

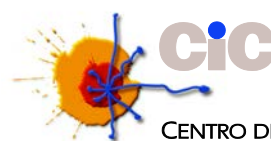
**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER**



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
DEL CÁNCER**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA RUTA DE AUTOFAGIA EN  
CARCINOMA DE ENDOMETRIO  
ESPORÁDICO**

**MARTA FERNÁNDEZ PRIETO**

**2016**





El Dr. D. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo “Estudio de la ruta de autofagia en carcinoma de endometrio esporádico” que presenta la Licenciada en Biología Dña. Marta Fernández Prieto, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y, reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el comité evaluador correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 3 de Marzo de 2016.

FDO. Dr. D. Rogelio González Sarmiento



**El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto FIS-FEDE PI13/01741**



*A mi familia.*





## *Agradecimientos:*

*Con estas líneas querría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo.*

*En primer lugar, quiero dar las gracias a mi director, Dr. Rogelio González Sarmiento, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su dedicación, por sus consejos y por ser tan buen maestro de la ciencia. Recuerdo el día en que me dijiste que esto sería difícil, hoy creo que ha merecido la pena.*

*Quiero agradecer de manera muy especial a todas las personas de la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y del Laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer por haberme acompañado en esta aventura. Por orden alfabético: Athenea, Carlos, Catia, Diego, Elena, Eva, Iskander, Javi, Jessi, Marian, Ricardo, Ruslán y Vanessa. Gracias por haberme enseñado tanto, por hacer del trabajo un placer, por tantas risas y algún que otro llanto, por cañas y días de fútbol, por viajes inolvidables. Gracias por haber sido amigos (e incluso hermanos), más que compañeros. No me olvido de Nieves y Estrella, gracias por hacernos más fácil el trabajo, por poner un poco de orden y un poco de amor de madre. Por supuesto a los nuevos, aunque el tiempo ha sido corto también habéis formado parte de esto, os quedáis en las mejores manos.*

*También quiero dar las gracias a mis amigas, a las de siempre, con las que se puede contar independientemente de la distancia. Gracias por vuestro cariño y amistad, por preocuparos por mí y por estar ahí cuando regreso a casa.*

*A Pablo, por ser como eres, porque no hay otra forma mejor. Gracias por enseñarme a ser constante, a tener paciencia y a luchar cuando todo se hace cuesta arriba. Gracias por darme fuerza, amor y apoyo, la vida es más fácil contigo.*

*Y por último, a mis padres, sobre todo a mis padres. Gracias por vuestro apoyo y amor incondicionales, por estar siempre que os he necesitado y por ayudarme a ponerme en pie en los tiempos difíciles. Gracias por el enorme esfuerzo que habéis hecho, sin vosotros esto no habría sido posible.*

*A todos, gracias.*



# **DIFUSIÓN DE RESULTADOS**

---

---



- **Fernández Prieto, Marta**, Bueno Martínez, E., Sancho de Salas, M., Sancho de Salas, V., García Iglesias, A., González Sarmiento, R.: **“Tratamiento de líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio con inhibidores de la autofagia: alternativa futura para terapias anticáncer”**. Presentación de comunicación-póster en el VII Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 21 y 22 de Mayo de 2015.
  
- **Fernández Prieto, Marta.**, Martín Sánchez, D., Rivero Perdomo, V., Sancho de Salas, M., Sancho de Salas, V., García Iglesias, A., González Sarmiento, R.: **“Análisis de expresión de las proteínas p62 y lc3, implicadas en autofagia, en pacientes con carcinoma de endometrio”**. Presentación de comunicación-póster en el VI Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 22 y 23 de Mayo de 2014. **Primer premio: Concurso de pósters de oncología básica y traslacional en oncología para jóvenes investigadores.**



## **ABREVIATURAS**

---

---





**4E-BP1 (EIF4EBP1):** *Eukaryotic translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*

**AKT (PKB):** *Protein Kinase B*

**AMBRA1:** *Activating Molecule in BECN1- Regulated Autophagy*

**AMPK:** *AMP-activated Protein Kinase*

**AMPS:** *Ammonium Persulfate*

**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli*

**ARID1A:** *AT Rich Interactive Domain 1A*

**ATG:** *Autophagy related Gene*

**ATM:** *Ataxia telangiectasia mutated*

**ATP:** *Adenosin Triphosphate*

**AVs:** *Autophagic Vacuoles*

**Barkor (ATG14):** *Autophagy Related Gene 14*

**BAX:** *Bcl-2-Associated X protein*

**BCL-2:** *B-Cell CLL/Lymphoma 2*

**BECN1:** *Beclin1, autophagy related*

**BH3:** *BCL-2-Homology 3*

**BIF-1 (SH3GLB1):** *Bax-Interacting Factor 1*

**BSA:** *Bovine Serum Albumin*

**CDH1:** *Cadherin 1, E-Cadherin (Epithelial)*

**CDH4:** *Cadherin 4, R-Cadherin (Retinal)*

**CDK1:** *Cyclin-dependent Kinase 1*

**CDKN2A:** *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*

**CIAA:** *Cloroformo alcohol isoamílico*

**CTNNB1:** *Catenin (Cadherin-associated protein) beta 1*

**DAPI:** *4',6-diaminido-2-phenilindole*

**DEPTOR:** *DEP Domain Containing MTOR-Interacting Protein*

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO:** *Dimethyl Sulfoxide*

**DNA:** *Desoxyribonucleic Acid*

**dNTP:** *Deoxynucleotide Triphosphate*

**DRAM:** *DNA-Damage Regulated Autophagy Modulator*

**E2F1:** *E2F transcription Factor 1*

**EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

**EGFR (ERBB1):** *Epidermal Growth Factor Receptor*

**ERK1:** *Extracellular-signal-regulated kinase 1*

**ESCRT:** *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

**FAT:** FRAP, ATM, TRRAP

**FATC:** FAT C-terminal

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*

**FBXW7:** *F-box and WD repeat domain containing 7*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FGFR2:** *Fibroblast growth factor receptor 2*

**FIGO:** *Federación Internacional del Ginecología y Obstetricia*

**FKBP12:** *FK506 Binding Protein 1A (12kDa)*

**FRAP:** *FKBP12-rapamycin-associated protein*

**FRB:** *FKBP12-rapamycin Binding*

**GABARAP:** *GABA(A) Receptor-Associated Protein*

**GAP:** *GTPase-activating Protein*

**GDP:** *Guanosine Diphosphate*

**GEF:** *Guanine nucleotide Exchange Factor*

**GTP:** *Guanosine Triphosphate*

**HDAC:** *Histone Deacetylase*

**HEAT:** *Huntingtin, Elongation Factor 3, A subunit of PP2A, TOR1*

**HER2 (ERBB2):** *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

**HRP:** *Horseradish Peroxidase*

**IC:** *Interval of Confidence*

**IL-8:** *Interleukin-8*

**IL-IR:** *Interleukin-1 Receptor*

**JNK:** *JUN N-terminal Kinase*

**kb:** Kilobases

**KD:** *Kinase Domain*

**KIR:** *KEAP1 Interacting Region*

**KRAS:** *Kirsten Rat Sarcome*

**LAMP-2:** *Lysosomal-Associated Membrane Protein 2*

**LC3 (MAP1LC3):** *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*

**LIR:** *LC3-interacting Region*

**LKB1:** *Liver Kinase B1*

**LOH:** *Loss of Heterozygosis*

**MAP2K4:** *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4*

**MAPK:** *Mitogen-activated Protein Kinase*

**MEK5:** *MAPK/ERK Kinase 5*

**MSI:** *Microsatellite Instability*

**mTOR:** *Mechanistic/Mammalian Target Of Rapamycin*

**mTORC1/2:** *mTOR Complex 1/2*

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NAD:** *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells*

**NP-40:** *Nonyl Phenoxyethoxyethanol*

**NRD:** *Negative Regulatory Domain*

**Nrf2:** *NF-E2-related Factor 2*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** *Odd Ratio*

**Par-6:** *Partitioning defective protein 6*

**PB1:** *Phox/Bem1p*

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PDK1:** *Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 1*

**PE:** *Phosphatidylethanolamide*

**PI(2)P (PIP2):** *Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate*

**PI(3)P (PIP3):** *Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate*

**PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-kinase*

**PIK3C3 (VPS34):** *Phosphatidylinositol 3-kinase, Catalytic Subunit Type 3*

**PIK3CA:** *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

**PIK3R1/2/4:** *Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 1/2/4*

**PKC $\alpha$ / $\beta$ I/ $\beta$ II/  $\gamma$ /  $\delta$ / $\epsilon$ / $\theta$ / $\eta$ /  $\mu$ /  $\nu$ / $\lambda$   $\zeta$ :** *Protein Kinase C  $\alpha$ / $\beta$ I/ $\beta$ II/  $\gamma$ /  $\delta$ / $\epsilon$ / $\theta$ / $\eta$ /  $\mu$ /  $\nu$ / $\lambda$   $\zeta$*

**PMSF:** *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

**POLE:** *Polymerase (DNA Directed) Epsilon, Catalytic Subunit*

**PPP2R1A:** *Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit A*

**PTEN:** *Phosphatase and Tensin homolog*

**PVDF:** *Polyvinylidene Difluoride*

**Rab7:** *RAS-associated protein 7*

**RANK:** *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B*

**Raptor:** *Regulatory Associated Protein of mTORC1*

**RAS:** *Rat Sarcoma*

**RB1:** *Retinoblastoma 1*

**RBCC1 (FIP200):** *RB1-Inducible Coiled-Coil 1*

**Rictor:** *Raptor Independent (Rapamycin Insensitive) Companion of mTORC2*

**RIP:** *Receptor Interacting Protein*

**RIPA:** *Radioimmunoprecipitation assay*

**RNA:** *Ribonucleic Acid*

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*

**r.p.m.:** *Revoluciones por minuto*

**Rubicon (KIAA0226):** *RUN domain- and cysteine-rich domain-containing*

**S6K:** *Ribosomal Protein S6 Kinase*

**SAHA:** *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*

**SDH:** *Succinato deshidrogenasa*

**SDS:** *Sodium Dodecyl Sulphate*

**SIRT2:** *Sirtuin 2*

**SLS:** *Stone-like Structures*

**SNARE:** *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*

**SQSTM1 (p62):** *Sequestosome 1*

**Taq:** *Termus aquaticus*

**TB:** *TRAF6-binding*

**TBE:** *Tris, Borato, EDTA*

**TBS:** *Tris Buffered Saline*

**TBS-T:** *Tris Buffered Saline + Tween20*

**Tel2:** *Telomere Maintenance 2*

**TEMED:** *Tetramethylethylenediamine*

**TGN:** *Trans Golgi Network*

**TLR:** *Toll-like Receptor*

**TNF:** *Tumor Necrosis Factor*

**TNFR:** *Tumor Necrosis Factor Receptor*

**TP53:** *Tumor Protein 53*

**TRAF6:** *TNF Receptor-Associated Factor 6*

**TRRAP:** *Transactivation/Transformation domain-associated Protein*

**TSA:** *Trichostatin A*

**TSC1/2:** *Tuberous Sclerosis 1/2*

**UBA:** *Ubiquitin-associated domain*

**Ubl:** *Ubiquitin-like*

**ULK1/2:** *Unc-51-like Kinase 1/2*

**UV:** *Ultravioleta*

**UVRAG:** *Ultraviolet irradiation Resistance-associated Gene*

**VCP:** *Valosin-containing Protein*

**VEGF-A:** *Vascular Endothelial Growth Factor A*

**WIPI1/2:** *WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 1/2*

**ZZ:** *Zinc-finger*

## ÍNDICE

---

---





<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1. El endometrio .....	9
2. El carcinoma de endometrio .....	11
2.1. Epidemiología .....	11
2.2. Clasificación.....	13
3. La autofagia .....	21
3.1. El proceso de autofagia: etapas y proteínas que intervienen.....	23
3.2. Origen de la membrana .....	31
3.3. Autofagia selectiva.....	32
3.4. Autofagia y cáncer .....	34
3.5. Regulación dual de la autofagia mediante p53.....	36
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
1. Pacientes .....	45
2. Extracción de DNA de sangre periférica y de tejido tumoral.....	46
3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	48
4. Electroforesis en gel de agarosa.....	49
5. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	50
6. Secuenciación de fragmentos de PCR mediante secuenciación por Sanger.....	50
7. Discriminación alélica mediante sondas TaqMan™: genotipado .....	51
8. Cultivo de líneas celulares tumorales .....	53
9. Extracción de proteínas.....	54
9.1. Líneas celulares .....	54
9.2. Tejido tumoral .....	54
10. Anticuerpos .....	55
11. Fármacos .....	55
12. Western blot.....	56
13. Inmunofluorescencia.....	58
14. Ensayo de viabilidad celular .....	60
15. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	61
16. Análisis de datos .....	62
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>

1. Análisis de polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en pacientes con carcinoma de endometrio .....	65
2. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en pacientes con carcinoma de endometrio .....	69
2.1. Estudio de la expresión de p62.....	69
2.2. Estudio de la expresión de LC3B .....	71
2.3. Estudio de la expresión de Beclin1 .....	72
2.4. Estudio de la expresión de PIK3CA.....	74
2.5. Estudio de la expresión de mTOR .....	75
2.6. Estudio de la expresión de PKC $\zeta$ .....	78
2.7. Estudio de la expresión de TRAF6 .....	79
2.8. Correlación de la expresión de las proteínas que intervienen en el proceso de autofagia en tumores de endometrio .....	81
2.9. Estado de la autofagia al analizar la expresión conjunta de p62 y LC3B .....	84
2.10. Correlación entre el estado de la autofagia, la expresión de PIK3CA y mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN .....	85
3. Efecto del tratamiento con Panobinostat®, cloroquina y metformina en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio .....	89
3.1. Estudio del efecto de Panobinostat® en líneas tumorales de carcinoma de endometrio.....	89
3.2. Estudio del efecto de la cloroquina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio.....	98
3.3. Estudio del efecto de la metformina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio.....	105
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
1. Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia podrían incrementar el riesgo de desarrollar tumores de endometrio .....	115
2. La expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia está alterada en pacientes con carcinoma de endometrio .....	118
2.1. p62.....	119
2.2. LC3B .....	120
2.3. p62 y LC3B. Estado de la autofagia.....	122
2.4. Beclin1 .....	123
2.5. PIK3CA.....	125
2.6. mTOR.....	129
2.7. PKC $\zeta$ (PKC $\zeta$ ) .....	135

2.8. TRAF6.....	137
2.9. Correlación entre la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en tumores de endometrio .....	139
3. Estudio del efecto de Panobinostat® en líneas tumorales de carcinoma de endometrio .....	140
4. Estudio del efecto de la cloroquina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio .....	146
5. Estudio del efecto de metformina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio .....	150
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>179</b>



# INTRODUCCIÓN

---

---



## **1. El endometrio**

El endometrio es un tejido mucoso que tapiza el cuerpo uterino y su composición varía periódicamente según los niveles de estrógenos y progestágenos ováricos. Las células endometriales están continuamente activas desde la menarquía hasta la menopausia, ya que se encargan de preparar la mucosa uterina para una posible implantación y anidación del embrión. Cuando no se produce la fecundación del óvulo, parte del endometrio se desprende de la cavidad del útero durante la menstruación. El endometrio posee una alta vascularización y está formado principalmente por dos capas: un estrato compacto de epitelio columnar simple con células secretoras y ciliadas y un estrato esponjoso con glándulas endometriales que segregan moco y se forman como invaginaciones del epitelio superficial. También, existe un estrato basal (estroma endométrico) muy denso formado por tejido conjuntivo. Los estratos anteriormente mencionados, compacto y esponjoso, son los que se descaman y disminuyen su grosor desde los 5mm a los 0.5mm durante la menstruación [1, 2]. En la Figura 1 se observan las dos capas principales de la pared uterina así como los estratos en que se divide.

