMAD en models animals murins (Gao et al., 2017;

Kriseman et al., 2019; Monsivais et al., 2019) que desencadena carcinoma endometrial metastàtic.

PTEN augmenta l'activació de l'eix PI3K/AKT i aquesta sobreactivació pot generar resistència a les funcions supressores tumorals del TGF- β com seria l'apoptosi a través de *Smad3* en cèl·lules d'endometri (Eritja et al., 2017; K. Song et al., 2006).

En aquesta tesi s'han estudiat les funcions de SMAD2/3 en endometri deficient en *Pten*. A dia d'avui està àmpliament descrit que en cèl·lules epitelials normals l'activació de les SMADs desencadenada pel TGF- β és una via de supressió tumoral. No obstant això, mutacions oncogèniques poden canviar les funcions de supressió tumoral del TGF- β /SMADs per funcions de promoció tumoral. Nosaltres havíem descrit prèviament que la pèrdua de *Pten* en organoides d'endometri genera resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β i desencadena la translocació nuclear de SMAD2/3 (Eritja et al., 2021). Això ens va fer plantejar si la translocació nuclear de SMAD2/3 produïda per la pèrdua de *Pten* podia ser un mecanisme de supressió o promoció tumoral. El que vam trobar va ser que la pèrdua de *Pten* condueix a un augment de la mida dels organoides, però quan es perd *Pten* i *Smad2/3* conjuntament, la mida dels organoides augmenta encara més, indicador que la translocació nuclear de SMAD2/3 podria estar limitant la tumorigènesi provocada per la pèrdua de *Pten*. A més a més, la pèrdua de *Smad2/3* també genera resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β . Tot això ens va fer pensar que SMAD2/3 té funcions supressores de tumors quan transloca a nucli per deficiència de *Pten*.

Per altra banda, es coneix que la senyalització per SMADs és capaç de desencadenar EMT en cèl·lules malignes. Tanmateix, ni la deficiència de *Smad2/3* ni la triple deficiència de *Smad2/3/Pten* van provocar cap signe de canvis morfològics compatibles amb EMT. Per tant, la funció supressora del tumor dels SMAD en els organoides d'endometri es limita al control de la proliferació glandular i la regulació de l'apoptosi desencadenada pel TGF- β .

Tanmateix, vam estudiar les funcions de SMAD2/3 en endometri deficient en *Pten in vivo* en ratolí. Curiosament, la pèrdua de *Smad2/3* no va provocar cap alteració en el fenotip sa d'endometri. En la mateixa línia, la triple pèrdua de *Smad2/3/Pten* no va modificar el fenotip respecte a la deleció única de *Pten* en el model animal, el qual desenvolupa neoplàsia intraepitelial d'endometri, però no carcinomes invasius. En resum, hem demostrat que en cultius d'organoides d'endometri SMAD2/3 funciona com a supressor tumoral en un context deficient en *Pten*, però en un sistema més complex com l'endometri en el model de ratolí, no hem observat que SMAD2/3 tingui un paper de supressor tumoral. Això podria explicar-se per les diferències de complexitat entre els models estudiats i possibles mecanismes desconeguts que tenen lloc tant en els cultius *in vitro* com en el model *in vivo*. És interessant mencionar que, per altra banda, un estudi va

comparar dos models animals amb inactivació condicional uterina del receptor TGF- β ALK5 (o T β RI) i de *Smad2* i *Smad3* (Liu et al., 2019). El que van observar va ser que el model d'ALK5 provocava una inactivació completa de la via de senyalització TGF- β , mentre que la inactivació de *Smad2* i *Smad3* només provocava una pèrdua parcial de la via, tot i que amb aquest últim model els carcinomes eren més agressius. Per altra banda, es van estudiar mostres humanes de càncer i es va veure que nivells més baixos de *Smad2* o *Smad3* s'associaven a un millor pronòstic i un temps de supervivència més llarg en pacients amb càncer d'endometri. Això posa en èmfasi la innegable funció dual del TGF- β en el càncer d'endometri i les heterogeneïtats entre models tant animals, com humans, com cel·lulars.

Referent al carcinoma de pròstata, de nou la literatura avala una doble funció del TGF- β ; actua com un factor antiproliferatiu en les etapes inicials del càncer de pròstata, mentre que en els estadis avançats del càncer de pròstata adquireix propietats pro-oncogèniques i pro-metastàtiques. Per una banda, s'ha descrit que la pèrdua de T β RII (Williams et al., 1996) es pot correlacionar amb un augment d'agressivitat tumoral en càncer de pròstata, postulant el TGF- β com un supressor tumoral. En canvi, en fases més avançades de la carcinogènesi, el TGF- β pot desencadenar funcions de promoció tumoral com l'EMT (Slabáková et al., 2011) o l'angiogènesi (F. Yang et al., 2005). A més a més, en alguns càncers de pròstata el TGF- β es troba augmentat i la inactivació de la TGF- β /Smads ajudaria a revertir aquest fenotip (Ji et al., 2014; Tuxhorn et al., 2002). No obstant això, en un model murí de càncer de pròstata es va descriure que el bloqueig del receptor T β RII inhibia la tumorigènesi en fases inicials i la invasió cel·lular en glàndules deficientes en *Pten* (Qin et al., 2016), actuant en aquest cas el TGF- β com a promotor tumoral en fases inicials del tumor. Nosaltres hem descrit que *Smad2/3* té un paper de supressor tumoral en pròstata a través del model de ratolí condicional CreER amb pèrdua de *Pten* i pèrdua de *Smad2/3*. Les mutacions en *Pten* són de les més freqüents en el càncer de pròstata (Jamaspishvili et al., 2018). Es coneix que aproximadament el 20% dels tumors primaris de pròstata i el 50% en tumors resistents a la castració tenen *Pten* mutat. La pèrdua de *Pten* està fortament relacionada amb processos oncològics greus en humans tals com augment del volum tumoral i d'estadiatge, augment de recurrència després de prostatectomia, metàstasis, mort específica per càncer de pròstata i progressió de la malaltia independent d'andrògens (Lotan et al., 2011; Sircar et al., 2009; Troyer et al., 2015; Yoshimoto et al., 2007).

La pèrdua de *Pten* deriva en l'activació de l'eix PI3K/AKT així com les cascades de senyalització de *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Més concretament la pèrdua o inactivació de *Pten* resulta en l'activació de proteïnes que contenen dominis d'homologia de *pleckstrin* (PH), com AKT. L'AKT fosforilada activa l'eix de senyalització de mTOR, que

tenen un paper clau en la regulació de l'apoptosi, progressió del cicle cel·lular, proliferació, metabolisme, diferenciació i invasió (M. S. Song et al., 2012). PTEN en si regula nombrosos processos de polaritat cel·lular, mobilitat, senescència i modulació del microambient tumoral (M. S. Song et al., 2012), a més de mediar en processos de resposta immunitària adaptativa i innata (L. Chen & Guo, 2017; S. Li et al., 2016).

Prèviament al nostre grup s'havia descrit que el model murí deficient per *Pten* desencadena neoplàsia intraepitelial de pròstata (PIN) *in situ* (Mirantes, Eritja, et al., 2013). Amb aquests resultats previs, vam voler estudiar *Smad2/3* en aquest model deficient per *Pten*. La pèrdua única de *Pten* va derivar en el 75% dels ratolins amb PIN d'alt grau i el 25% de PIN de baix grau. A més a més, la pèrdua de *Pten* en pròstata va augmentar els nivells de proteïna de SMAD2 i SMAD3, cosa que podria indicar que és un mecanisme de supressió tumoral que es desencadena. Per validar aquesta idea, vam estudiar la pèrdua de *Smad2/3* en el model deficient de *Pten* i vam observar que el 100% dels ratolins van desenvolupar adenocarcinomes invasius, amb invasió de l'estroma i les glàndules adjacents. Aquests ratolins amb triple deleció *Smad2/Smad3/Pten* (tKO) mostraven una pèrdua en el marcador epitelial citoqueratina 8 i un augment en AMACR (α -racemasa), marcador altament sensible i específic en carcinoma de pròstata (Molinié & Baumert, 2007). Aquest fenotip més agressiu es va correlacionar amb un augment en les cèl·lules positives per Ciclina D1. A més a més, les pròstates tKO tenien una mitjana de pes superior a les PTEN KO. Per contra, la simple deleció de *Smad2/3* no alterava el fenotip sa de la pròstata, posant de manifest el paper supressor tumoral de SMAD2/3 desencadenat pel context tumoral de pèrdua de *Pten*.

De forma molt similar, el Dr. Zing i col·laboradors van descriure que la deleció conjunta de *Pten* i *Smad4* desencadenava càncers de pròstata invasius i metastàtics (Ding et al., 2011). Aquest model va estudiar el transcriptoma d'una PIN d'epiteli de pròstata d'un ratolí *Pten*^{-/-} i va observar una hiperactivació de la via TGF- β /BMP-SMAD4. Per tal de validar la funció de SMAD4, es va utilitzar un model condicional Pb-Cre amb al·lels condicionals de *Pten*^{-/-} i *Smad4*^{-/-}. Els ratolins *Pten*^{-/-} van desenvolupar característiques invasives després de 19 setmanes i la majoria van sobreviure a l'any d'edat. Per contra, els dobles *Pten*^{-/-} i *Smad4*^{-/-} van desenvolupar carcinomes de pròstata invasius a les 11 setmanes i altament invasius a les 15 setmanes. Curiosament, els ratolins *Smad4*^{-/-} no van mostrar mai neoplàsia de pròstata. Tot això sembla indicar que tant en el model de carcinoma de pròstata Pb-Cre com en el nostre model CreER amb pèrdua homozigota de *Pten* s'activen unes vies relacionades amb les Smads que limiten la progressió de l'agressivitat i la invasió. A més a més, la inactivació de SMAD4 en el càncer de pròstata també s'ha descrit en mostres humanes (Aitchison et al., 2008).

S'han descrit altres models murins en el càncer de pròstata focalitzats en la pèrdua de *Pten* (Grabowska et al., 2014). En un model de ratolí la pèrdua monoal·lèlica de *Pten* (*Pten*^{+/-}) va ser suficient per generar una neoplàsia intraepitelial de pròstata (PIN) però no un carcinoma invasiu (Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Trotman et al., 2003). Amb la pèrdua d'ambdós al·lells de *Pten*, en canvi, es desencadena una progressió lenta de PIN a un carcinoma invasiu (Trotman et al., 2003) i, fins i tot metastàtic (Wang et al., 2003), la velocitat de progressió de la qual varia en part pel fons genètic de la soca de ratolí utilitzada. A més a més, també s'ha descrit que la quantitat delecionada de *Pten* condiciona la severitat de la tumorigènesi (Trotman et al., 2003). No obstant això, el rol de *Pten* en el carcinoma de pròstata humana no està del tot clar. En la clínica s'ha documentat que hi hauria una gradació de severitat en el carcinoma de pròstata, sent la forma *WT* de *Pten* la més lleu, seguida d'heterozigosi en *Pten* i finalment pèrdua bial·lèlica de *Pten*. En tot cas, sembla que la inactivació o deficiència de *Pten* ha d'anar acompanyada d'altres mutacions com elements de les Smads per generar carcinomes de pròstata més invasius.

La clau de les diferències de funcions que mostra TGF- β /SMADs és molt complexa, ja que no només depèn de la fase del tumor, sinó de vies moleculars relacionades. La doble funció i la naturalesa pleiotròpica de la senyalització del TGF- β la converteixen en una molècula molt interessant des del punt de vista farmacològic, ja sigui pel bloqueig de senyalització del TGF- β sobre les cèl·lules tumorals i estromals, com pels biomarcadors que poden predir l'eficàcia dels inhibidors del TGF- β en pacients amb càncer.

Tanmateix, a causa de la doble funció del TGF- β com a supressor i com a promotor tumoral durant diferents estadis de la malaltia, la inhibició de la seva senyalització podria ser un repte per obtenir un efecte terapèutic.

Cada cop hi ha més interès en l'estudi genètic i biològic dels càncers i la seva progressió amb l'objectiu d'identificar biomarcadors de risc de progressió capaços de millorar la gestió del pacient. *Pten* o elements de la via de les Smads són molècules interessants en els càncers estudiats. Al final, l'objectiu últim de l'estudi de biomarcadors és la millora del diagnòstic, pronòstic inclús estratificació del risc del tumor, amb interès especial en grups de risc baixos-intermediaris, que és on hi ha més marge de millora.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- **Primera**

La pèrdua de polaritat causada per l'absència de matriu extracel·lular sintètica canvia l'apoptosi induïda pel TGF- β per la Transició Epiteli-Mesènquima en cèl·lules epitelials endometrials de ratolí

- **Segona**

L'apoptosi induïda pel TGF- β en organoides de cèl·lules epitelials endometrials de ratolí es regula a través de la via PI3K/AKT

- **Tercera**

La Transició Epiteli-Mesènquima induïda pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials de ratolí en condicions 2D es regula a través de la via MAPK/ERK

- **Quarta**

La presència de matriu extracel·lular sintètica disminueix l'expressió de les vies PI3K/AKT i MAPK/ERK

- **Cinquena**

La deficiència de *Smad2/3* desencadena una Transició Epiteli-Mesènquima parcial i bloqueja l'adquisició del fenotip migratori induït pel TGF- β en cèl·lules epitelials endometrials de ratolí

- **Sisena**

La Metformina redueix la proliferació de les línies humanes de càncer d'endometri ARK-1, HEC-1A, Ishikawa i MFE-293 i de tiroide FTC-133 en condicions 2D

- **Setena**

La Metformina disminueix la proliferació i inhibeix la Transició Epiteli-Mesènquima de les cèl·lules epitelials endometrials de ratolí sota condicions 2D a través d'ERK

- **Vuitena**

Metformina redueix la proliferació, disminueix el perímetre glandular i restaura l'apoptosi induïda pel TGF- β en organoides de ratolí de cèl·lules epitelials endometrials deficients en *Pten* i *Smad2/3*

- **Novena**

Els organoides de ratolí de cèl·lules epitelials tiroïdals deficients en *Pten* proliferen més que els *wt*

- **Desena**

La pèrdua de *Pten* confereix resistència a l'apoptosi desencadenada per la Metformina en organoides de tiroide de ratolí

- **Onzena**

La Metformina redueix les neoplàsies d'endometri i tiroide però no les neoplàsies de pròstata en el model de ratolí CRE^{+/-} PTEN^{F/F} amb pèrdua de *Pten*

- **Dotzena**

Smad2/3 actua de supressor tumoral en organoides endometrials de ratolí deficients en *Pten*, ja que la seva pèrdua implica augment de la proliferació i resistència a l'apoptosi induïda pel TGF- β

- **Tretzena**

Smad2/3 no funciona com a supressor tumoral en endometri en el model de ratolí CRE^{+/-} PTEN^{F/F} ja que la seva deleció genètica no desencadena carcinomes d'endometri i la deleció conjunta amb *Pten* no altera el fenotip tumoral desencadenat per la pèrdua sola de *Pten*

- **Catorzena**

Smad2/3 funciona com a supressor tumoral en pròstata en el model de ratolí CRE^{+/-} PTEN^{F/F} ja que la seva deleció genètica conjunta amb *Pten* desencadena carcinoma de pròstata invasiu respecte el carcinoma de pròstata *in situ* desencadenat per la pèrdua sola de *Pten*



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aashaq, S., Batool, A., Mir, S. A., Beigh, M. A., Andrabi, K. I., & Shah, Z. A. (2022). TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*, *237*(1), 59–85. <https://doi.org/10.1002/jcp.30529>
- Ahn, H. K., Lee, Y. H., & Koo, K. C. (2020). Current Status and Application of Metformin for Prostate Cancer: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8540. <https://doi.org/10.3390/ijms21228540>
- Aitchison, A. A., Veerakumarasivam, A., Vias, M., Kumar, R., Hamdy, F. C., Neal, D. E., & Mills, I. G. (2008). Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. *The Prostate*, *68*(6), 661–674. <https://doi.org/10.1002/pros.20730>
- American Cancer Society. (n.d.).
- Anil, C., Kut, A., Atesagaoglu, B., Nar, A., Bascil Tutuncu, N., & Gursoy, A. (2016). Metformin Decreases Thyroid Volume and Nodule Size in Subjects with Insulin Resistance: A Preliminary Study. *Medical Principles and Practice*, *25*(3), 233–236. <https://doi.org/10.1159/000442821>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(8), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Bailey, C. J., & Day, C. (1989). Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care*, *12*(8), 553–564. <https://doi.org/10.2337/diacare.12.8.553>
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., & Arteaga, C. L. (2000). Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(47), 36803–36810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005912200>
- Bansal, M., Gandhi, M., Ferris, R. L., Nikiforova, M. N., Yip, L., Carty, S. E., & Nikiforov, Y. E. (2013). Molecular and Histopathologic Characteristics of Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, *37*(10), 1586–1591. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318292b780>
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & García de Herreros, A. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, *2*(2), 84–89. <https://doi.org/10.1038/35000034>
- Bell, D. W., & Ellenson, L. H. (2019). Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*(1), 339–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043609>
- Bensimon, L., Yin, H., Suissa, S., Pollak, M. N., & Azoulay, L. (2014). The Use of Metformin in Patients with Prostate Cancer and the Risk of Death. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *23*(10), 2111–2118. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0056>
- Bigner, S. H., Mark, J., Mahaley, M. S., & Bigner, D. D. (1984). Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas. *Hereditas*, *101*(1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1984.tb00455.x>