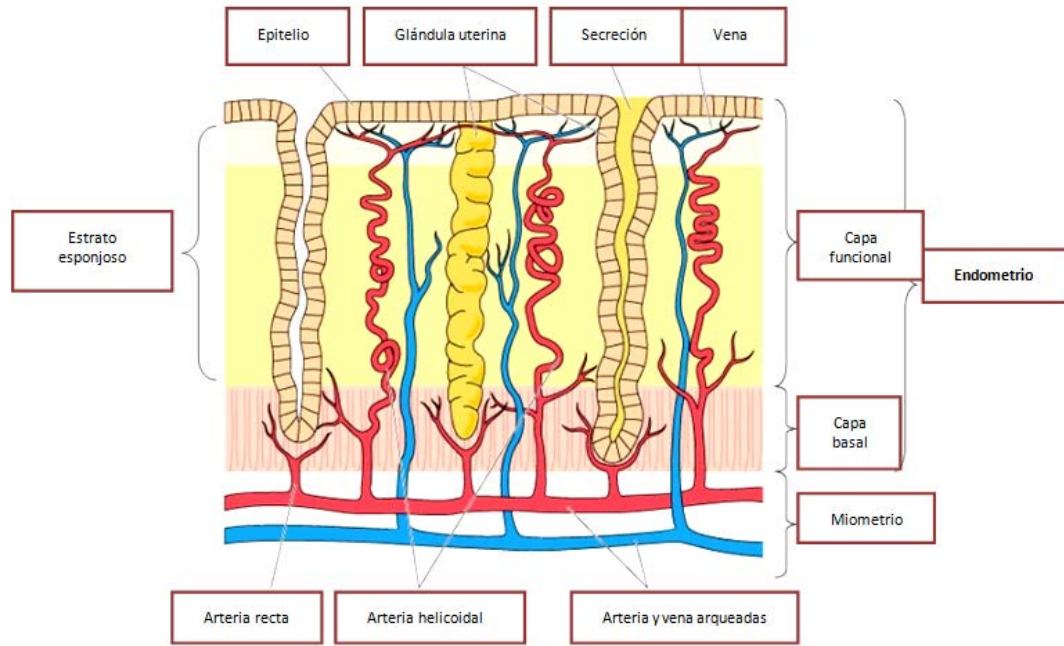


Figura 1. Esquema de la pared uterina. Se observan las dos capas principales: endometrio y miometrio.

El cuerpo del útero, además del endometrio, se compone de otras dos capas más externas: el miometrio o capa muscular y el perimetrio, capa serosa externa (Figura 2). De todas estas capas es en el endometrio en el que se desarrollan la mayoría de los tumores del tracto genital femenino.

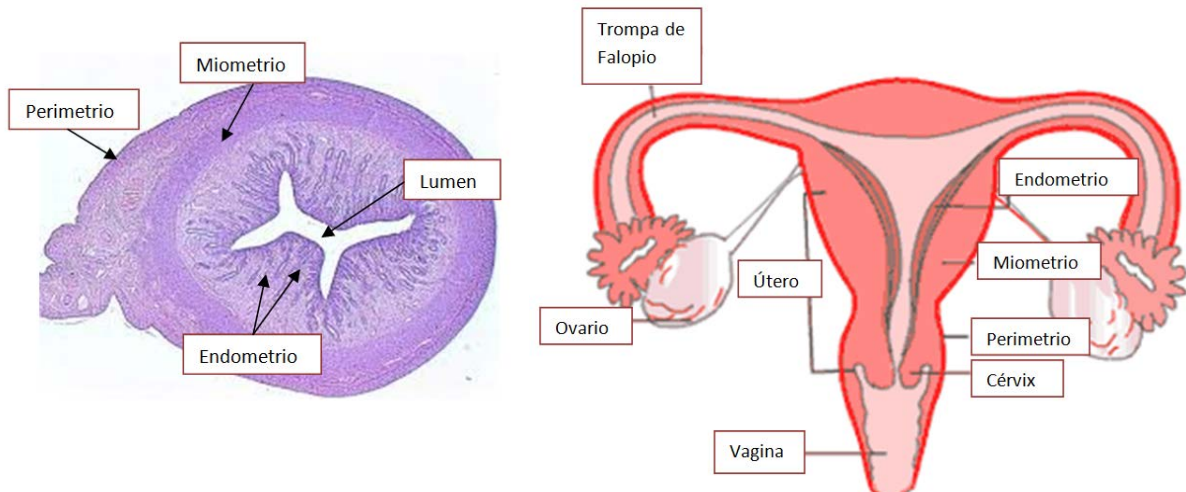


Figura 2. Esquema representativo de las diferentes capas que forman el útero. Foto real de un corte horizontal de un útero (izquierda) y dibujo de un corte vertical (derecha).



## 2. El carcinoma de endometrio

El carcinoma de endometrio (CE) es un conjunto de tumores que se desarrollan en la membrana interna del útero. Como consecuencia se produce un crecimiento no controlado de las células de este órgano.

### 2.1. Epidemiología

El carcinoma de endometrio es la sexta neoplasia más frecuente en la población mundial femenina y el segundo tumor ginecológico más frecuente. Tiene una incidencia del 4.8%, causando aproximadamente 74.000 muertes al año (2.2% de las muertes por cáncer en mujeres) en el año 2008 [3] (Figuras 3 y 4).

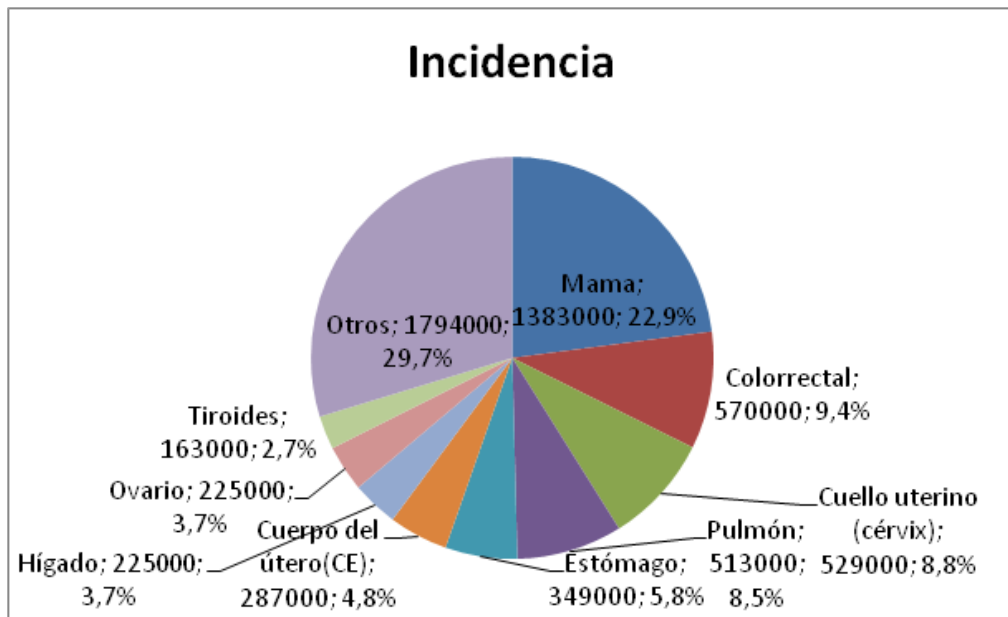


Figura 3. Gráfico sectorial en el que se representa la incidencia de los principales tipos de cáncer en la población femenina según la OMS.

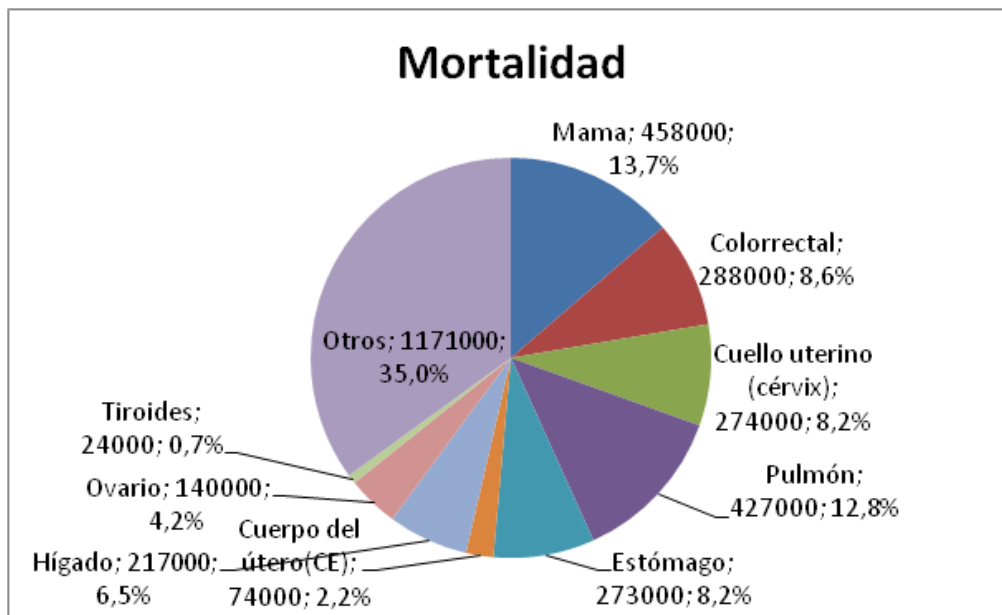


Figura 4. Gráfico sectorial en el que se representa la mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población femenina según la OMS.

La incidencia del CE es mayor en los países industrializados que en los menos desarrollados, aumentando hasta un 5.8% [3]. El número de casos aumenta con la edad debido, principalmente, al incremento en la obesidad, en la esperanza de vida y al uso de tamoxifeno [4]. La mayor incidencia se sitúa en torno a la séptima década de vida, situándose la media de edad a los 61 años [5]. La aparición de síntomas al comienzo de la enfermedad explica por qué la mayoría de mujeres con este tipo de tumor se diagnostican en estadios iniciales. Para todos los estadios en conjunto, la supervivencia se sitúa alrededor del 80%. Cabe destacar que existe una diferencia sustancial en el pronóstico entre los distintos tipos histológicos [6]. Este tumor se diagnostica en mujeres postmenopáusicas en un 75% de los casos, y la mayoría son carcinomas esporádicos, siendo tan sólo un 2-5% de los casos, tumores con un componente heredado [3].

## 2.2. Clasificación

La clasificación del carcinoma de endometrio se realiza atendiendo al perfil histológico, clínico-patológico y molecular. El principal tipo de CE es el adenocarcinoma (95% de los casos), lo que significa que se origina en la capa de células del epitelio endometrial y en las células de las glándulas.

### 2.2.1. Clasificación histológica

La clasificación histológica atiende tanto a las características clínicas como al tipo celular y al grado del tumor [6, 7]. Se siguen los criterios establecidos en 2003 por dos organismos: la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [8], distinguiéndose los siguientes tipos de CE según el grado de diferenciación celular:

- **Grado I (GI)**, cuando el 5% o menos de las células tienen un crecimiento sólido no escamoso ni morular (endometrioides de grado I) (Figura 5).
- **Grado II (GII)**, cuando entre el 6 y el 50% de las células tienen un crecimiento sólido no escamoso ni morular (endometrioides de grado II) (Figura 5).
- **Grado III (GIII)**, tienen cuando más del 50% de células tienen un crecimiento sólido no escamoso ni morular. Éstos tienden a ser agresivos y a tener un pronóstico menos favorable que los cánceres de menor grado (Figura 5).

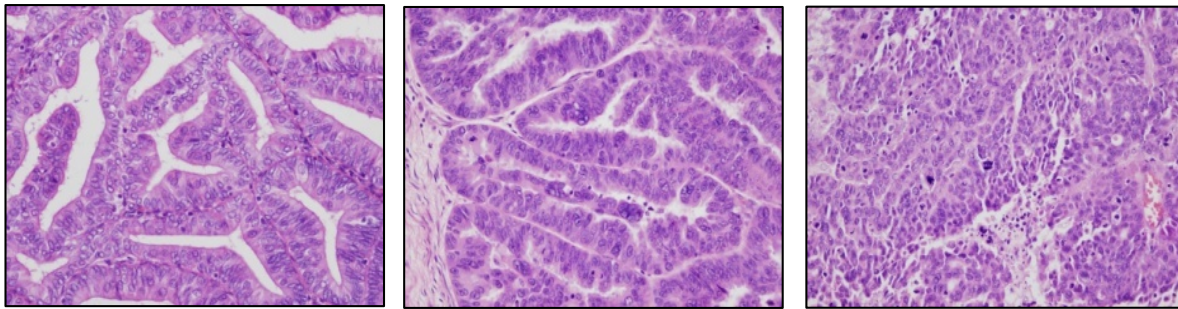


Figura 5. Cortes de tejido tumoral de CE de diferentes grados. Grado I (izquierda), grado II (centro) y grado III (derecha).