- Bikas, A., Jensen, K., Patel, A., Costello, J., McDaniel, D., Klubo-Gwiedzinska, J., Larin, O., Hoperia, V., Burman, K. D., Boyle, L., Wartofsky, L., & Vasko, V. (2015). Glucose-deprivation increases thyroid cancer cells sensitivity to metformin. *Endocrine-Related Cancer*, *22*(6), 919–932. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0402>
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., & Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, *65*(4), 663–675. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90098-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90098-J)
- Broadfield, L. A., Saigal, A., Szamosi, J. C., Hammill, J. A., Bezverbnaya, K., Wang, D., Gautam, J., Tsakiridis, E. E., Di Pastena, F., McNicol, J., Wu, J., Syed, S., Lally, J. S. V., Raphenya, A. R., Blouin, M.-J., Pollak, M., Sacconi, A., Blandino, G., McArthur, A. G., ... Steinberg, G. R. (2022). Metformin-induced reductions in tumor growth involves modulation of the gut microbiome. *Molecular Metabolism*, *61*, 101498. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101498>
- Cai, D., Sun, H., Qi, Y., Zhao, X., Feng, M., & Wu, X. (2016). Insulin-Like Growth Factor 1/Mammalian Target of Rapamycin and AMP-Activated Protein Kinase Signaling Involved in the Effects of Metformin in the Human Endometrial Cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, *26*(9), 1667–1672. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000818>
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., & Nieto, M. A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, *2*(2), 76–83. <https://doi.org/10.1038/35000025>
- Cánovas, B., Igea, A., Sartori, A. A., Gomis, R. R., Paull, T. T., Isoda, M., Pérez-Montoyo, H., Serra, V., González-Suárez, E., Stracker, T. H., & Nebreda, A. R. (2018). Targeting p38 α Increases DNA Damage, Chromosome Instability, and the Anti-tumoral Response to Taxanes in Breast Cancer Cells. *Cancer Cell*, *33*(6), 1094-1110.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.010>
- Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(5), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Cha, J.-H., Yang, W.-H., Xia, W., Wei, Y., Chan, L.-C., Lim, S.-O., Li, C.-W., Kim, T., Chang, S.-S., Lee, H.-H., Hsu, J. L., Wang, H.-L., Kuo, C.-W., Chang, W.-C., Hadad, S., Purdie, C. A., McCoy, A. M., Cai, S., Tu, Y., ... Hung, M.-C. (2018). Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Molecular Cell*, *71*(4), 606-620.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.030>
- Chang, A. J., Autio, K. A., Roach, M., & Scher, H. I. (2014). High-risk prostate cancer—classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *11*(6), 308–323. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.68>
- Chen, L., & Guo, D. (2017). The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *14*(7), 581–589. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.30>

- Chen, Y., Di, C., Zhang, X., Wang, J., Wang, F., Yan, J., Xu, C., Zhang, J., Zhang, Q., Li, H., Yang, H., & Zhang, H. (2020). Transforming growth factor β signaling pathway: A promising therapeutic target for cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1903–1914. <https://doi.org/10.1002/jcp.29108>
- Chu, D., Wu, J., Wang, K., Zhao, M., Wang, C., Li, L., & Guo, R. (2018). Effect of metformin use on the risk and prognosis of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 18(1), 438. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4334-5>
- Colak, S., & ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(1), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.008>
- Conery, A. R., Cao, Y., Thompson, E. A., Townsend, C. M., Ko, T. C., & Luo, K. (2004). Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β -induced apoptosis. *Nature Cell Biology*, 6(4), 366–372. <https://doi.org/10.1038/ncb1117>
- Coradini, D., Casarsa, C., & Oriana, S. (2011). Epithelial cell polarity and tumorigenesis: new perspectives for cancer detection and treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(5), 552–564. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.20>
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(6), 1075–1083. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.3641>
- Cristofano, A. D., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature Genetics*, 19(4), 348–355. <https://doi.org/10.1038/1235>
- Crosbie, E. J., Kitson, S. J., McAlpine, J. N., Mukhopadhyay, A., Powell, M. E., & Singh, N. (2022). Endometrial cancer. *The Lancet*, 399(10333), 1412–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00323-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00323-3)
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Dahia, P. L., Marsh, D. J., Zheng, Z., Zedenius, J., Komminoth, P., Frisk, T., Wallin, G., Parsons, R., Longy, M., Larsson, C., & Eng, C. (1997). Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Research*, 57(21), 4710–4713.
- Danzig, M. R., Kotamarti, S., Ghandour, R. A., Rothberg, M. B., Dubow, B. P., Benson, M. C., Badani, K. K., & McKiernan, J. M. (2015). Synergism between metformin and statins in modifying the risk of biochemical recurrence following radical prostatectomy in men with diabetes. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 18(1), 63–68. <https://doi.org/10.1038/pcan.2014.47>
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., & Pal, M. (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14535–14555. <https://doi.org/10.1002/jcp.28160>
- Davis, S. R., Robinson, P. J., Jane, F., White, S., Brown, K. A., Piessens, S., Edwards, A., McNeilage, J., Woinarski, J., Chipman, M., & Bell, R. J. (2018). The benefits of adding metformin to tamoxifen to protect the endometrium-A randomized placebo-controlled trial. *Clinical Endocrinology*, 89(5), 605–612. <https://doi.org/10.1111/cen.13830>

- Deckers, M., van Dinther, M., Buijs, J., Que, I., Löwik, C., van der Pluijm, G., & ten Dijke, P. (2006). The Tumor Suppressor Smad4 Is Required for Transforming Growth Factor β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition and Bone Metastasis of Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, *66*(4), 2202–2209. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3560>
- Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G. C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S. R., Labrot, E. S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A. H., Scott, K. L., Signoretti, S., Bardeesy, N., ... DePinho, R. A. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature*, *470*(7333), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature09677>
- Ding, Z., Wu, C.-J., Jaskelioff, M., Ivanova, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Chu, G. C., Wang, G., Lu, X., Labrot, E. S., Hu, J., Wang, W., Xiao, Y., Zhang, H., Zhang, J., Zhang, J., Gan, B., Perry, S. R., Jiang, S., ... DePinho, R. A. (2012). Telomerase Reactivation following Telomere Dysfunction Yields Murine Prostate Tumors with Bone Metastases. *Cell*, *148*(5), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.039>
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2007). p38 α MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, *11*(2), 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.013>
- Eritja, N., Felip, I., Dosil, M. A., Vigezzi, L., Mirantes, C., Yeramian, A., Navaridas, R., Santacana, M., Llobet-Navas, D., Yoshimura, A., Nomura, M., Encinas, M., Matias-Guiu, X., & Dolcet, X. (2017). A Smad3-PTEN regulatory loop controls proliferation and apoptotic responses to TGF- β in mouse endometrium. *Cell Death & Differentiation*, *24*(8), 1443–1458. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.73>
- Eritja, N., Llobet, D., Domingo, M., Santacana, M., Yeramian, A., Matias-Guiu, X., & Dolcet, X. (2010). A Novel Three-Dimensional Culture System of Polarized Epithelial Cells to Study Endometrial Carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, *176*(6), 2722–2731. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090974>
- Eritja, N., Navaridas, R., Ruiz-Mitjana, A., Vidal-Sabanés, M., Egea, J., Encinas, M., Matias-Guiu, X., & Dolcet, X. (2021). Endometrial PTEN Deficiency Leads to SMAD2/3 Nuclear Translocation. *Cancers*, *13*(19), 4990. <https://doi.org/10.3390/cancers13194990>
- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, *11*(7), 1946–1954. <https://doi.org/10.1039/c5mb00101c>
- Feng, J.-L., & Qin, X. (2021). Metformin and cancer-specific survival among breast, colorectal, or endometrial cancer patients: A nationwide data linkage study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *175*, 108755. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108755>
- Frisk, T., Foukakis, T., Dwight, T., Lundberg, J., Höög, A., Wallin, G., Eng, C., Zedenius, J., & Larsson, C. (2002). Silencing of the *PTEN* tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *35*(1), 74–80. <https://doi.org/10.1002/gcc.10098>
- Gao, Y., Lin, P., Lydon, J. P., & Li, Q. (2017). Conditional abrogation of transforming growth factor- β receptor 1 in PTEN-inactivated endometrium promotes endometrial cancer progression in mice. *The Journal of Pathology*, *243*(1), 89–99. <https://doi.org/10.1002/path.4930>

- García-Gómez, R., Bustelo, X. R., & Crespo, P. (2018). Protein–Protein Interactions: Emerging Oncotargets in the RAS-ERK Pathway. *Trends in Cancer*, 4(9), 616–633. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.07.002>
- García-Hernández, L., García-Ortega, M. B., Ruiz-Alcalá, G., Carrillo, E., Marchal, J. A., & García, M. Á. (2021). The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 370. <https://doi.org/10.3390/ijms23010370>
- García-Sáenz, M., Lobaton-Ginsberg, M., & Ferreira-Hermosillo, A. (2022). Metformin in Differentiated Thyroid Cancer: Molecular Pathways and Its Clinical Implications. *Biomolecules*, 12(4), 574. <https://doi.org/10.3390/biom12040574>
- Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2008). Epithelial–mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine*, 14(5), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.03.004>
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, 21(8), 938–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>
- Grabowska, M. M., DeGraff, D. J., Yu, X., Jin, R. J., Chen, Z., Borowsky, A. D., & Matusik, R. J. (2014). Mouse models of prostate cancer: picking the best model for the question. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2–3), 377–397. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9487-8>
- Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., Furlong, T. J., Greenfield, J. R., Greenup, L. C., Kirkpatrick, C. M., Ray, J. E., Timmins, P., & Williams, K. M. (2011). Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2), 81–98. <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>
- Grände, M., Franzen, A., Karlsson, J.-O., Ericson, L. E., Heldin, N.-E., & Nilsson, M. (2002). Transforming growth factor- β and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *Journal of Cell Science*, 115(22), 4227–4236. <https://doi.org/10.1242/jcs.00091>
- Greenberg, A. K., Basu, S., Hu, J., Yie, T., Tchou-Wong, K. M., Rom, W. N., & Lee, T. C. (2002). Selective p38 Activation in Human Non–Small Cell Lung Cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(5), 558–564. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.5.4689>
- Guigon, C. J., Zhao, L., Willingham, M. C., & Cheng, S.-Y. (2009). PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene*, 28(4), 509–517. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.407>
- Guo, M., Zhou, J., & Huang, W. (2019). Metformin alleviates endometrial hyperplasia through the UCA1/miR-144/TGF- β 1/AKT signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4438>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>

- Han, B., Cui, H., Kang, L., Zhang, X., Jin, Z., Lu, L., & Fan, Z. (2015). Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. *Tumor Biology*, *36*(8), 6295–6304. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3315-4>
- Han, K., Fyles, A., Shek, T., Croke, J., Dhani, N., D'Souza, D., Lee, T.-Y., Chaudary, N., Bruce, J., Pintilie, M., Cairns, R., Vines, D., Pakbaz, S., Jaffray, D., Metser, U., Rouzbahman, M., Milosevic, M., & Koritzinsky, M. (2022). A Phase II Randomized Trial of Chemoradiation with or without Metformin in Locally Advanced Cervical Cancer. *Clinical Cancer Research*, *28*(24), 5263–5271. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1665>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, Y., Baker, D., & ten Dijke, P. (2019). TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(11), 2767. <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>
- Haring, A., Murtola, T. J., Talala, K., Taari, K., Tammela, T. L. J., & Auvinen, A. (2017). Antidiabetic drug use and prostate cancer risk in the Finnish Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Scandinavian Journal of Urology*, *51*(1), 5–12. <https://doi.org/10.1080/21681805.2016.1271353>
- Hastings, J. F., Skhinas, J. N., Fey, D., Croucher, D. R., & Cox, T. R. (2019). The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *British Journal of Pharmacology*, *176*(1), 82–92. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>
- Hayashi, T., Fujita, K., Matsushita, M., Hayashi, Y., Uemura, M., & Nonomura, N. (2019). Metformin inhibits prostate cancer growth induced by a high-fat diet in *Pten* -deficient model mice. *International Journal of Urology*, *26*(2), 307–309. <https://doi.org/10.1111/iju.13847>
- Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., & Dennis, P. A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nature Reviews Cancer*, *11*(4), 289–301. <https://doi.org/10.1038/nrc3037>
- Horiguchi, M., Ota, M., & Rifkin, D. B. (2012). Matrix control of transforming growth factor- function. *Journal of Biochemistry*, *152*(4), 321–329. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs089>
- Hotamisligil, G. S., & Davis, R. J. (2016). Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(10), a006072. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006072>
- Howlader N, N. A. K. M. M. D. B. A. Y. M. R. J. T. Z. M. A. L. D. C. H. F. E. C. K. (2020). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/, based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.*
- Hummer, B. T., Bartlett, C., Henry, E., & Weissman, B. E. (2003). Expression of Smad4 in the FaDu cell line partially restores TGF-beta growth inhibition but is not sufficient to regulate fibronectin expression or suppress tumorigenicity. *Journal of Cellular Physiology*, *194*(3), 289–302. <https://doi.org/10.1002/jcp.10202>

- Idescat. (2021). *Informe d'Institut d'Estadística de Catalunya* .
- Igea, A., & Nebreda, A. R. (2015). The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Research*, 75(19), 3997–4002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0173>
- Iglesias, D. A., Zhang, Q., Celestino, J., Sun, C. C., Yates, M. S., Schmandt, R. E., & Lu, K. H. (2017). Lean Body Weight and Metformin Are Insufficient to Prevent Endometrial Hyperplasia in Mice Harboring Inactivating Mutations in PTEN. *Oncology*, 92(2), 109–114. <https://doi.org/10.1159/000450615>
- Jamaspishvili, T., Berman, D. M., Ross, A. E., Scher, H. I., De Marzo, A. M., Squire, J. A., & Lotan, T. L. (2018). Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 15(4), 222–234. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.9>
- Jemal, A., Ward, E. M., Johnson, C. J., Cronin, K. A., Ma, J., Ryerson, A. B., Mariotto, A., Lake, A. J., Wilson, R., Sherman, R. L., Anderson, R. N., Henley, S. J., Kohler, B. A., Penberthy, L., Feuer, E. J., & Weir, H. K. (2017). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(9). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx030>
- Jeon, M. J., Kim, W. G., Lim, S., Choi, H.-J., Sim, S., Kim, T. Y., Shong, Y. K., & Kim, W. B. (2016). Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 419, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.10.005>
- Ji, H., Li, Y., Jiang, F., Wang, X., Zhang, J., Shen, J., & Yang, X. (2014). Inhibition of transforming growth factor beta/SMAD signal by MiR-155 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Science*, 105(12), 1541–1549. <https://doi.org/10.1111/cas.12548>
- Jin, J., Ma, Y., Tong, X., Yang, W., Dai, Y., Pan, Y., Ren, P., Liu, L., Fan, H.-Y., Zhang, Y., & Zhang, S. (2020). Metformin inhibits testosterone-induced endoplasmic reticulum stress in ovarian granulosa cells via inactivation of p38 MAPK. *Human Reproduction*, 35(5), 1145–1158. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa077>
- Jordan, N. V., Johnson, G. L., & Abell, A. N. (2011). Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle*, 10(17), 2865–2873. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.17188>
- Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., van Roy, F., Dargemont, C., de Herreros, A. G., Bellacosa, A., & Larue, L. (2007). Activation of NF- κ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene*, 26(53), 7445–7456. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210546>
- Khawaja, M. R., Nick, A. M., Madhusudanannair, V., Fu, S., Hong, D., McQuinn, L. M., Ng, C. S., Pihapaul, S. A., Janku, F., Subbiah, V., Tsimberidou, A., Karp, D., Meric-Bernstam, F., Lu, K. H., & Naing, A. (2016). Phase I dose escalation study of temsirolimus in combination with metformin in patients with advanced/refractory cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(5), 973–977. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3009-7>
- Kim, T. S., Lee, M., Park, M., Kim, S. Y., Shim, M. S., Lee, C. Y., Choi, D. H., & Cho, Y. (2021). Metformin and Dichloroacetate Suppress Proliferation of Liver Cancer Cells by Inhibiting mTOR Complex 1.