Los tumores de grados I y II se conocen normalmente como de “bajo grado”, mientras que los de grado III, se conocen de “alto grado”.

Por otro lado, atendiendo al tipo celular, los carcinomas de endometrio se clasifican en:

- **Adenocarcinoma endometriode:** más del 80% de los carcinomas de endometrio pertenecen a este subtipo, recibiendo esta denominación debido a que las células cancerosas son similares a las células endometriales normales. El pronóstico suele ser favorable [9]. Según las características citológicas existen diversas variantes dentro de este subtipo:
  - Variante con diferenciación escamosa: el tejido muestra áreas con cierta diferenciación de epitelio escamoso (25-50% de los casos). Este evento atípico podría estar relacionado con un mejor pronóstico [10].
  - Variante secretora: las células de esta variante se asemejan a etapas tempranas o medias de la fase secretora del ciclo menstrual. Contienen grandes vacuolas con glucógeno [11]. Las células poseen núcleos pequeños e hiper cromáticos, característica que diferencia esta variante del carcinoma de células claras.
  - Variante ciliada: se trata de una variante en la que la mayoría de sus células son ciliadas, con una apariencia similar al epitelio de las trompas

de Falopio. Esta lesión se diferencia del epitelio ciliado sano por una citología atípica [12].

- Variante papilar o villoglandular: posee características bien diferenciadas en el epitelio de los fondos papilares y por lo general es de grado II [13].
  
- **Adenocarcinoma seroso**: representa alrededor de un 10% de los tumores uterinos. Es un subtipo muy agresivo y con un mal pronóstico. Las células de este subtipo tumoral, similares a las del carcinoma seroso de ovario, tienden a colonizar espacios vasculares atravesando el parénquima uterino y el miometrio. Es por ello que muchos de los casos presentan metástasis al diagnóstico [14] (Figura 6).
  
- **Adenocarcinoma mixto**: es un carcinoma de mal pronóstico con diferenciación tanto endometriode como no endometriode (bajo y alto grado). Representan un 10% del total de tumores endometriales [13].
  
- **Adenocarcinoma de células claras**: se trata de un carcinoma de alto grado que comprende al 4% de los tumores uterinos y tiene peor pronóstico que el carcinoma endometriode [15]. Estos tumores no presentan una localización concreta (Figura 6).
  
- **Otros carcinomas**: existen otros tumores endometriales que se presentan con una frecuencia muy baja. Algunos de estos subtipos son:
  - Carcinoma de células escamosas: tumor raro que suele presentar síntomas como secreciones y sangrados. Es de difícil diagnóstico ya que a través de una biopsia se puede confundir el tejido con epitelio del ectocérvix sano [16].
  
  - Carcinoma de células pequeñas: es un subtipo muy agresivo que presenta marcadores neuroendocrinos comunes y pueden distinguirse por la presencia de gránulos densos típicos [17].

- Carcinoma de células transicionales: es un tumor con muy baja frecuencia cuyas células se asemejan a células transicionales de carcinoma de bazo [13].
- Adenocarcinoma mucinoso: es un tumor de bajo grado y buen pronóstico que presenta células que contienen mucina intracitoplasmática [18].
- **Sarcomas**: comprenden al 2-5% de los tumores uterinos y sus variantes más comunes son, el carcinosarcoma (también llamado tumor Mülleriano mixto maligno), el leiomiosarcoma y el sarcoma del estroma. El carcinosarcoma representa al 50% de los sarcomas uterinos y está formado por una mezcla de epitelio maligno (generalmente carcinoma endometriode) con componente estromal [19] (Figura 6).

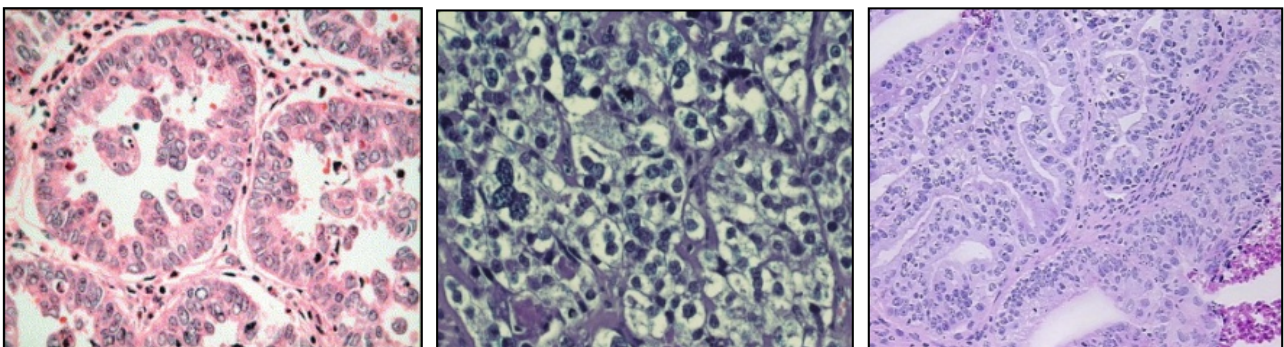


Figura 6. Cortes de algunos subtipos de CE. Adenocarcinoma seroso (izquierda), de células claras (centro) y carcinosarcoma (derecha).

### 2.2.2. Clasificación clínico-patológica

Esta clasificación, propuesta por Bokhman, divide a los carcinomas endometriales de una forma dualista [20], los estrógeno-dependientes o tipo 1 (endometrioides) y los no estrógeno-dependientes o tipo 2 (no endometrioides).

Los carcinomas de tipo 1 o endometrioides representan la mayor parte de los casos (70-80%) y son generalmente de bajo grado (I y II). Presentan un pronóstico favorable debido a la pronta detección y a que el tratamiento suele ser sencillo, puesto que la histerectomía en muchas de las pacientes es suficiente [21, 22]. Este tipo tumoral aparece en mujeres pre- y postmenopáusicas, y durante el desarrollo del tumor puede coexistir o haber sido precedido por hiperplasias complejas atípicas o endometriales. En estas neoplasias se expresan normalmente receptores de estrógenos y progesterona [23, 24].

Los demás carcinomas endometriales pertenecen al grupo de tumores no endometrioides o tipo 2. Son considerados de alto grado y presentan un peor pronóstico que los de tipo 1 [25]. Los carcinomas de tipo 2 suelen aparecer en mujeres postmenopáusicas y generalmente no expresan receptores hormonales; se trata de casos en los que no ha habido una estimulación estrogénica previa [26]. Estos tumores presentan mayor agresividad; además, se detectan en estadios más avanzados y en algunos casos pueden aparecer lesiones precancerosas (atrofia o pólipos).

Dependiendo de cuándo se detecte el tumor, el pronóstico es muy diferente. En muchos casos, los signos clínicos que aparecen (sangrado uterino, dolor al orinar, al mantener relaciones sexuales o en el área pélvica) permiten una detección en un estadio inicial, es decir, sin invasión de las capas internas del útero (75% de los casos diagnosticados) [6], teniendo en este caso una alta probabilidad de supervivencia a los 5 años. Si el tumor se diagnostica cuando ya ha habido invasión del miometrio y del sistema linfovascular, la probabilidad de supervivencia disminuye notablemente, además se incrementa el riesgo de una recidiva [27]. En la Tabla 1 se muestra un resumen de las características clínicas de los dos tipos de carcinoma de endometrio:

Tabla 1. Resumen de las características clínicas del carcinoma de endometrio.

TIPO 1 (endometrioides) (75-85%)	TIPO 2 (no endometrioides) (15-25%)
Peri- o postmenopausia.	Más edad.
Asociado a estrógenos, obesidad, diabetes mellitus, menstruaciones anovulatorias, infertilidad e hiperplasia endometrial.	No se han identificado factores de riesgo. Duración corta de síntomas.
Bien diferenciados.	Poco diferenciados.
Invasión más superficial.	Invasión miometrial profunda.
Histología favorable, subtipos: Endometriode, mucinoso y secretor.	Histología desfavorable, subtipos: Seroso, de células claras, mixtos y carcinosarcoma.
Receptores hormonales (+). Buen pronóstico.	Receptores hormonales (-). Mal pronóstico.

### 2.2.3. Clasificación molecular

Esta clasificación atiende a los perfiles moleculares de cada tipo de carcinoma endometrial. De acuerdo a esta clasificación, los carcinomas se pueden diferenciar en endometrioides (EEC) y no endometrioides (NEEC), aunque una clasificación más precisa diferencia entre los distintos grados.

- **EEC:** Se caracterizan por mutaciones en los genes KRAS, FGFR2, CTNNB1, PTEN y PIK3CA [28-31]; más recientemente se han encontrado mutaciones frecuentes en ARID1A (26-29% GI y GII, 39%GIII) [32, 33], PIK3R1 y PIK3R2 [34, 35]. También es común encontrar alteraciones en genes implicados en la reparación de emparejamientos erróneos, por lo que es frecuente en este tipo de CE la inestabilidad de microsatélites (MSI, Microsatellite Instability) [36, 37].
- **NEEC:** Presentan menor frecuencia de mutaciones en los genes alterados en EEC y alta frecuencia de mutaciones en genes como TP53, CDKN2A y CDH1 [38-40]. En este segundo tipo de tumores también se presentan pérdidas de expresión de EGFR/ERBB1 y HER2/ERBB2 así como pérdidas de heterocigosidad (LOH) [41-43]. Principalmente asociados a carcinomas serosos,



se han encontrado mutaciones en los genes PPP2R1A, FBXW7 y CDH4 [44, 45].

Estudios más recientes han demostrado la presencia de mutaciones en el gen de la polimerasa- $\epsilon$  (POLE), lo que permite la clasificación de los carcinomas endometriales en cuatro subtipos, POLE ultramutados, MSI hipermutados, con bajo número de copias y con alto número de copias [46-48].

#### **2.2.4. Puntos a tener en cuenta en la clasificación del carcinoma de endometrio**

Existen algunos tipos histológicos de carcinomas endometriales que poseen características clínico-patológicas y perfiles moleculares muy heterogéneos, por lo que no siempre es fácil su clasificación. Hay algunos tumores que poseen similitudes con los tipos 1 y 2 y hay evidencias de que algunos tumores de tipo 2 podrían originarse a partir de los de tipo 1. Esto sugiere que habría que tener en cuenta que estos tumores pertenecen a otro grupo diferente a la hora de poner un tratamiento. Algunos de estos tumores con características intermedias son los carcinomas endometrioides de grado III, los mixtos y algunos carcinosarcomas [49] (Figura 7).

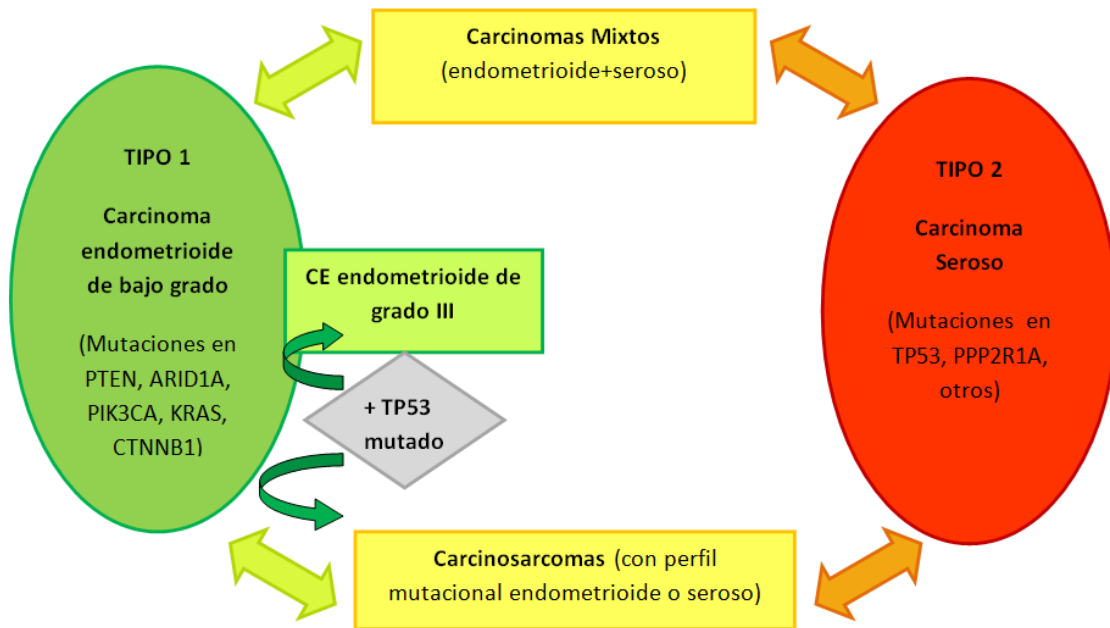


Figura 7. Clasificación de algunos tipos de carcinomas endometriales con características intermedias, situándose entre los dos tipos principales de CE. Basado en la Figura 3 de *McConechy et al. 2012* [49].

### 3. La autofagia

**La palabra autofagia proviene del griego *auto-* (a sí mismo) y *-phagos* (comer).**

La autofagia es una ruta de degradación lisosomal altamente regulada y muy conservada evolutivamente. Es una vía de degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, glucógeno y nucleótidos) y también de orgánulos [50, 51]. Numerosos estudios han demostrado que la autofagia juega un papel esencial en el desarrollo y la diferenciación. Se ha visto que la desregulación de esta vía está implicada en el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades infecciosas, la obesidad, el envejecimiento y desórdenes neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington) [52-54].

En organismos eucariotas existen tres tipos principales de autofagia, la mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia. La autofagia mediada por chaperonas es aquella que permite que se importen al lisosoma proteínas solubles, sin plegar y con un motivo de un pentapéptido particular. Por otro lado, la microautofagia es la vía en la que el material citoplasmático es directamente engullido en la superficie del lisosoma mediante reestructuración de la membrana del mismo. Por último, la macroautofagia (a partir de ahora nos referiremos a ella como autofagia) es aquella ruta en la que se produce el secuestro de citoplasma en una vesícula de doble membrana (el autofagosoma) que posteriormente se fusionará con un lisosoma (formando un autofagolisosoma) para degradarse por hidrolasas lisosomales [55].