- International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10027.
<https://doi.org/10.3390/ijms221810027>
- Kim, W. G., Park, J. W., Willingham, M. C., & Cheng, S. (2013). Diet-Induced Obesity Increases Tumor Growth and Promotes Anaplastic Change in Thyroid Cancer in a Mouse Model. *Endocrinology*, 154(8), 2936–2947. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1128>
- Kitahara, C. M., & Schneider, A. B. (2022). Epidemiology of Thyroid Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 31(7), 1284–1297. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1440>
- Klubo-Gwiedzinska, J., Costello, J., Patel, A., Bauer, A., Jensen, K., Mete, M., Burman, K. D., Wartofsky, L., & Vasko, V. (2013a). Treatment With Metformin Is Associated With Higher Remission Rate in Diabetic Patients With Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(8), 3269–3279. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3799>
- Klubo-Gwiedzinska, J., Costello, J., Patel, A., Bauer, A., Jensen, K., Mete, M., Burman, K. D., Wartofsky, L., & Vasko, V. (2013b). Treatment With Metformin Is Associated With Higher Remission Rate in Diabetic Patients With Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(8), 3269–3279. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3799>
- Kong, D., Suzuki, A., Zou, T.-T., Sakurada, A., Kemp, L. W., Wakatsuki, S., Yokoyama, T., Yamakawa, H., Furukawa, T., Sato, M., Ohuchi, N., Sato, S., Yin, J., Wang, S., Abraham, J. M., Souza, R. F., Smolinski, K. N., Meltzer, S. J., & Horii, A. (1997). PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nature Genetics*, 17(2), 143–144. <https://doi.org/10.1038/ng1097-143>
- Kriseman, M., Monsivais, D., Agno, J., Masand, R. P., Creighton, C. J., & Matzuk, M. M. (2019). Uterine double-conditional inactivation of *Smad2* and *Smad3* in mice causes endometrial dysregulation, infertility, and uterine cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3873–3882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806862116>
- Laha, D., Nilubol, N., & Boufraqueh, M. (2020). New Therapies for Advanced Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00082>
- Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2012). TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial–mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of Cell Science*, 125(5), 1259–1273. <https://doi.org/10.1242/jcs.095299>
- Lamouille, S., & Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *Journal of Cell Biology*, 178(3), 437–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611146>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lee, M., & Vasioukhin, V. (2008). Cell polarity and cancer – cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, 121(8), 1141–1150. <https://doi.org/10.1242/jcs.016634>
- Leelahavanichkul, K., Amornphimoltham, P., Molinolo, A. A., Basile, J. R., Koontongkaew, S., & Gutkind, J. S. (2014). A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular Oncology*, 8(1), 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.10.003>

- Lemon, L. S., Orr, B., Modugno, F., Buckanovich, R. J., Coffman, L., Edwards, R. P., & Taylor, S. (2022). Metformin and survival: Is there benefit in a cohort limited to diabetic women with endometrial, breast, or ovarian cancer? *Gynecologic Oncology*, *165*(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2022.01.022>
- Li, M., Li, X., Zhang, H., & Lu, Y. (2018). Molecular Mechanisms of Metformin for Diabetes and Cancer Treatment. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01039>
- Li, Q. (2014). Transforming growth factor β signaling in uterine development and function. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *5*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-52>
- Li, Q., Agno, J. E., Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Nagashima, T., & Matzuk, M. M. (2011). Transforming Growth Factor β Receptor Type 1 Is Essential for Female Reproductive Tract Integrity and Function. *PLoS Genetics*, *7*(10), e1002320. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002320>
- Li, S., Zhu, M., Pan, R., Fang, T., Cao, Y.-Y., Chen, S., Zhao, X., Lei, C.-Q., Guo, L., Chen, Y., Li, C.-M., Jokitalo, E., Yin, Y., Shu, H.-B., & Guo, D. (2016). The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity. *Nature Immunology*, *17*(3), 241–249. <https://doi.org/10.1038/ni.3311>
- Li, W., Qiao, W., Chen, L., Xu, X., Yang, X., Li, D., Li, C., Brodie, S. G., Meguid, M. M., Hennighausen, L., & Deng, C.-X. (2003). Squamous cell carcinoma and mammary abscess formation through squamous metaplasia in *Smad4/Dpc4* conditional knockout mice. *Development*, *130*(24), 6143–6153. <https://doi.org/10.1242/dev.00820>
- Liang, X., Kong, P., Wang, J., Xu, Y., Gao, C., & Guo, G. (2017). Effects of metformin on proliferation and apoptosis of human megakaryoblastic Dami and MEG-01 cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, *135*(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.08.003>
- Limoge, M., Safina, A., Truskinovsky, A. M., Aljahdali, I., Zonneville, J., Gruevski, A., Arteaga, C. L., & Bakin, A. V. (2017). Tumor p38MAPK signaling enhances breast carcinoma vascularization and growth by promoting expression and deposition of pro-tumorigenic factors. *Oncotarget*, *8*(37), 61969–61981. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18755>
- Ling, S., Xie, H., Yang, F., Shan, Q., Dai, H., Zhuo, J., Wei, X., Song, P., Zhou, L., Xu, X., & Zheng, S. (2017). Metformin potentiates the effect of arsenic trioxide suppressing intrahepatic cholangiocarcinoma: roles of p38 MAPK, ERK3, and mTORC1. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0424-0>
- Liu, J.-L., He, J.-P., Zhu, C., & Cheng, H.-Z. (2019). Endometrial carcinoma may favor partial, but not complete, loss of the TGF- β signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(19), 9164–9165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903646116>
- Lord, S. R., & Harris, A. L. (2023). Is it still worth pursuing the repurposing of metformin as a cancer therapeutic? *British Journal of Cancer*, *128*(6), 958–966. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02204-2>
- Lotan, T. L., Gurel, B., Sutcliffe, S., Esopi, D., Liu, W., Xu, J., Hicks, J. L., Park, B. H., Humphreys, E., Partin, A. W., Han, M., Netto, G. J., Isaacs, W. B., & De Marzo, A. M. (2011). PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, *17*(20), 6563–6573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1244>

- Luo, F., Huang, Y., Li, Y., Zhao, X., Xie, Y., Zhang, Q., Mei, J., & Liu, X. (2021). A narrative review of the relationship between TGF- β signaling and gynecological malignant tumor. *Annals of Translational Medicine*, *9*(20), 1601–1601. <https://doi.org/10.21037/atm-21-4879>
- Lv, Z., & Guo, Y. (2020). Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00191>
- Mahalingam, D., Salih, H., Fountzilias, C., Michalek, J., Sarantopoulos, J., Datta, P., Romero, O., Mulampurath Achutan Pillai, S., Kuhn, J. G., Pollak, M. N., & Thompson, I. M. (2017). Metformin to treat prostate cancer (PCa) and prevent metabolic syndrome associated with androgen deprivation therapy (ADT): Results of a randomized double-blind placebo-controlled study of metformin in non-diabetic men initiating ADT for advanced PCa. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(15_suppl), e16502–e16502. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e16502
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, *169*(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Marchetti, A., Colletti, M., Cozzolino, A. M., Steindler, C., Lunadei, M., Mancone, C., & Tripodi, M. (2008). ERK5/MAPK is activated by TGF β in hepatocytes and required for the GSK-3 β -mediated Snail protein stabilization. *Cellular Signalling*, *20*(11), 2113–2118. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.002>
- Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
- Masood, M., & Singh, N. (2021). Endometrial carcinoma: changes to classification (WHO 2020). *Diagnostic Histopathology*, *27*(12), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2021.09.003>
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, *134*(2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- McConechy, M. K., Ding, J., Cheang, M. C., Wiegand, K. C., Senz, J., Tone, A. A., Yang, W., Prentice, L. M., Tse, K., Zeng, T., McDonald, H., Schmidt, A. P., Mutch, D. G., McAlpine, J. N., Hirst, M., Shah, S. P., Lee, C.-H., Goodfellow, P. J., Gilks, C. B., & Huntsman, D. G. (2012). Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *The Journal of Pathology*, *228*(1), 20–30. <https://doi.org/10.1002/path.4056>
- Mhawech-Fauceglia, P., Kesterson, J., Wang, D., Akers, S., DuPont, N. C., Clark, K., Lele, S., & Liu, S. (2011). Expression and clinical significance of the transforming growth factor- β signalling pathway in endometrial cancer. *Histopathology*, *59*(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03892.x>
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R., & Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *Journal of Cell Biology*, *127*(6), 2021–2036. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2021>
- Miller, K. D., Nogueira, L., Devasia, T., Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Jemal, A., Kramer, J., & Siegel, R. L. (2022). Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(5), 409–436. <https://doi.org/10.3322/caac.21731>

- Mirantes, C., Eritja, N., Dosil, M. A., Santacana, M., Pallares, J., Gatiús, S., Bergadà, L., Maiques, O., Matias-Guiu, X., & Dolcet, X. (2013). An inducible knock-out mouse to model cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.011445>
- Mirantes, C., Espinosa, I., Ferrer, I., Dolcet, X., Prat, J., & Matias-Guiu, X. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer. *Human Pathology*, *44*(10), 1973–1981. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.04.009>
- Mitsuhashi, A., Sato, Y., Kiyokawa, T., Koshizaka, M., Hanaoka, H., & Shozu, M. (2016). Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus metformin as a fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Annals of Oncology*, *27*(2), 262–266. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv539>
- Moliní, V., & Baumert, H. (2007). Nuevos marcadores en las biopsias de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, *31*(9), 1009–1024. [https://doi.org/10.1016/S0210-4806\(07\)73764-6](https://doi.org/10.1016/S0210-4806(07)73764-6)
- Monsivais, D., Matzuk, M. M., & Pangas, S. A. (2017). The TGF- β Family in the Reproductive Tract. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(10), a022251. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022251>
- Monsivais, D., Peng, J., Kang, Y., & Matzuk, M. M. (2019). Activin-like kinase 5 (ALK5) inactivation in the mouse uterus results in metastatic endometrial carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(9), 3883–3892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806838116>
- Montserrat, N., Mozos, A., Llobet, D., Dolcet, X., Pons, C., de Herreros, A. G., Matias-Guiu, X., & Prat, J. (2012). Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Human Pathology*, *43*(5), 632–643. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.06.021>
- Morale, M. G., Tamura, R. E., & Rubio, I. G. S. (2022). Metformin and Cancer Hallmarks: Molecular Mechanisms in Thyroid, Prostate and Head and Neck Cancer Models. *Biomolecules*, *12*(3), 357. <https://doi.org/10.3390/biom12030357>
- Mu, N., Xu, T., Gao, M., Dong, M., Tang, Q., Hao, L., Wang, G., Li, Z., Wang, W., Yang, Y., & Hou, J. (2020). Therapeutic effect of metformin in the treatment of endometrial cancer (Review). *Oncology Letters*, *20*(5), 1–1. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12017>
- Muinelo-Romay, L., Colas, E., Barbazan, J., Alonso-Alconada, L., Alonso-Nocelo, M., Bouso, M., Curiel, T., Cueva, J., Anido, U., Forteza, J., Gil-Moreno, A., Reventos, J., Lopez-Lopez, R., & Abal, M. (2011). High-Risk Endometrial Carcinoma Profiling Identifies TGF- β 1 as a Key Factor in the Initiation of Tumor Invasion. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(8), 1357–1366. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1019>
- Murali, R., Soslow, R. A., & Weigelt, B. (2014). Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology*, *15*(7), e268–e278. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6)
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(3), 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/jcb.27681>
- Nevadunsky, N. S., Van Arsdale, A., Strickler, H. D., Moadel, A., Kaur, G., Frimer, M., Conroy, E., Goldberg, G. L., & Einstein, M. H. (2014). Metformin use and endometrial cancer survival. *Gynecologic Oncology*, *132*(1), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.10.026>

- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, *166*(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nordström, T., Clements, M., Karlsson, R., Adolfsson, J., & Grönberg, H. (2015). The risk of prostate cancer for men on aspirin, statin or antidiabetic medications. *European Journal of Cancer*, *51*(6), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.02.003>
- Nosengo, N. (2016). Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, *534*(7607), 314–316. <https://doi.org/10.1038/534314a>
- Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M. D., Mendoza-Catalán, M. A., Rodríguez-Ruiz, H. A., Castañeda-Saucedo, E., Ortuño-Pineda, C., Padilla-Benavides, T., & Navarro-Tito, N. (2019). Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial–Mesenchymal Transition in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12), 2885. <https://doi.org/10.3390/ijms20122885>
- Padua, D., Zhang, X. H.-F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., & Massagué, J. (2008). TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell*, *133*(1), 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046>
- Pallante, P., Battista, S., Pierantoni, G. M., & Fusco, A. (2014). Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. *Nature Reviews Endocrinology*, *10*(2), 88–101. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.223>
- Parekh, T. V., Gama, P., Wen, X., Demopoulos, R., Munger, J. S., Carcangiu, M.-L., Reiss, M., & Gold, L. I. (2002). Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Research*, *62*(10), 2778–2790.
- Park, J., Kim, W. G., Zhao, L., Enomoto, K., Willingham, M., & Cheng, S.-Y. (2016). Metformin blocks progression of obesity-activated thyroid cancer in a mouse model. *Oncotarget*, *7*(23), 34832–34844. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8989>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *29*(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Molecular Cancer*, *21*(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01569-x>
- Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., & Dijke, P. ten. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *112*(24), 4557–4568. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.24.4557>
- Piestrzeniewicz-Ulanska, D., Brys, M., Semczuk, A., Rechberger, T., Jakowicki, J. A., & Krajewska, W. M. (2004). TGF- β signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Gynecologic Oncology*, *95*(1), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.06.032>
- Podsypanina, K., Ellenson, L. H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P. E., & Parsons, R. (1999). Mutation of *Pten/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(4), 1563–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1563>
- Portella, G., Cumming, S. A., Liddell, J., Cui, W., Ireland, H., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (1998). Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin

- carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(5), 393–404.
- Preston, M. A., Riis, A. H., Ehrenstein, V., Breau, R. H., Batista, J. L., Olumi, A. F., Mucci, L. A., Adami, H.-O., & Sørensen, H. T. (2014). Metformin Use and Prostate Cancer Risk. *European Urology*, 66(6), 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.027>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Qiang, P., Shao, Y., Sun, Y.-P., Zhang, J., & Chen, L.-J. (2019). Metformin inhibits proliferation and migration of endometrial cancer cells through regulating PI3K/AKT/MDM2 pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(4), 1778–1785. https://doi.org/10.26355/eurev_201902_17140
- Qin, T., Barron, L., Xia, L., Huang, H., Villarreal, M. M., Zwaagstra, J., Collins, C., Yang, J., Zwieb, C., Kodali, R., Hinck, C. S., Kim, S. K., Reddick, R. L., Shu, C., O'Connor-McCourt, M. D., Hinck, A. P., & Sun, L.-Z. (2016). A novel highly potent trivalent TGF- β receptor trap inhibits early-stage tumorigenesis and tumor cell invasion in murine Pten-deficient prostate glands. *Oncotarget*, 7(52), 86087–86102. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13343>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Rezzónico, J., Rezzónico, M., Pusiol, E., Pitoia, F., & Niepomniszcze, H. (2011). Metformin Treatment for Small Benign Thyroid Nodules in Patients with Insulin Resistance. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 9(1), 69–75. <https://doi.org/10.1089/met.2010.0026>
- Riedl, A., Schleder, M., Pudelko, K., Stadler, M., Walter, S., Unterleuthner, D., Unger, C., Kramer, N., Hengstschläger, M., Kenner, L., Pfeiffer, D., Krupitza, G., & Dolznig, H. (2016). Comparison of cancer cells cultured in 2D vs 3D reveals differences in AKT/mTOR/S6-kinase signaling and drug response. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.188102>
- Risinger, J. I., Hayes, A. K., Berchuck, A., & Barrett, J. C. (1997). PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Research*, 57(21), 4736–4738.
- Robinson, B. D., Sica, G. L., Liu, Y.-F., Rohan, T. E., Gertler, F. B., Condeelis, J. S., & Jones, J. G. (2009). Tumor Microenvironment of Metastasis in Human Breast Carcinoma: A Potential Prognostic Marker Linked to Hematogenous Dissemination. *Clinical Cancer Research*, 15(7), 2433–2441. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2179>
- Ross, M. H., P. W. (2020). *Histología. Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular y Celular* (8th ed.).
- Rothermundt, C., Hayoz, S., Templeton, A. J., Winterhalder, R., Strebel, R. T., Bärtschi, D., Pollak, M., Lui, L., Endt, K., Schiess, R., Rüschoff, J. H., Cathomas, R., & Gillissen, S. (2014). Metformin in Chemotherapy-naive Castration-resistant Prostate Cancer: A Multicenter Phase 2 Trial (SAKK 08/09). *European Urology*, 66(3), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.12.057>
- Rubinfeld, H., & Seger, R. (2005). The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling. *Molecular Biotechnology*, 31(2), 151–174. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>