Aunque el estudio de la autofagia comenzó hace muchos años, el conocimiento del mecanismo molecular comenzó con el descubrimiento de los genes ATGs (Autophagy-related Genes) en experimentos con levaduras. Muchos de estos ATGs poseen ortólogos en eucariotas superiores. En la Tabla 2 se muestran algunos de los

genes ATG en levaduras y en mamíferos, así como los complejos proteicos a los que pertenecen [56, 57].

**Tabla 2. Genes ATG identificados en levaduras y sus ortólogos en mamíferos y sus funciones.**

COMPLEJO/SISTEMA	LEVADURAS	MAMÍFEROS	CARACTERÍSTICAS/FUNCIONES
<b>Complejo Atg1/ULK</b>	Atg1	ULK1/2	Proteína serina/treonina kinasa
	Atg13	ATG13	Regulador del complejo mediante fosforilación. Señalización de mTOR
	Atg17	RB1CC1/FIP200	Componente del complejo Atg1
	Atg29		Componente del complejo Atg1
	Atg31		Componente del complejo Atg1
		C12orf44/ATG101	Componente del complejo ULK en mamíferos
<b>Sistema ATG9</b>	Atg2	ATG2	Proteína de membrana periférica
	Atg9	ATG9	Proteína transmembrana
	Atg18	WIPI1/2	Proteína de membrana periférica
<b>Complejo PI3K de clase III</b>	Vps15	PIK3R4/VPS15	Proteína serina/treonina kinasa
	Vps34	PIK3C3/VPS34	PI3K
	Vps30/Atg6	BECN1	Componente del complejo PI3K (I y II en levaduras)
	Atg14	ATG14	Subunidad del complejo PI3K (I en levaduras)
<b>Sistemas de conjugación tipo ubiquitina</b>	Atg3	ATG3	Enzima tipo E2 para la conjugación de Atg8
	Atg4	ATG4A-D	Cisteín proteinasa: activación y deslipidación de Atg8
	Atg5	ATG5	Conjugado Atg5-Atg12
	Atg7	ATG7	Enzima tipo E1
	Atg8	LC3A,B,B2,C, GABARAP,L1,L2	Ubl, se conjuga con PE
	Atg10	ATG10	Enzima tipo E2 para la conjugación de Atg12
	Atg12	ATG12	Ubl
Atg16	ATG16L1,L2	Componente del complejo Atg12-Atg5-Atg16	

Tabla modificada de Mizushima et al. 2011 y Pyo et al. 2012 [56, 57].

El proceso principal de la ruta de autofagia es la formación de una estructura de doble membrana, el autofagosoma, y la translocación del mismo al lisosoma, proceso que es llevado a cabo por un macrocomplejo proteico (*core autophagy machinery*). Los principales complejos que participan son: 1) el complejo de la kinasa ULK, que incluye a ATG13, ATG101 y FIP200; 2) el complejo PI3K de clase III/Beclin1, formado por Vps34 (PIK3C3), Vps15 (PIK3R4), Beclin1 y ATG14. Otras moléculas que interactúan con este complejo son: Bif-1 (SH3GLB1/endophilin B1), UVRAG y

Rubicon [58-60]; 3) el sistema de conjugación de ATG12 (ATG12, ATG7, ATG10, ATG5 y ATG16); 4) el sistema de conjugación Atg8/LC3 que incluye a LC3, ATG4, ATG7 y ATG3; 5) el sistema de la proteína transmembrana ATG9 (ATG9-ATG2-WIP1/2); y 6) proteínas asociadas a la fusión autofagosoma-lisosoma. Estos complejos proteicos participan en las diferentes etapas de la ruta de autofagia.

### 3.1. El proceso de autofagia: etapas y proteínas que intervienen

La autofagia es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas. Inicialmente, tras el estímulo necesario (deprivación de nutrientes, hipoxia, estrés genotóxico, etc.), se produce la inducción de la autofagia y una porción del citoplasma, incluyendo orgánulos, es englobada por membrana aislada (el fagoporo). Posteriormente, tras una etapa de nucleación y de expansión de la doble membrana se forma un autofagosoma, que se fusionará con un lisosoma para formar el autofagolisosoma en el que se degradará el contenido por la acción de enzimas lisosomales [61, 62] (Figura 8).

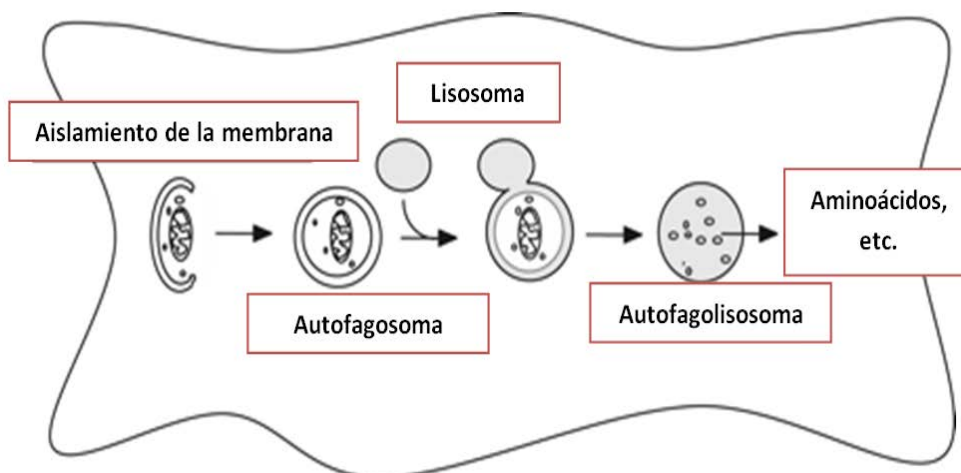


Figura 8. Esquema del proceso de autofagia. Modificado de Mizushima et al. 2011 [61].

### **3.1.1. Inducción**

#### **3.1.1.1. Complejo ULK1/2**

Las proteínas ULK1 y ULK2 (unc-51-like kinase 1 y 2) son las homólogas a Atg1 de levaduras. Se cree que estas dos proteínas podrían tener una función redundante en la regulación de la autofagia. El dominio conservado C-terminal de ULK1, que contiene una señal de unión a membrana, posee un papel dominante negativo en autofagia, y el reclutamiento de proteínas ATG al fagoporo es dependiente de la actividad kinasa de ULK1/ULK2 [63].

Los principales componentes de este complejo son ULK1/2, ATG13 y RB1CC1/FIP200. Este complejo, al contrario que en levaduras, se forma incluso en condiciones ricas en nutrientes [63].

El principal regulador de la autofagia (“aguas arriba”) es mTOR. Esta molécula participa en el control de muchos procesos celulares en respuesta a estímulos tales como cambios en la concentración de nutrientes [64]. La actividad del complejo kinasa ULK1 es regulada por el complejo 1 de mTOR (mTORC1) dependiendo de la concentración de nutrientes.

Bajo condiciones ricas en nutrientes, mTORC1 activado interactúa con el complejo kinasa ULK1 (ULK1-ATG13-FIP200-ATG101) y se fosforilan ULK1 y ATG13. La fosforilación de estas moléculas inhibe el marcaje de membrana del complejo kinasa ULK1 y se inhibe la autofagia. Sin embargo, en condiciones sin nutrientes (“starvation”), mTORC1 inactivado se disocia del complejo y el complejo kinasa ULK1 queda libre para fosforilar a otros componentes como ATG13 y FIP200 (dentro del complejo ULK1/2) (Figura 9), llevando esto a una inducción de la autofagia [65].

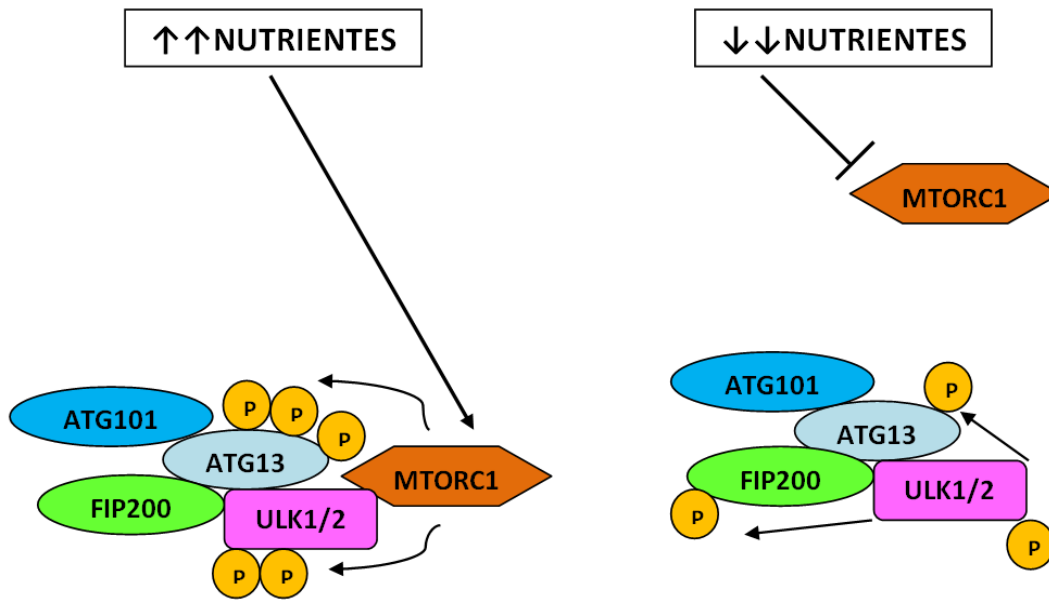


Figura 9. Regulación del complejo de ULK1/2 a través de MTORC1. En condiciones ricas en nutrientes, MTORC1 se encuentra activo y fosforila a ULK1/2 y a ATG13 (izquierda), inhibiéndose la autofagia. En condiciones de ayuno, MTORC1 está inactivo y ULK1/2 puede fosforilar a ATG13 y a FIP200 (derecha), induciéndose la autofagia.

Además de la fosforilación, existen otros tipos de modificación transcripcional como la acetilación, que pueden regular la autofagia a través de ULK1 [66].

### 3.1.2. Nucleación

#### 3.1.2.1. Complejo PI3K de clase III

La formación del autofagosoma comprende varias etapas, el complejo PI3K de clase III interviene de forma esencial en la etapa de nucleación de la membrana aislada durante la autofagia [67], mientras que el complejo PI3K de clase I también interviene en la autofagia pero a través de la señalización de la cascada de la insulina mediante la que se activan mTOR y PKB (AKT) [68].

Los componentes principales de dos de los complejos PI3K de clase III son PIK3C3/VPS34, BECN1/Beclin1 (Atg6), y PIK3R4/p150. Uno de estos dos complejos, además, contiene a la proteína ATG14/ATG14L/Barkor que es requerida

específicamente para la autofagia. El otro complejo, contiene a UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene, homólogo de Vps38) y media la endocitosis pero también regula la autofagia [69]. Un tercer complejo PI3K de clase III contiene a la proteína Rubicon.

- **PIK3C3 y PIK3R4:**

La proteína PIK3C3 interactúa tanto con ATG14 como con Beclin1 a través del mismo dominio C2. En condiciones ricas en nutrientes PIK3C3 forma acúmulos que colocalizan con UVRAG casi completamente, mientras que tras un periodo de ayuno, parte de estos acúmulos colocalizan con ATG14 [69]. Para el marcaje de la membrana y la correcta actividad de PIK3C3 es requerida la proteína PIK3R4, necesaria para la activación de PIK3C3 por Beclin1 y UVRAG [70].

- **BECN1 (Beclin1):**

El homólogo de Atg6 en mamíferos, Beclin1, fue identificado como una proteína de interacción con BCL-2 [71]. Beclin1 interacciona con PIK3C3 tras la fosforilación de este por CDK1 durante la mitosis [72]. Beclin1 se asocia al complejo, promoviendo su actividad catalítica e incrementando el nivel de PI(3)P. Al contrario que en levaduras, en las que Atg6 es necesario para la actividad que el complejo Vps34 desempeña en la autofagia y en el tráfico endocítico, en mamíferos, Beclin1 solo es requerido en la autofagia, lo que sugiere un papel de Beclin1 como ligando de PIK3C3 en la ruta [73].

Dependiendo de los diferentes complejos que forma Beclin1, la autofagia se regula en distintas etapas y de forma diferente. Por ejemplo, los complejos ATG14–Beclin1–PIK3C3–PIK3R4 y UVRAG–Beclin1–PIK3C3–PIK3R4 son reguladores positivos del proceso, mientras que KIAA0226/Rubicon–UVRAG–Beclin1–PIK3C3–PIK3R4 es un inhibidor [59, 74]. Otra regulación positiva de la ruta es a través de la



interacción con AMBRA1 (activating molecule in BECN1- regulated autophagy), lo que posee gran importancia en el desarrollo del sistema nervioso en el embrión [75].

- **ATG14 (Barkor):**

Esta molécula es de importancia en la formación del autofagosoma. Posee una región “coiledcoil” que es necesaria para la unión con PIK3C3 y Beclin1 [69]. Bajo condiciones ricas en nutrientes, la mayor parte de ATG14 se encuentra dispersa por el citosol, en cambio, en ayuno se induce la formación de acúmulos de ATG14 en el fagoporo, colocalizando parte de los mismos con marcadores del retículo endoplásmico [59]. La sobreexpresión de ATG14 aumenta la actividad kinasa de PIK3C3, induciendo la autofagia, mientras que un “knockdown” de esta proteína impide la actividad de PIK3C3, suprimiendo el proceso autofágico [74, 76]. Se cree que Barkor se une directamente a la membrana compuesta por PI(3)P generado por PIK3C3, regulando la nucleación del autofagosoma mediada por el complejo PI3K de clase III [77]. Por esta unión específica, Barkor es capaz de detectar y mantener la curvatura de la membrana necesaria para la formación de la membrana del autofagosoma.

- **UVRAG, SH3GLB1 (Bif1) y KIAA0226 (Rubicon):**

De estas tres moléculas, UVRAG es la que regula la autofagia mediante la interacción con las otras dos o con otras proteínas. Esta homóloga de la proteína Vps38, compete con ATG14 por la unión con PIK3C3. El complejo UVRAG-Beclin1-PIK3C3-PIK3R4 dirige al complejo PI3K de clase III a funcionar en la maduración del autofagosoma, mientras que el que forma ATG14, ATG14- BECN1-PIK3C3-PIK3R4, actúa al inicio de la formación del fagoporo. Por otro lado, UVRAG interacciona con SH3GLB1/Bif1 (Bax-interacting factor 1), y la interacción SH3GLB1/Bif1-BECN1 a través de UVRAG activa al complejo PI3K de clase III para estimular la autofagia [60].