- Ruiz-Mitjana, A., Navaridas, R., Vidal-Sabanés, M., Perramon-Güell, A., Yeramian, A., Felip, I., Eritja, N., Egea, J., Encinas, M., Matias-Guiu, X., & Dolcet, X. (2022). Lack of extracellular matrix switches TGF- β induced apoptosis of endometrial cells to epithelial to mesenchymal transition. *Scientific Reports*, *12*(1), 14821. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18976-1>
- Sacco, F., Calderone, A., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2016). The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *British Journal of Cancer*, *115*(12), 1451–1456. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.385>
- Sahoo, S. S., Quah, M. Y., Nielsen, S., Atkins, J., Au, G. G., Cairns, M. J., Nahar, P., Lombard, J. M., & Tanwar, P. S. (2017). Inhibition of extracellular matrix mediated TGF- β signalling suppresses endometrial cancer metastasis. *Oncotarget*, *8*(42), 71400–71417. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18069>
- Salmena, L., Carracedo, A., & Pandolfi, P. P. (2008). Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell*, *133*(3), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.013>
- Santibañez, J. F. (2006). JNK mediates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Letters*, *580*(22), 5385–5391. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.003>
- Schrauwen, S., Coenegrachts, L., Cattaneo, A., Hermans, E., Lambrechts, D., & Amant, F. (2015). The antitumor effect of metformin with and without carboplatin on primary endometrioid endometrial carcinoma in vivo. *Gynecologic Oncology*, *138*(2), 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.006>
- Schulten, H.-J. (2018). Pleiotropic Effects of Metformin on Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 2850. <https://doi.org/10.3390/ijms19102850>
- Seebacher, V., Bergmeister, B., Grimm, C., Koelbl, H., Reinthaller, A., & Polterauer, S. (2016). The prognostic role of metformin in patients with endometrial cancer: a retrospective study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *203*, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.06.013>
- SEOM. (2022). *Informe de Sociedad Española de Oncología Médica* .
- Shi, X., Young, C. D., Zhou, H., & Wang, X.-J. (2020). Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*, *10*(12), 1666. <https://doi.org/10.3390/biom10121666>
- Siddharth, S., Kuppusamy, P., Wu, Q., Nagalingam, A., Saxena, N. K., & Sharma, D. (2022). Metformin Enhances the Anti-Cancer Efficacy of Sorafenib via Suppressing MAPK/ERK/Stat3 Axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8083. <https://doi.org/10.3390/ijms23158083>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Sircar, K., Yoshimoto, M., Monzon, F. A., Koumakpayi, I. H., Katz, R. L., Khanna, A., Alvarez, K., Chen, G., Darnel, A. D., Aprikian, A. G., Saad, F., Bismar, T. A., & Squire, J. A. (2009). PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *The Journal of Pathology*, *218*(4), 505–513. <https://doi.org/10.1002/path.2559>

- Slabáková, E., Pernicová, Z., Slavíčková, E., Staršíchová, A., Kozubík, A., & Souček, K. (2011). TGF- β 1-induced EMT of non-transformed prostate hyperplasia cells is characterized by early induction of SNAI2/Slug. *The Prostate*, *71*(12), 1332–1343. <https://doi.org/10.1002/pros.21350>
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>
- Song, K., Wang, H., Krebs, T. L., & Danielpour, D. (2006). Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF- β /ALK5-mediated Smad3 activation. *The EMBO Journal*, *25*(1), 58–69. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600917>
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3330>
- Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*, *14*(9), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>
- Suarez-Cuervo, C., Merrell, M. A., Watson, L., Harris, K. W., Rosenthal, E. L., Väänänen, H. K., & Selander, K. S. (2004). Breast cancer cells with inhibition of p38 α have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clinical & Experimental Metastasis*, *21*(6), 525–533. <https://doi.org/10.1007/s10585-004-3503-x>
- Sulu, C., Bektas, A. B., Guzel, S. S., Tay, K., Sahin, S., Durcan, E., Ozkaya, H. M., & Kadioglu, P. (2022). Effect of metformin on thyroid cancer risk in patients with acromegaly: A preliminary observational study. *Growth Hormone & IGF Research*, *66*, 101484. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2022.101484>
- Sun, R., Zhai, R., Ma, C., & Miao, W. (2020). Combination of aloin and metformin enhances the antitumor effect by inhibiting the growth and invasion and inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Medicine*, *9*(3), 1141–1151. <https://doi.org/10.1002/cam4.2723>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Stambolic, V., Elia, A. J., Sasaki, T., Barrantes, I. del B., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., Fukumoto, M., & Mak, T. W. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Current Biology*, *8*(21), 1169–1178. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00488-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00488-5)
- Tabrizi, A. D., Melli, M. S., Foroughi, M., Ghojzadeh, M., & Bidadi, S. (2015). Antiproliferative Effect of Metformin on the Endometrium - a Clinical Trial. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(23), 10067–10070. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10067>
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, *19*(11), 1438–1449. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>
- Tang, Y.-L., Zhu, L.-Y., Li, Y., Yu, J., Wang, J., Zeng, X.-X., Hu, K.-X., Liu, J.-Y., & Xu, J.-X. (2017). Metformin Use Is Associated with Reduced Incidence and Improved Survival of Endometrial

- Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2017, 1–9.
<https://doi.org/10.1155/2017/5905384>
- Tashiro, H., Blazes, M. S., Wu, R., Cho, K. R., Bose, S., Wang, S. I., Li, J., Parsons, R., & Ellenson, L. H. (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Research*, 57(18), 3935–3940.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thomas, I., & Gregg, B. (2017). Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. *Pediatric Diabetes*, 18(1), 10–16. <https://doi.org/10.1111/pedi.12473>
- TRAN, L. N. K., KICHENADASSE, G., MOREL, K. L., LAVRANOS, T. C., KLEBE, S., LOWER, K. M., ORMSBY, R. J., ELLIOT, D. J., & SYKES, P. J. (2019). The Combination of Metformin and Valproic Acid Has a Greater Anti-tumoral Effect on Prostate Cancer Growth *In Vivo* than Either Drug Alone. *In Vivo*, 33(1), 99–108. <https://doi.org/10.21873/invivo.11445>
- Treuting, P. M. , D. S. M. , M. K. S. (2018). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat and Human Atlas*. (Second).
- Triggle, C. R., Mohammed, I., Bshesh, K., Marei, I., Ye, K., Ding, H., MacDonald, R., Hollenberg, M. D., & Hill, M. A. (2022). Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*, 133, 155223. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155223>
- Trotman, L. C., Niki, M., Dotan, Z. A., Koutcher, J. A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A. S., Roy-Burman, P., Greenberg, N. M., Dyke, T. Van, Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2003). Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate. *PLoS Biology*, 1(3), e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000059>
- Troyer, D. A., Jamaspishvili, T., Wei, W., Feng, Z., Good, J., Hawley, S., Fazli, L., McKenney, J. K., Simko, J., Hurtado-Coll, A., Carroll, P. R., Gleave, M., Lance, R., Lin, D. W., Nelson, P. S., Thompson, I. M., True, L. D., Brooks, J. D., & Squire, J. A. (2015). A multicenter study shows *PTEN* deletion is strongly associated with seminal vesicle involvement and extracapsular extension in localized prostate cancer. *The Prostate*, 75(11), 1206–1215. <https://doi.org/10.1002/pros.23003>
- Tseng, S.-C., Huang, Y.-C., Chen, H.-J., Chiu, H.-C., Huang, Y.-J., Wo, T.-Y., Weng, S.-H., & Lin, Y.-W. (2013). Metformin-mediated downregulation of p38 mitogen-activated protein kinase-dependent excision repair cross-complementing 1 decreases DNA repair capacity and sensitizes human lung cancer cells to paclitaxel. *Biochemical Pharmacology*, 85(4), 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.001>
- Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Yang, F., Dang, T. D., & Rowley, D. R. (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Research*, 62(21), 6021–6025.
- Urošević, J., Garcia-Albéniz, X., Planet, E., Real, S., Céspedes, M. V., Guiu, M., Fernandez, E., Bellmunt, A., Gawrzak, S., Pavlovic, M., Mangues, R., Dolado, I., Barriga, F. M., Nadal, C., Kemeny, N., Batlle, E., Nebreda, A. R., & Gomis, R. R. (2014). Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nature Cell Biology*, 16(7), 685–694. <https://doi.org/10.1038/ncb2977>

- Uttamsingh, S., Bao, X., Nguyen, K. T., Bhanot, M., Gong, J., Chan, J. L.-K., Liu, F., Chu, T. T., & Wang, L.-H. (2008). Synergistic effect between EGF and TGF- β 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene*, *27*(18), 2626–2634. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210915>
- Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2005). TGF- β and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(4), 1987–2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0658>
- Vancura, A., Bu, P., Bhagwat, M., Zeng, J., & Vancurova, I. (2018). Metformin as an Anticancer Agent. *Trends in Pharmacological Sciences*, *39*(10), 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.006>
- Vander Ark, A., Cao, J., & Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cellular Signalling*, *52*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>
- Ventura, J. J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., & Nebreda, A. R. (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, *39*(6), 750–758. <https://doi.org/10.1038/ng2037>
- Wada, M., Canals, D., Adada, M., Coant, N., Salama, M. F., Helke, K. L., Arthur, J. S., Shroyer, K. R., Kitatani, K., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2017). P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. *Oncogene*, *36*(47), 6649–6657. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.274>
- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, *9*(8), 537–549. <https://doi.org/10.1038/nrc2694>
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G. V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P. S., Liu, X., & Wu, H. (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, *4*(3), 209–221. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00215-0)
- WANG, Y., LIN, B., WU, J., ZHANG, H., & WU, B. (2014). Metformin inhibits the proliferation of A549/CDDP cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Oncology Letters*, *8*(3), 1269–1274. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2270>
- Williams, R. H., Stapleton, A. M., Yang, G., Truong, L. D., Rogers, E., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Scardino, P. T., & Thompson, T. C. (1996). Reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II in human prostate cancer: an immunohistochemical study. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *2*(4), 635–640.
- WU, N., GU, C., GU, H., HU, H., HAN, Y., & LI, Q. (2011). Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasia*, *58*(6), 482–490. https://doi.org/10.4149/neo_2011_06_482
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M. S., Whang, Y. E., & Sawyers, C. L. (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15587–15591. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15587>

- Wu, X., Xu, W.-W., Huan, X., Wu, G., Li, G., Zhou, Y.-H., & Najafi, M. (2023). Mechanisms of cancer cell killing by metformin: a review on different cell death pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *478*(1), 197–214. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04502-4>
- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., & Moses, H. L. (2004). Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- β 1-Induced EMT In Vitro. *Neoplasia*, *6*(5), 603–610. <https://doi.org/10.1593/neo.04241>
- Xu, H., Aldrich, M. C., Chen, Q., Liu, H., Peterson, N. B., Dai, Q., Levy, M., Shah, A., Han, X., Ruan, X., Jiang, M., Li, Y., Julien, J. S., Warner, J., Friedman, C., Roden, D. M., & Denny, J. C. (2015). Validating drug repurposing signals using electronic health records: a case study of metformin associated with reduced cancer mortality. *Journal of the American Medical Informatics Association*, *22*(1), 179–191. <https://doi.org/10.1136/amiajnl-2014-002649>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009a). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, *19*(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009b). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, *19*(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J. L., Zhou, X., & Cao, X. (2018). Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*, *6*(1), 2. <https://doi.org/10.1038/s41413-017-0005-4>
- Xue, J., Li, L., Li, N., Li, F., Qin, X., Li, T., & Liu, M. (2019). Metformin suppresses cancer cell growth in endometrial carcinoma by inhibiting PD-L1. *European Journal of Pharmacology*, *859*, 172541. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172541>
- Yabushita, H., Narumiya, H., Hiratake, K., Yamada, H., Shimazu, M., Sawaguchi, K., Noguchi, M., & Nakanishi, M. (2000). The Association of Transforming Growth Factor- β 1 with Myometrial Invasion of Endometrial Carcinomas through Effects on Matrix Metalloproteinase. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *26*(3), 163–170. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2000.tb01305.x>
- Yang, F., Tuxhorn, J. A., Ressler, S. J., McAlhany, S. J., Dang, T. D., & Rowley, D. R. (2005). Stromal Expression of Connective Tissue Growth Factor Promotes Angiogenesis and Prostate Cancer Tumorigenesis. *Cancer Research*, *65*(19), 8887–8895. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1702>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020a). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020b). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>

- Yin, M., Zhou, J., Gorak, E. J., & Quddus, F. (2013). Metformin Is Associated With Survival Benefit in Cancer Patients With Concurrent Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Oncologist*, *18*(12), 1248–1255. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0111>
- Yoshimoto, M., Cunha, I. W., Coudry, R. A., Fonseca, F. P., Torres, C. H., Soares, F. A., & Squire, J. A. (2007). FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *British Journal of Cancer*, *97*(5), 678–685. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603924>
- Yu, L. (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *The EMBO Journal*, *21*(14), 3749–3759. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf366>
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M., Concannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science*, *339*(6119), 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>
- Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery*, *9*(7), 837–851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>
- Yu-Lee, L.-Y., Yu, G., Lee, Y.-C., Lin, S.-C., Pan, J., Pan, T., Yu, K.-J., Liu, B., Creighton, C. J., Rodriguez-Canales, J., Villalobos, P. A., Wistuba, I. I., de Nadal, E., Posas, F., Gallick, G. E., & Lin, S.-H. (2018). Osteoblast-Secreted Factors Mediate Dormancy of Metastatic Prostate Cancer in the Bone via Activation of the TGFβRIII–p38MAPK–pS249/T252RB Pathway. *Cancer Research*, *78*(11), 2911–2924. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1051>
- Zakrzewski, P. K. (2021). Canonical TGFβ Signaling and Its Contribution to Endometrial Cancer Development and Progression—Underestimated Target of Anticancer Strategies. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(17), 3900. <https://doi.org/10.3390/jcm10173900>
- Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF-β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, *24*(37), 5764–5774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>
- Zhang, J., Jiao, K., Liu, J., & Xia, Y. (2018). Metformin reverses the resistance mechanism of lung adenocarcinoma cells that knocks down the Nrf2 gene. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9382>
- Zhang, P., Li, H., Tan, X., Chen, L., & Wang, S. (2013). Association of metformin use with cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, *37*(3), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.12.009>
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-β signaling. *Cell Research*, *19*(1), 128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhang, Y. E. (2018). Mechanistic insight into contextual TGF-β signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *51*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.10.001>
- Zhang, Z.-J., & Li, S. (2014). The prognostic value of metformin for cancer patients with concurrent diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *16*(8), 707–710. <https://doi.org/10.1111/dom.12267>

- Zhao, B., Luo, J., Yu, T., Zhou, L., Lv, H., & Shang, P. (2020). Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life Sciences*, *254*, 117717. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117717>
- Zhao, Y., Sun, H., Feng, M., Zhao, J., Zhao, X., Wan, Q., & Cai, D. (2018). Metformin is associated with reduced cell proliferation in human endometrial cancer by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling. *Gynecological Endocrinology*, *34*(5), 428–432. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1409714>
- Zhu, J., Zheng, Y., Zhang, H., & Sun, H. (2016). Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-Deoxyglucose regulates apoptosis in ovarian cancer cells via p38 MAPK/JNK signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, *8*(11), 4812–4821.
- Zou, H., Shan, C., Ma, L., Liu, J., Yang, N., & Zhao, J. (2020). Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy. *PeerJ*, *8*, e10136. <https://doi.org/10.7717/peerj.10136>
- Zou, J., Hong, L., Luo, C., Li, Z., Zhu, Y., Huang, T., Zhang, Y., Yuan, H., Hu, Y., Wen, T., Zhuang, W., Cai, B., Zhang, X., Huang, J., & Cheng, J. (2016). Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK – FOXO 1 signal pathway. *Cancer Science*, *107*(12), 1806–1817. <https://doi.org/10.1111/cas.13083>

ANNEX

ANNEX

Lack of extracellular matrix switches TGF- β induced apoptosis of endometrial cells to epithelial to mesenchymal transition. Ruiz-Mitjana A, Navaridas R, Vidal-Sabanés M, Perramon-Güell A, Yeramian A, Felip I, Eritja N, Egea J, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *Sci Rep.* 2022 Sep 1;12(1):14821. doi: 10.1038/s41598-022-18976-1. PMID: 36050359

Endometrial PTEN Deficiency Leads to SMAD2/3 Nuclear Translocation. Eritja N, Navaridas R, Ruiz-Mitjana A, Vidal-Sabanés M, Egea J, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *Cancers (Basel).* 2021 Oct 5;13(19):4990. doi: 10.3390/cancers13194990. PMID: 34638474

Metformin exhibits anti-neoplastic effects on *Pten* deficient endometrial cancer by interfering with TGF- β and p38/ERK MAPK signalling. Ruiz-Mitjana A, Vidal-Sabanés M, Navaridas R, Perramon-Güell A, Yeramian A, Egea J, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X. (*Submitted*)

***In vivo* intra-uterine delivery of TAT-fused Cre recombinase and CRISPR/Cas9 editing unveil histopathology of *Pten/p53*-deficient endometrial cancers.** Navaridas R, Vidal-Sabanés M, Ruiz-Mitjana A, Altés G, Perramon-Güell A, Yeramian A, Egea J, Encinas M, Gatus S, Matias-Guiu X, Dolcet X. (*Submitted*)

Transient and DNA-free *in vivo* CRISPR/Cas9 genome editing for flexible modeling of endometrial carcinogenesis. Navaridas R, Vidal-Sabanés M, Ruiz-Mitjana A, Perramon-Güell A, Megino-Luque C, Llobet-Navas D, Matias-Guiu X, Egea J, Encinas M, Bardia L, Colombelli J, Dolcet X. *Cancer Commun (Lond).* 2023 May;43(5):620-624. doi: 10.1002/cac2.12409. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36762520