Por último, UVRAG forma un complejo con KIAA0226/Rubicon (RUN domain- and cysteine-rich domain-containing Beclin1-interacting protein), KIAA0226/Rubicon–UVRAG–BECN1–PIK3C3–PIK3R4, el cual se sitúa en el endosoma tardío y regula la maduración del autofagosoma de forma negativa [59, 74].

El complejo PI3K de clase III es esencial en el proceso autofágico y regula la ruta eficazmente, uniéndose a una u otra proteína de forma que la regulación puede ser positiva o negativa (Figura 10).

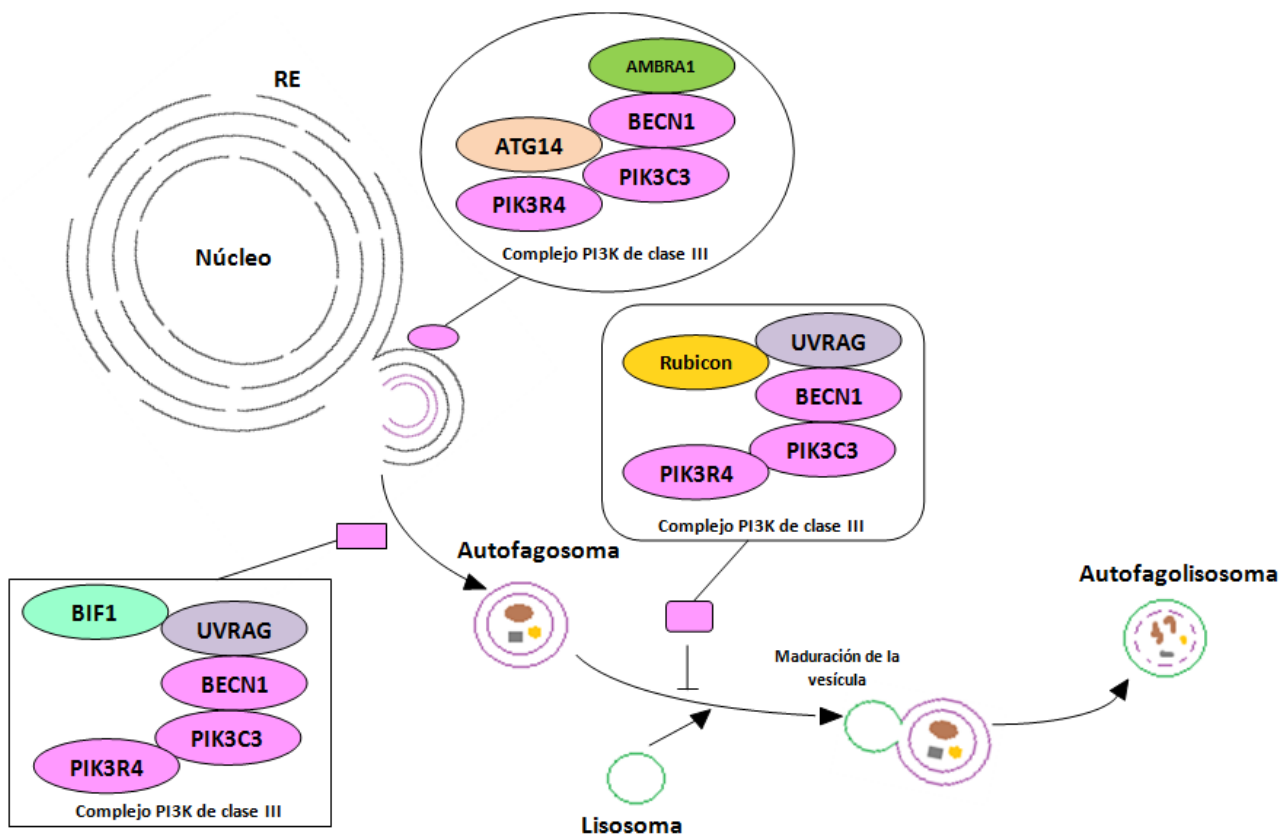


Figura 10. Complejos PI3K de clase III. Las proteínas BECN1, PIK3C3 y PIK3R4 forman el núcleo del complejo. El complejo que contiene a la proteína ATG14 y a la molécula moduladora AMBRA1 interviene en la formación del fagoporo, otro complejo con UVRAG y Bif1 actúa sobre la formación del autofagosoma y el tercer complejo, con UVRAG y Rubicon, regula de forma negativa la maduración del autofagosoma. [RE: retículo endoplásmico].

### **3.1.3. Expansión de la membrana del autofagosoma**

La expansión de la membrana aislada sucede mediante la elongación de la misma, simultáneamente a la nucleación de las vesículas. En esta etapa intervienen principalmente dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Ubiquitin-like, Ubl).

#### **3.1.3.1. Sistema de conjugación de ATG12**

La conjugación entre ATG12 y ATG5 se realiza a través de la glicina C-terminal de ATG12, que se activa mediante la unión por un enlace tioéster de alta energía con el residuo Cys572 de ATG7 (E1-like). Después, ATG12 es transferida a ATG10 (E2-like) y, finalmente, se une a un residuo de lisina de ATG5 mediante un enlace isopeptídico [78, 79]. Posteriormente, el complejo ATG12-ATG5 interacciona con ATG16L1 para formar un complejo proteico multimérico. ATG5 (pero no AT12) es necesario para el marcaje de la membrana por parte de ATG16L1 [80] (Figura 11).

#### **3.1.3.2. Sistema de conjugación de ATG8**

Este segundo sistema de conjugación, se basa en la modificación de LC3 (homólogo de Atg8) mediante la lipidación con fosfatidiletanolamina (PE), siendo esto esencial en el proceso de formación de los autofagosomas [81]. La cisteína proteasa, ATG4 (ATG4B), elimina los aminoácidos situados hacia el extremo C-terminal del último residuo de glicina del LC3 recién sintetizado (proLC3), para formar el LC3 citosólico (LC3-I). LC3-I se conjuga con PE a través de ATG7 y ATG3 (E2-like) transformándose en la forma lipidada LC3-II. LC3-II se asocia con la membrana recién formada del autofagosoma. LC3-II se mantiene en los autofagosomas maduros hasta su unión con los lisosomas [82] (Figura 11).

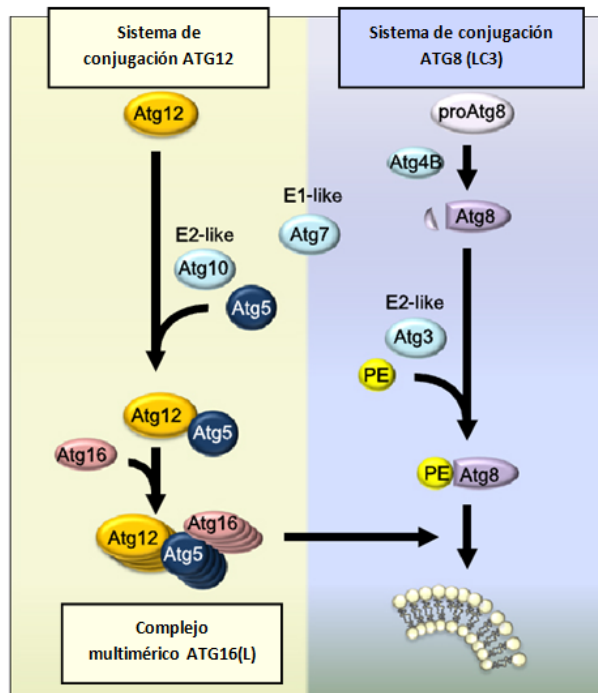


Figura 11. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Modificado de Pyo *et al.* 2012 [57].

Existen evidencias de que podría haber un acoplamiento de los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina puesto que la sobreexpresión de ATG3 (complejo de Atg8) facilita la conjugación ATG12-ATG5 [83].

### 3.1.4. Fusión y degradación lisosomal

En una última etapa del proceso es esencial que el autofagosoma maduro se fusione con un lisosoma o endosoma tardío para formar un autofagolisosoma. Tras la fusión el contenido es degradado por hidrolasas lisosomales.

Cuando el autofagosoma está maduro (formado completamente), LC3-II, que estaba unido a la membrana, se separa de la PE (se deslipida) mediante la acción de ATG4 y vuelve al citosol [84]. El evento de fusión del autofagosoma al lisosoma requiere la presencia de LAMP-2 (proteína lisosomal de membrana) y Rab7 (GTPasa) [85, 86].

Numerosos estudios han identificado varias moléculas reguladoras de la maduración del autofagosoma y su degradación. Estas incluyen a UVRAG, Rubicon, presenilina-1, VCP (valosin-containing protein) y proteínas del complejo de la sintaxina-5 SNARE [59, 87-90]. ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) se ha descrito también como un regulador que desempeña un importante papel en la fusión lisosoma-autofagosoma [91]. La maquinaria de este complejo ha sido identificada por ser necesaria para el cierre del fagoporo, la fusión del autofagosoma y la biogénesis lisosomal [92-94].

Los productos de degradación, particularmente aminoácidos, son finalmente transportados al citosol para sintetizar nuevas proteínas y mantener las funciones celulares en condiciones de ayuno.

### **3.2. Origen de la membrana**

El origen de las membranas que forman los autofagosomas es muy discutido, aunque se han propuesto varias posibles fuentes. La primera hipótesis, es la formación *de novo* de la membrana del autofagosoma a partir de los depósitos de ATG9 [95]. Se cree que ATG9 interviene en un proceso cíclico, realizando un transporte desde el trans-Golgi network (TGN) hasta los endosomas tardíos (marcados con LC3 cuando se está induciendo la autofagia). En la célula, la redistribución de ATG9 desde el TGN al endosoma tardío es dependiente de ULK1 y ATG13 [96]. Otras hipótesis sostienen que el origen podría ser algún orgánulo como el retículo endoplásmico, la mitocondria o la membrana plasmática. Se ha identificado una estructura en forma de cáliz, el omegasoma (una región del retículo), como una plataforma para la formación del autofagosoma [97]. ULK1, LC3 y el complejo de ATG5 parecen ser reclutados al omegasoma en situación de ayuno, y de esta estructura parecen emerger membranas que

contienen LC3 y ATG5. También se ha observado que los omegasomas se forman en proximidad de vesículas unidas a VPS34, las cuales sintetizan el PI(3)P. Esta hipótesis se sustenta ya que parece existir una asociación física entre el retículo endoplásmico y las membranas autofágicas en una etapa temprana [98].

### **3.3. Autofagia selectiva**

La autofagia se ha considerado generalmente como un proceso de degradación no selectivo, pero con los años se encontraron evidencias de que la autofagia podía eliminar de forma específica agregados proteicos, orgánulos dañados o patógenos invasores [99]. En la autofagia selectiva el material a degradar es reconocido a través de interacciones con proteínas receptoras específicas. Una de las funciones de la autofagia es la eliminación de sustratos citosólicos ubiquitinados o agregados proteicos. Este proceso es selectivo y se realiza principalmente a través de la proteína p62/squestosome1 (SQSTM1) [100]. p62 se une directamente a poli- o monoubiquitinas a través de su dominio UBA (ubiquitin-associated domain) y a la proteína LC3 (a través de un motivo tipo WXXL), esto conecta al material ubiquitinado con la maquinaria autofágica de degradación [101]. p62 desempeña múltiples funciones en remodelamiento óseo, obesidad, inflamación, cáncer, etc [102-104].

Defectos en la autofagia selectiva conlleva la interrupción de la homeostasis tisular y resulta en diversas enfermedades, indicando la gran importancia fisiológica de este sistema. Una autofagia defectuosa suele acompañarse de la acumulación de agregados de p62, lo que apoya la idea de que p62 actúe como una proteína clave en varias cascadas de señalización como son la de NF- $\kappa$ B, la apoptosis y la activación de Nrf2 [105, 106].

Debido a las múltiples funciones que desempeña p62 y a su capacidad de interacción con un gran número de proteínas, es un regulador central de la tumorigénesis a través de su capacidad de modular (y ser sustrato de) la autofagia, controla los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de proteínas mal plegadas, y garantiza el paso de las células a través de la mitosis, todos ellos son factores importantes en el cáncer [107]. La proteína p62, es rica en secuencias de interacción con otras proteínas, lo que pone de manifiesto su papel como regulador central más que como una molécula para el mero ensamblaje de otras [108] (Figura 12).

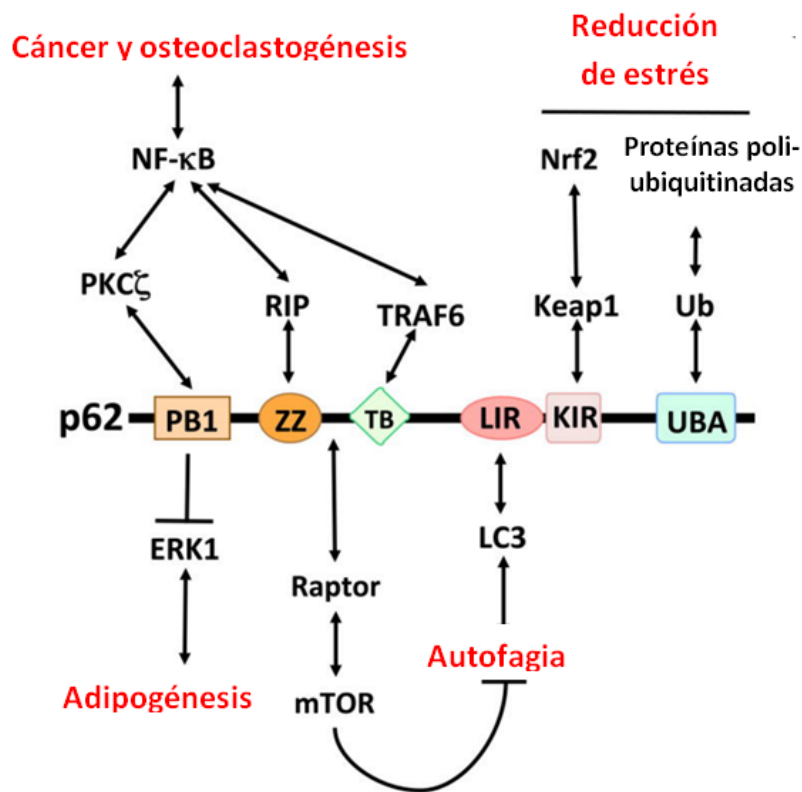


Figura 12. Proteínas de interacción con p62 y sus funciones. El dominio PB1 de p62 se une e inhibe a ERK1, crucial para la regulación negativa de la adipogénesis y la obesidad y la inflamación resultante. p62 también interacciona con PKC $\zeta$  a través de una interacción PB1-PB1. El dominio ZZ (dedo de zinc) se une a RIP, lo que conecta a p62 con la activación de NF- $\kappa$ B en la ruta de TNF. El dominio TB se une a TRAF6, lo que es relevante tanto en la osteoclastogénesis inducida por RANK como en la tumorigénesis inducida por Ras. p62 también interacciona con Raptor lo que impide la autofagia a través de la activación de mTOR. Esta inhibición de la autofagia, mediante la capacidad de p62 de interaccionar con LC3, sirve para controlar los niveles de p62. La interacción de Keap1 podría ser importante para la regulación de Nrf2 y el control de los niveles de ROS. Por último, el dominio UBA regula la interacción de p62 con proteínas poliubiquitinadas marcadas para la degradación por el proteasoma o la autofagia. Modificado de *Moscat et al. 2012* [107].

### 3.4. Autofagia y cáncer

La observación de que en células tumorales existe una disminución de la autofagia sugería que podría actuar como supresor tumoral [109, 110]. Una posible explicación para la autofagia deficiente observada en tumores, es la “hiperactivación” de la ruta PI3K de clase I que ocurre frecuentemente en las células cancerígenas, lo que induciría la activación de mTORC1 (inhibidor de la autofagia en estado activado). Oncoproteínas pertenecientes a esta vía, como son PI3K (PIK3CA) o AKT1 activada son potentes inhibidores de la autofagia [111, 112]. Asimismo, supresores tumorales de esta ruta, como PTEN, son activadores de la autofagia [112], y lo mismo ocurre con supresores tumorales que regulan a mTORC1 tal como LKB1 [113].

#### 3.4.1. Supresores tumorales de la ruta de autofagia

Varias moléculas que intervienen directamente en la ruta de autofagia se consideran como supresores tumorales, tales como BECN1, UVRAG o BIF1.

##### - **BECN1 (Beclin1):**

La primera conexión entre la autofagia y el cáncer fue establecida a través de la identificación del gen BECN1 como un supresor tumoral haploinsuficiente que está deletado monoalélicamente en gran proporción de cánceres esporádicos como el de mama u ovario [110]. Se ha observado que la sobreexpresión de Beclin1 en células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) inhibe la proliferación y la clonalidad *in vitro* e inhibe también la tumorigénesis en ratones desnudos. Consistente con estos descubrimientos, Beclin1 se encuentra poco expresada en muchos tumores humanos [110].



Beclin1 contiene un dominio BH3 de interacción con Bcl-2 y otras proteínas antiapoptóticas. Al contrario que otras proteínas BH3, Beclin1 no estimula la apoptosis cuando está sobreexpresada, y Bcl-2 no pierde su potencial antiapoptótico por la unión con Beclin1. Por otro lado, la interacción con Bcl-2 inhibe la actividad proautofágica de Beclin1 [114], ya que impide la unión de éste con PIK3C3 [110]. Según esto, Beclin1 no ejerce su función como supresor tumoral a través de su unión con Bcl-2, sino que esta función la realiza a través de su implicación en la autofagia. Esto plantea la posibilidad de que el potencial pro-tumoral de Bcl-2 podría no estar relacionado solo con su función antiapoptótica, sino también con su capacidad para unirse a Beclin1 [115].

- **UVRAG:**

Esta proteína se relacionó con la autofagia debido a su capacidad para regular positivamente a Beclin1 mediante la interacción directa entre ambas proteínas [88]. Un estudio en una línea tumoral de cáncer de colon con una deleción de un nucleótido (c.709delA) en UVRAG mostró una marcada reducción de esta proteína endógena así como una menor inducción de la autofagia comparada con células germinales (no mutadas). Además, el efecto de la autofagia inducida por UVRAG delecionado, causa un crecimiento independiente y produce tumores *in vivo*, demostrando que la proteína germinal de UVRAG suprime la proliferación comparada con la proteína truncada. Estos resultados apoyan el papel de UVRAG como supresor tumoral [88, 115].

- **BIF1:**

Otra proteína asociada con el complejo PI3K de clase III que se ha establecido como un gen supresor tumoral es BIF1. Se ha visto que la pérdida de la proteína suprime la formación del autofagosoma [60]. Tras un periodo de deprivación de

nutrientes, Bif1 se acumula en el citoplasma en forma de acúmulos que además contienen LC3, ATG5 y ATG9. Además, ratones “knockout” para BIF1 presentan una mayor tasa de tumores espontáneos [60].

Aunque los mecanismos por los que Bif1 suprime la formación tumoral no están totalmente claros, se cree, que al igual que Beclin1 o UVRAG, actúa a través de su participación en el proceso de autofagia aunque también podría actuar como supresor tumoral a través de la interacción con el efector pro-apoptótico Bax [116].

### **3.5. Regulación dual de la autofagia mediante p53**

Existe una regulación dual de la autofagia a través de p53. Se trata de uno de los genes supresores tumorales que más ampliamente se ha estudiado y que se encuentra mutado en alrededor del 50% de todos los cánceres [117]. p53 puede funcionar como regulador positivo o negativo de la autofagia dependiendo del tipo de estímulo que recibe la célula y de la localización subcelular de p53. El estrés genotóxico induce la autofagia a través de la activación de AMPK por p53 que, además, activa TSC1/TSC2, induciendo (provocando) una inhibición de mTOR [118]. Cuando p53 se encuentra en el núcleo, se induce la autofagia a través de la sobreactivación transcripcional de DRAM (damage-regulated modulator of autophagy) [119]. Por otro lado, la pérdida de p53 en el citoplasma puede también activar el proceso autofágico [117]. p53 puede por tanto funcionar como un inhibidor o un activador de la autofagia según se localice en el núcleo o en el citosol. Se ha demostrado que células (p53<sup>-/-</sup>) transfectadas con p53 mutante que se restringe al citosol para evitar una señalización nuclear, fallan en la restauración de la respuesta autofágica. En cambio, cuando p53 se restringe al núcleo, el fallo se produce en el bloqueo de la autofagia [117]. Por tanto, la proteína p53 nuclear actúa como un factor transcripcional inductor de la autofagia, mientras que la proteína

p53 citoplasmática funciona como un inhibidor de la ruta y su degradación es requerida para la inducción de la misma. A pesar de esto, la supresión tumoral mediada por p53 no es un mecanismo clave en el control de la autofagia, por lo que la regulación transcripcional de genes pro-autofágicos mediada por p53 debe tener un papel importante en esta supresión tumoral.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

---



El carcinoma de endometrio es el segundo tumor ginecológico más frecuente a nivel mundial, y es la primera neoplasia ginecológica en los países industrializados [3]. El 95% de los casos diagnosticados son de origen esporádico y tan solo un 2-5% de origen hereditario generalmente asociado a Síndrome de Lynch [3]. La mayor incidencia de esta enfermedad tiene lugar en torno a la séptima década de vida, situándose la media de edad a los 61 años [4].

La autofagia es una ruta de degradación lisosomal de macromoléculas y de orgánulos altamente regulada y conservada evolutivamente que desempeña un papel muy importante en el desarrollo y la diferenciación, y se ha demostrado que su desregulación está implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer [50-52]

Nuestra hipótesis es que variantes (polimorfismos) en genes implicados en autofagia pueden asociarse con modificaciones en la susceptibilidad a desarrollar carcinoma de endometrio y que diferencias en la expresión de proteínas implicadas en autofagia podrían relacionarse con los diferentes tipos de carcinoma de endometrio y ser consideradas dianas de nuevas estrategias terapéuticas de esta enfermedad. Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar si existe relación entre variantes polimórficas en algunos genes implicados en la ruta de autofagia y el carcinoma de endometrio.
2. Analizar la expresión de proteínas que participan en la ruta de autofagia en biopsias de tumores de pacientes con carcinoma de endometrio y estudiar el estado del proceso autofágico en tumores endometriales mediante el análisis conjunto de la expresión proteínas autofágicas.

- 3.** Analizar el efecto de los fármacos Panobinostat®, cloroquina y metformina, sobre la proliferación, el ciclo celular y la autofagia en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

---



## 1. Pacientes

En este trabajo se han utilizado 60 muestras de tejido de pacientes con carcinoma de endometrio (CE) esporádico procedentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Las muestras se obtuvieron por extirpación quirúrgica y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron analizadas para la determinación del tipo y grado histológico según las recomendaciones de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la Tabla 3 se muestra de forma detallada el número de pacientes de cada tipo y grado histológico:

**Tabla 3. Muestras de tejido tumoral de pacientes con CE distribuidas según el tipo y grado histológico.**

TIPO	GRADO	TUMOR	Nº DE MUESTRAS
<b>TIPO I ENDOMETRIOIDE (n=46)</b>	<b>BAJO GRADO (n=41)</b>	Grado 1	24
		Grado 2	17
		Grado 3	5
<b>TIPO II NO- ENDOMETRIOIDE (n=14)</b>	<b>ALTO GRADO (n=19)</b>	Seroso	5
		Células claras	1
		Mixto	1
		Carcinosarcoma	7
<b>TOTAL</b>			<b>60</b>

Para el estudio de asociación de genes relacionados con la autofagia, se han utilizado 129 muestras de sangre periférica de pacientes con CE. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción antecubital en el Servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Las características histológicas de cada paciente se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Muestras de sangre periférica de pacientes con CE distribuidas según el tipo y grado histológico.

TIPO	GRADO	TUMOR	Nº DE MUESTRAS
<b>TIPO I ENDOMETRIOIDE (n=100)</b>	<b>BAJO GRADO (n=89)</b>	Grado 1	57
		Grado 2	32
		Grado 3	11
<b>TIPO II NO- ENDOMETRIOIDE (n=29)</b>	<b>ALTO GRADO (n=40)</b>	Seroso	12
		Células claras	2
		Mixto	4
		Carcinosarcoma	11
<b>TOTAL</b>			<b>129</b>

En el análisis de asociación se han incluido muestras de sangre periférica de 197 mujeres sanas sin evidencias de CE ni otras enfermedades.

En todos los casos la recogida de muestras se hizo previo consentimiento informado de las pacientes y mujeres sanas siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

## 2. Extracción de DNA de sangre periférica y de tejido tumoral

Para la extracción de DNA tanto de sangre periférica como de tejido tumoral se siguió el mismo protocolo, variando las cantidades añadidas de los reactivos y realizando un paso de homogeneización inicial en el caso de la muestra tumoral. Para ello se utilizaron 100mg de tejido que se homogeneizaron con un Polytrón® (System PT 1200E Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, U.S.A.) en tampón Fornace (0.25M Sacarosa, 50mM Tris-HCl (pH=7.5), 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>). La obtención de células mononucleadas de sangre periférica se realizó a partir de 10ml de muestra mediante centrifugación repetida para separar las diferentes fases y posterior lisis eritrocitaria con solución hipotónica. Una vez recuperadas, las células mononucleadas fueron lavadas en tampón Fornace (la osmolaridad de este compuesto es la adecuada para no romper los leucocitos) y posteriormente precipitadas mediante una

centrifugación de 10 minutos a 1500r.p.m.. El pellet de células nucleadas se resuspendió nuevamente en tampón Fornace y tanto a estas células como a la muestra de tejido homogeneizada que ya se encontraba en Fornace, se le añadió EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 0.5 M pH 8 (para la inactivación de nucleasas por su acción quelante de iones divalentes) a una concentración final de 10mM, SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares y proteinasa K (AppliChem, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 50µg/mL para la degradación de proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas. Tras ello, se procedió a la extracción y purificación del DNA. La mezcla se incubó con fenol tamponado a pH 8 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) (AppliChem, Darmstadt, Alemania) y se sometió a centrifugación. El DNA, que permaneció en la fase acuosa, se limpió de posibles residuos con CIAA (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). Se centrifugó de nuevo para separar las fases, una con el DNA y otra con los detritos celulares. Se aisló la fase que contenía el material genético y se precipitó con etanol absoluto frío. El DNA se lavó con etanol al 70% y por último se resuspendió en 200µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

La concentración de DNA de cada muestra y la posible contaminación proteica se calculó tras medir la absorbancia a 260 y 280nm respectivamente, en un espectrofotómetro automático Nanodrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica). En los casos en los que se encontró contaminación por proteínas, solventes orgánicos o RNA se procedió a una nueva purificación (además de tratamiento con RNAasas en el caso del RNA).

Las muestras de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf® a -20°C para evitar la degradación progresiva del DNA y una posible contaminación por microorganismos.

### 3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

En el caso de 15 pacientes, que no habían sido incluidos en el estudio previo de los genes PIK3CA y PTEN [120] se amplificaron mediante PCR las regiones exónicas e intrónicas adyacentes de ambos genes (en PIK3CA solo los exones 7, 9 y 20). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ L: 12.5  $\mu$ L de Master Mix (Promega, Madison, WI, U.S.A.) (22mM tris-HCl (pH 8,4), 55mM KCl, 1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 $\mu$ M dNTPs, 22 U Taq DNA polimerasa), 9.5 $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de cada uno de los dos oligonucleótidos flanqueantes (sentido=*forward* + anti-sentido=*reverse*,) y 1  $\mu$ L de DNA (concentración 0.1-0.2  $\mu$ g/mL). Los oligonucleótidos utilizados, así como las condiciones de cada reacción, se muestran en las Tablas 5 y 6:

**Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación del gen PTEN.**

Exón	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Pares de bases	T <sup>a</sup> anill.	T <sup>o</sup> anill.	T <sup>o</sup> ext.
1	TCC TCC TTT TTC TTC AGC CAC	GAA AGG TAA AGA GGA GCA GCC	147	54		
2	GCT GCA TAT TTC AAA CTA A	ACA TCA ATA TTT GAA ATA GAA AAT C	116	54		
3	TGT TAA TGG TGG CTT TTT G	GCA AGC ATA CAA ATA AGA AAA C	114	50		
4	TTC CTA AGT GCA AAA GAT AAC	TAC AGT CTA TCG GGT TTA AGT	147	54		
5	TTT TTT TTT CTT ATT CTG AGG TTA TC	GAA GAG GAA AGG AAA AAC ATC	312	50	30	30
6	AGT GAA ATA ACT ATA ATG GAA CA	GAA GGA TGA GAA TTT CAA GC	232	55		
7	AAT ACT GGT ATG TAT TTA ACC AT	TCT CCC AAT GAA AGT AAA GTA	220	55		
8	TTT TTA GGA CAA AAT GTT TCA C	CCC ACA AAA TGT TTA ATT TAA C	258	55		
9	GTT TTC ATT TTA AAT TTT CTT TC	TGG TGT TTT ATC CCT CTT G	245	54		
<b>Nº de ciclos= 35</b>						

**Tabla 6. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación del gen PIK3CA.**

Exón	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Pares de bases	T <sup>a</sup> anill.	T <sup>o</sup> anill.	T <sup>o</sup> ext.
7	CCT TTT GGG GAA GAA AAG TG	GAG AGA AGG TTT GAC TGC CAT AA	284	54		
9	TGA AAA TGT ATT TGC TTT TTC TGT	CCA CAA ATA TCA ATT TAC AAC CAT TG	401	51	30	60
20	TGG GGT AAA GGG AAT CAA AAG	CCT ATG CAA TCG GTC TTT GC	525	54		
<b>Nº de ciclos= 35</b>						

Como control negativo, para asegurar la ausencia de contaminación, se realizó una PCR con todos los reactivos a excepción del DNA. Las reacciones de amplificación

se llevaron a cabo en un termociclador (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.) con las condiciones generales de amplificación que se muestran en la Figura 13:

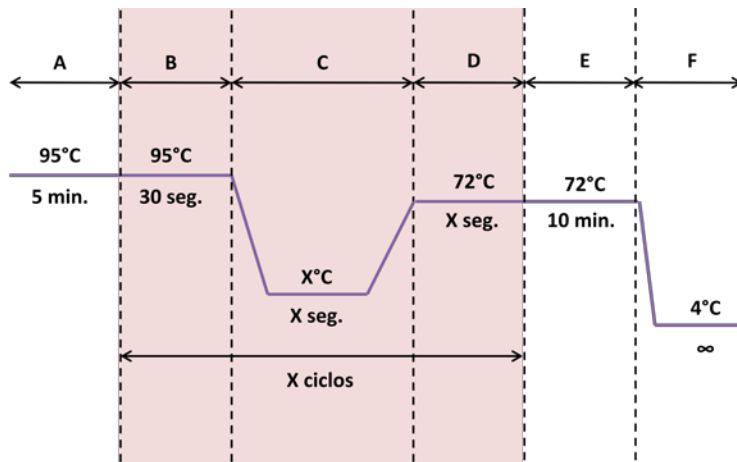


Figura 13. Condiciones generales de amplificación. A: tiempo de desnaturalización previa; B: desnaturalización inicial del ciclo; C: anillamiento de oligonucleótidos; D: extensión; E: extensión final; F: conservación del producto de PCR.

#### 4. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% preparado con tampón TBE (Tris 0.044M, ácido bórico 0.044M, EDTA 1.0mM, pH=8.3). Un pocillo del gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño correspondiente con el DNA del fago  $\Phi$ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. Este marcador de tamaño genera fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.07kb. Esto nos permite comprobar que el tamaño de amplificación del fragmento de PCR es el correcto.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos. Para monitorizar la migración del DNA en el gel, utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.71kp, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.065kb, en un gel al 2% de agarosa.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital acoplado a un programa informático (KODAK 1D software v3.5.4, Kodak, USA) de tratamiento de imágenes.

## **5. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR**

La purificación de fragmentos de DNA procedentes de la amplificación fue realizada mediante PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) según las recomendaciones del fabricante. Tras la purificación se procedió a una nueva electroforesis en gel de agarosa para comprobar tanto la eficacia de la purificación como la cantidad purificada.

## **6. Secuenciación de fragmentos de PCR mediante secuenciación por Sanger**

Las muestras para secuenciación automática se prepararon con 40-60ng del DNA amplificado con 3pmol del oligonucleótido correspondiente, todo ello en un volumen final de 8 µL de reacción, añadiendo H<sub>2</sub>O en los casos en los que fue necesario para completar el volumen. Se enviaron al secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser del Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca donde se realizó la reacción de secuenciación con el kit BigDye Terminator® v.3.1.



La lectura y tratamiento de las secuencias se realizó con el programa Chromas Lite. La homología con las secuencias depositadas en las bases de datos EMBL y GeneBank se hizo con los programas FASTA o BLAST.

El diseño de los oligonucleótidos específicos para secuenciación (también para los de PCR) se llevó a cabo con el programa Oligo 4.05 primer Analysis Software.

## **7. Discriminación alélica mediante sondas TaqMan™: genotipado**

La identificación de polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en pacientes con carcinoma de endometrio se realizó mediante discriminación alélica con sondas TaqMan™.

La PCR con sondas TaqMan™ se basa en la fluorescencia emitida por sondas específicas marcadas con fluorocromos. Para cada SNP a estudiar se emplearon dos sondas, cada una de las cuales reconoce una de las dos posibles variantes nucleotídicas del polimorfismo. Para la reacción se utilizan termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia y son capaces de medirla en cualquier momento de la amplificación y en cada uno de los viales donde se esté llevando a cabo. Las sondas utilizadas para hibridar con zonas específicas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador. Para que esto tenga lugar, ambas moléculas, donadora y receptora, deben estar próximas en el espacio y además el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el de absorción de la segunda. En nuestro estudio de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan™ los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM (Tabla 7).

**Tabla 7. Moléculas fluorescentes utilizadas en la reacción de PCR con sondas TaqMan™.**

Fluorocromo	Máx. $\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	Máx. $\lambda_{\text{em}}$ (nm)
VIC	538	554
FAM	495	435

Durante la reacción de amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la Taq Polimerasa en su acción de síntesis (con actividad 5' Exonucleasa), hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, liberándose así el fluorocromo donador. En este momento, donador y aceptor están espacialmente alejados, por lo que el lector capta la fluorescencia del primero. El empleo de estas sondas garantiza una detección específica y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Esta reacción de PCR requiere los mismos componentes que una reacción de PCR convencional (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y oligonucleótidos forward y reverse). En nuestro caso se utilizó el sistema TaqMan™ Genotyping Master Mix 2x (Applied Biosystems), en un volumen final de 10µL, y se realizó en el equipo Step One Plus Real Time PCR™ (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. En nuestro trabajo se analizaron mediante esta técnica los SNPs en genes relacionados con la autofagia (ATGs) que se detallan en la Tabla 8.

**Tabla 8. SNPs en genes relacionados con la autofagia estudiados en este trabajo.**

Gen	SNP ID	Localización cromosómica	Región en el gen	Cambio en el DNA	Cambio en la proteína
ATG10	rs1864183	5	Exón 6	C>T	Thr212Met
ATG2B	rs3759601	14	Exón 25	C>G	Gln1383Glu
ATG16L1	rs2241880	2	Exón 9	A>G	Thr300Ala
ATG5	rs2245214	6	Intrón 6	C>G	-

Los resultados de este tipo de análisis muestran generalmente (cuando existen tres genotipos) tres nubes de puntos diferenciadas correspondientes al genotipo de cada una de las muestras analizadas (Figura 14):

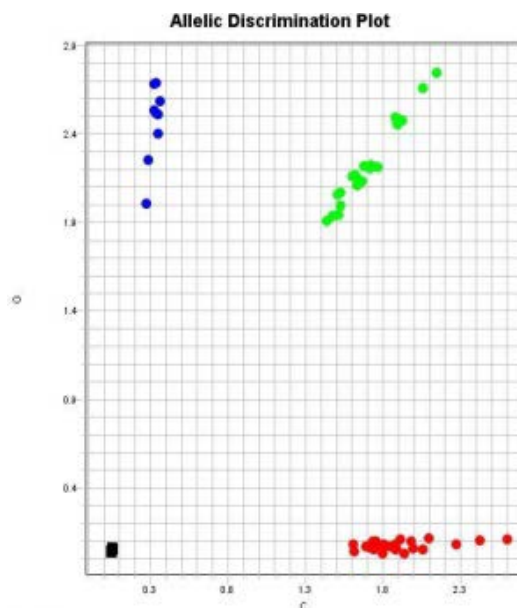


Figura 14. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan™ del polimorfismo del gen ATG5 Rs2245214. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos GG, los verdes son heterocigotos GC y los rojos homocigotos CC.

## 8. Cultivo de líneas celulares tumorales

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron cuatro y se detallan en la

Tabla 9:

Tabla 9. Líneas celulares tumorales de CE con las mutaciones genéticas descritas.

LÍNEA CELULAR	HISTOLOGÍA	FUENTE DEL TUMOR	GENES MUTADOS
AN3CA	Adenocarcinoma endometriode de grado III (endometrio) Tipo II	Metástasis peritoneal Mujer 55a	FBXW7(p.R441W), PIK3R1 (p.R557_K561>Q), PTEN (p.R130fs*4), TP53 (p.G389W, p.S90fs*33, p.R213Q), FGFR2 (N550K,K310R)
HEC1B	Adenocarcinoma (endometrio) moderadamente diferenciado Tipo II	Primario Mujer 71a	PIK3CA (p.G1049R), KRAS (G12D), TP53 ( p.R248Q)
KLE	Adenocarcinoma (endometrio) pobremente diferenciado Tipo II	Metástasis nodular Mujer 64a	FBXW7 (p.R479Q), MAP2K4 (c.1_218del218), TP53 (p.R175H)
SKUT1	Leiomiomascoma de grado III (útero/endometrio)	Primario Mujer 75a	APC (p.Q1096*, p.T1556fs*9), PIK3CA (p.R88Q), PTEN (p.T319fs*1, p.N323fs*2), RB1 (p.V654fs*4), TP53 (p.R175H, p.R248Q)

Todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador (Cultek S.L.U., Madrid, España) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de aire. Para el cultivo se utilizó el medio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con glucosa (4.5g/L), L-glutamina y L-piruvato. El medio de cultivo se suplementó con suero bovino fetal al 10% (FBS) y antibióticos (penicilina/estreptomicina) al 1% (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

## **9. Extracción de proteínas**

### **9.1. Líneas celulares**

Las células cultivadas con los diversos fármacos, o sin tratamiento, fueron recogidas de las placas de cultivo utilizando 1-1.5mL del reactivo TrypLE 1X (Gibco), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante tres minutos. El precipitado celular se incubó durante 30-45 minutos con buffer de lisis frío y en agitación (NaCl 140mM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% NP-40, Tris 20mM pH 8.0) con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, pepstatina 1µM, aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1µg/ml y ortovanadato sódico 1mM). Los extractos celulares se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 r.p.m. y a 4°C. El sobrenadante resultante, que contenía la mezcla de proteínas, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf® para ser almacenado posteriormente a -80°C.

### **9.2. Tejido tumoral**

La extracción de proteínas a partir de muestras tumorales se realizó a partir de unos 100mg de tejido con ayuda de un homogeneizador (Polytron® System PT 1200E Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, U.S.A.) en 1mL de tampón RIPA (1% NP-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1x PBS) y 20µL de inhibidor de proteasas API 100x (1% aprotinina, 1% pepstatina y 1% leupeptina). Este material se

incubó en hielo durante 30 minutos durante los que se realizaron repetidos vórtex. La mezcla se centrifugó a 12000r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, el cual contenía el lisado proteico. Las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf® a -80°C para de evitar la desnaturalización y degradación de la muestra.

## 10. Anticuerpos

Para este trabajo se han utilizado ocho anticuerpos primarios diferentes, dos anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) y dos anticuerpos secundarios unidos a una molécula fluorescente. Se muestran a continuación (Tabla10):

Tabla 10. Anticuerpos utilizados en los experimentos de Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo	Procedencia	Concentración WB	Concentración IF	Casa comercial
Anti-p62	Conejo	1:2000	1:200	Abcam® (ab109012)
Anti-LC3B	Conejo	1:1000	1:200	Novus (NB600-1384)
Anti-Beclin1	Ratón	1:1.000	-	Abcam® (ab114071)
Anti-mTOR	Conejo	1:1000	-	Cell Signaling (#2972)
Anti-PIK3CA	Conejo	1:1.000	-	Abcam® (ab40776)
Anti-PKCz	Conejo	1:1000	-	Abcam® (ab59364)
Anti-TRAF6	Conejo	1:5000	-	Abcam® (ab33915)
Anti-β-actina	Ratón	1:10.000	-	Sigma-Aldrich
Anti-Mouse (HRP)	Oveja	1:10.000	-	Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit (HRP)	Cabra	1:10.000	-	Chemicon International
Anti-Rabbit (Alexa Fluor®594)	Cabra	-	1:400	Molecular Probes™ Invitrogen (A11037)

## 11. Fármacos

En este trabajo se han utilizado tres fármacos diferentes, Panobinostat®, cloroquina y metformina.

- **Panobinostat® (LBH589)** (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Suiza): Este fármaco fue proporcionado por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se preparó a partir de un stock de 1mM o 100µM y

como vehículo se utilizó DMSO. Para los distintos experimentos se usaron concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125nM.

- **Cloroquina** (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A): se preparó una solución 50mM del fármaco, disolviendo para ello la droga en polvo en ddH<sub>2</sub>O al 0.5% de DMSO. Se usaron concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125μM.
- **Metformina:** Para los experimentos con este fármaco se usó metformina de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A), que se disolvió en agua destilada para obtener un stock a una concentración de 50mM, a partir del cual se prepararon concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM.

## 12. Western blot

Las proteínas extraídas de las líneas celulares o de los tumores de CE se cuantificaron mediante el método de la Seroalbúmina bovina (BSA) [121] o en un Nanodrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica). Para realizar la electroforesis, se preparó la muestra mezclando una cantidad específica (200μg) de cada extracto proteico con tampón de carga (4%SDS, 0.05% azul de bromofenol, 20% glicerina, 2% β-mercaptoetanol, Tris 100mM pH 6.8). Las muestras se desnaturalizaron en un baño seco a 95-100° durante 5-10 minutos y se procedió inmediatamente a su carga en el gel de poliacrilamida.

La separación de las proteínas por tamaño se realizó mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) atendiendo al protocolo descrito por Laemmli [122]. Los geles de poliacrilamida se prepararon al 8% para las proteínas con un peso molecular mayor o en torno a 60kDa (p62, Beclin1, mTOR, PIK3CA, PKCz, TRAF6) y al 12% para las proteínas con un peso menor a 60kDa (LC3B). Los geles se prepararon con cantidades variables según el porcentaje:

solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (30%) (BioRad, Hércules, CA, USA.), Tris/HCl 1.5 M (pH 8.8), ddH<sub>2</sub>O, SDS al 10%, AMPS al 25% y TEMED. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante en cubetas MiniPROTEAN®3 (BioRad, Hércules, CA, USA) con un tampón de electroforesis (Tris 20mM, Glicina 192mM y SDS 1%). Como marcador de peso molecular se usó PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica), en el que los tamaños que muestra en kDa son: 170, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 y 10. Una vez finalizado este paso, las proteínas separadas y contenidas en el gel, se transfirieron a una membrana de PVDF (Milipore Corporation, Billerica, MA, USA) con un voltaje constante de 15V en un sistema de transferencia semi-húmedo (TRANS BLOT® SD, BioRad, Hércules, CA, USA) y en un ambiente húmedo de tampón (192 mM glicina; 20% metanol y 25 mM Tris/HCl pH 8.5). Los tiempos de transeferencia variaron en función del porcentaje de acrilamida del gel (mínimo 45 minutos y máximo 1 hora). A continuación se bloquearon los sitios de unión inespecífica incubando la membrana con solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se compuso de TBS-T (NaCl 140mM, Tween 20 0.05% [BioRad, Hércules, CA, USA], Tris 10mM OH 7.5) y 5% de leche desnatada en polvo. El anticuerpo primario se incubó toda la noche a 4°C y en agitación, los anticuerpos se prepararon en TBS-T con BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A) al 3%. Tras la incubación se realizaron tres lavados con TBS-T (5, 7 y 10 minutos) en agitación y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) y preparado con TBS-T y leche desnatada al 5%, se incubó durante 45 minutos o 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Se lavó tres veces la membrana y se procedió a la visualización de las bandas en radiografías (FUJIFILM, Düsseldorf, Alemania) con un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia

de peróxido de hidrógeno [123]. Para ello se utilizó el kit comercial Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica).

Los fragmentos correspondientes a la expresión proteica de cada muestra se cuantificaron con el programa de análisis Quantity-One (BioRad, Hércules, CA, USA).

### **13. Inmunofluorescencia**

Para poder observar la distribución celular y la expresión de proteínas en las células tumorales tratadas, se realizó un experimento de inmunofluorescencia, que se basa en la utilización de anticuerpos fluorescentes para posteriormente visualizar las células en un microscopio con lector de fluorescencia.

Para llevar a cabo esta técnica, se sembraron entre 150.000 y 250.000 células (dependiendo de la línea celular) en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer toda la noche. Cada pocillo contenía 2-3 cristales cubreobjetos. Una vez las células hubieron crecido, se reemplazó el medio por medio nuevo con fármaco a la concentración previamente estipulada, a excepción de un pocillo que se utilizó como control sin tratamiento. Las placas se incubaron en este caso durante 72 horas. Tras este tiempo, se lavaron las células con PBS para eliminar el medio de cultivo y se fijaron con 1ml/pocillo de formaldehído al 37% diluido al 4-5% en PBS durante 10 minutos. Se eliminó el formaldehído y se procedió a un nuevo lavado (3 veces durante 3-5 minutos), tras lo cual se procedió a permeabilizar las células con 1ml/pocillo de Triton-X100 (IBI Scientific, Kapp Court, Peosta, Iowa, USA) al 0.5% durante 10 minutos, hasta este punto se trabajó en hielo. Se aspiraron los pocillos y se añadió PBS para eliminar el Triton-X100, después se añadieron 2ml de solución de bloqueo preparada con BSA al 10% en PBS y se incubó durante 1-1.5 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, los cristales cubreobjetos (con las células adheridas) se colocaron en cámaras húmedas.



Se preparó el anticuerpo frente a la proteína a analizar (p62 o LC3B) con BSA al 3% en PBS a una concentración de 1:200 y se roció cada cubre con 30 $\mu$ l. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda durante una hora y media. Trascurrido el tiempo necesario para esta incubación se devolvieron los cubres a las placas multipocillo y se lavaron tres veces con PBS. Los cubres se colocaron de nuevo en las cámaras húmedas y se incubaron (una hora y media a temperatura ambiente) con 30 $\mu$ l de anticuerpo secundario (fluorescente) preparado en BSA al 1% en PBS a una concentración de 1:400. A partir de este punto se trabajó en semioscuridad. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los cubres se introdujeron en las placas y se lavaron con PBS para eliminar exceso de anticuerpo no unido. Los núcleos celulares se tiñeron ahora con 1ml/pocillo de DAPI (Roche) 1:2.000 en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, incubación que duró 5 minutos. Por último, se lavaron las células y se colocó cada cubre sobre un portaobjetos, para ello se utilizaron 15 $\mu$ l/cubre de moviol (2.4g Moviol [Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A], 6g glicerol, 6ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y 12ml Tris pH8.5), una solución que al solidificarse actúa como un pegamento transparente. Las células se visualizaron en un microscopio confocal LEICA SP5 modelo DMI 6000B con el software asociado LEICA LAS AF y se capturaron las imágenes necesarias con una cámara conectada a dicho microscopio (Figura 15).

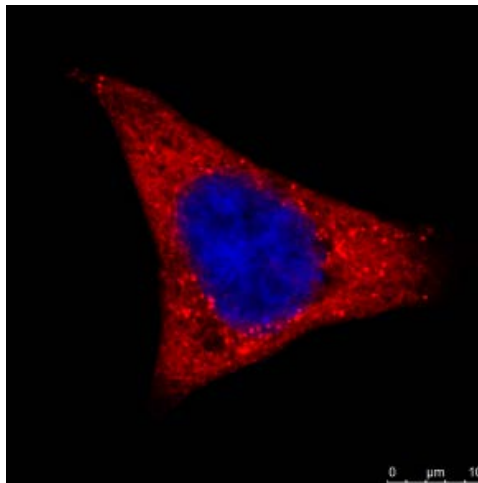


Figura 15. Imagen de una célula de una línea de carcinoma de endometrio (HEC1B) marcada con un anticuerpo secundario fluorescente frente al anticuerpo anti-p62. El núcleo celular está marcado con DAPI.

## 14. Ensayo de viabilidad celular

Se evaluó el crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con diferentes fármacos mediante el ensayo MTT [124] en cada una de las líneas celulares de CE. Esta técnica consiste en el marcaje de las células que se encuentran metabólicamente activas con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se trata de un compuesto de color amarillento que se reduce por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) celular, dando lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro (formazán). El formazán se solubiliza con DMSO y posteriormente se mide la intensidad de color mediante un espectrofotómetro, lo que nos permite determinar la tasa de proliferación. La absorbancia se correlaciona con la cantidad de color, y esto, con la cantidad de células metabólicamente activas.

El ensayo se comenzó sembrando 10.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, dejándolas crecer toda la noche. Una vez las células hubieron crecido, se sustituyó el medio por medio nuevo con diferentes concentraciones de fármaco dejando siempre células sin tratamiento como control de cada tiempo. Las placas multipocillo se

incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Además, se utilizó una placa previa sin ningún tipo de tratamiento (tiempo 0) como control. Una vez transcurridos los tiempos de tratamiento, se añadió a cada pocillo 1mg/ml de compuesto MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se eliminó el sobrenadante y se añadió DMSO para solubilizar los cristales de formazán depositados en el pocillo. Por último, se determinó la absorbancia de cada pocillo a 560nm en un lector de microplacas UltraEvolution (Tecan®).

En cada experimento, se utilizaron tres réplicas de cada una de las condiciones (concentraciones) y cada experimento se repitió tres veces para verificar los resultados.

## **15. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo**

Se estudió el ciclo celular en las diferentes líneas cultivadas llevando a cabo la cuantificación del DNA de las mismas por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con los distintos fármacos durante 24, 48 y 72 horas y además se tomaron como control células sin tratamiento (tiempo 0). Tras la exposición a cada uno de los compuestos durante los tiempos estipulados, se recogieron las células, se lavaron, se resuspendieron y se fijaron en etanol al 70% helado. Una vez fijadas, se lavaron repetidamente (3 o 4 veces) con PBS para eliminar residuos de etanol, centrifugando durante 3 minutos a 1200 r.p.m. entre cada lavado. Después, se añadió a cada muestra RNAasa A (0.05%) y 7.5µl yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se incubaron a temperatura ambiente (2-3 horas). Se realizó el análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), cuantificando el DNA de un total de 30.000 células para cada muestra.

Los datos obtenidos se analizaron en el programa asociado al citómetro, CellQuest Pro® (BD Bioscience). Este programa proporciona un gráfico para cada

muestra analizada en el que se representa la cantidad de DNA (proporcional a la cantidad de yoduro de propidio) en abscisas y en ordenadas el número de células. Estos archivos se analizaron posteriormente con el programa WINMDI, con el cual se hizo una discriminación y cuantificación del número de células en cada fase del ciclo celular. Se realizaron dos réplicas de cada experimento para verificar los resultados.

## **16. Análisis de datos**

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se han analizado utilizando el software IBM SPSS Statistics 23.

Para el estudio de polimorfismos en genes de autofagia, se estimaron Odds ratios (ORs) e intervalos de confianza del 95% (ICs 95%) para cada variante usando modelos de regresión logística para evaluar si existía o no asociación con el riesgo a padecer CE, o asociación entre genotipo y fenotipo.

Para el estudio de la expresión de proteínas en tumores de CE también se calcularon Odds ratios e intervalos de confianza para cada proteína utilizando modelos de regresión logística para evaluar si existían diferencias de expresión entre los tipos tumorales y la expresión proteica. La correlación entre proteínas se determinó mediante el test de Spearman.

Los datos del estudio del ciclo celular se analizaron comparando las medias de dos experimentos independientes (fármaco vs control) mediante ANOVA de un factor para cada una de las fases.

En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un p-valor menor a 0.05.

## **RESULTADOS**

---

---



## **1. Análisis de polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en pacientes con carcinoma de endometrio**

Hemos llevado a cabo este análisis en muestras de DNA de sangre periférica de 129 pacientes con CE de diferentes tipos y grados (ver Tabla 4) y 197 mujeres sanas de edades similares. Los SNPs analizados (ver Tabla 8) se seleccionaron porque modifican aminoácidos en la proteína o por haber sido estudiados anteriormente por otros grupos. Los polimorfismos en estos genes se analizaron mediante discriminación alélica con la utilización de sondas TaqMan™.

La distribución de genotipos y alelos entre los grupos de pacientes y controles se comparó para analizar una posible relación entre el genotipo y la susceptibilidad a padecer CE. Los resultados obtenidos en ambos grupos se muestran en la Tabla 11:

Tabla 11. Frecuencias genotípicas de polimorfismos en genes de autofagia entre pacientes y controles y la asociación con el riesgo de CE.

SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601 Gln1383Glu	CC	48 (37,2%)	77 (39,1%)		-
	CG	52 (40,3%)	91 (46,2%)	0.184	-
	GG	29 (22,5%)	29 (14,7%)		-
	CC+CG	100 (77,5%)	168 (85,3%)	/	-
	GG	29 (22,5%)	29 (14,7%)	0.078	-
	CC	48 (37,2%)	77 (39,1%)	/	-
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CG+GG	81 (62,8%)	120 (60,9%)	0.816	-
	CC	50 (38,8%)	76 (38,6%)		-
	CG	57 (44,2%)	100 (50,8%)	0.208	-
	GG	22 (17,1%)	21 (10,7%)		-
	CC+CG	107 (82,9%)	176 (89,3%)	/	-
	GG	22 (17,1%)	21 (10,7%)	0.131	-
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	50 (38,8%)	76 (38,6%)	/	-
	CG+GG	79 (61,2%)	121 (61,4%)	1.00	-
	CC	39 (30,2%)	52 (26,4%)	<b>0.019</b>	1.00
	CT	53 (41,1%)	110 (55,8%)	0.101	0.642 (0.379-1.090)
	TT	37 (28,7%)	35 (17,8%)	0.279	1.410 (0.757-2.623)
	CC+CT	92 (71,3%)	162 (82,2%)	/	1.00
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	TT	37 (28,7%)	35 (17,8%)	<b>0.021</b>	1.861 (1.098-3.157)
	CC	39 (30,2%)	52 (26,4%)	/	-
	CT+TT	90 (69,8%)	145 (73,6%)	0.528	-
	GG	23 (17,8%)	49 (24,9%)		-
	GA	69 (53,5%)	103 (52,3%)	0.246	-
	AA	37 (28,7%)	45 (22,8%)		-
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG+GA	92 (71,3%)	152 (77,2%)	/	-
	AA	37 (28,7%)	45 (22,8%)	0.243	-
	GG	23 (17,8%)	49 (24,9%)	/	-
	GA+AA	106 (82,2%)	148 (75,1%)	0.172	-

Los resultados mostraron significación estadística en el caso del polimorfismo de ATG10 (rs1864183). El genotipo TT (genotipo menos frecuente) confiere un mayor riesgo a padecer carcinoma de endometrio ( $p=0.021$ ;  $OR=1.861$  (1.098-3.157)).

Al comparar los datos obtenidos entre los pacientes con CE de bajo grado frente a los pacientes con CE de alto grado se encontró que el genotipo GG del polimorfismo intrónico de ATG5 (rs2245214) se asocia con un grado mayor y más agresivo de la enfermedad ( $p=0.009$ ;  $OR=3.556$  (1.381-9.155)) (Tabla 12).



Tabla 12. Frecuencias genotípicas en los polimorfismos de los genes de autofagia entre los pacientes con CE de bajo grado frente a los pacientes con CE de alto grado

SNP	Genotipo	Bajo grado	Alto grado	p-valor	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601 Gln1383Glu	CC	29 (32.2%)	19 (48.7%)	0.214	
	CG	39 (43.3%)	13 (33.3%)		
	GG	22 (24.4%)	7 (17.9%)		
	CC+CG	68 (75.6%)	32 (82.1%)	/	
	GG	22 (24.4%)	7 (17.9%)	0.496	
	CC	29 (32.2%)	19 (48.7%)	/	
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CG+GG	61 (67.8%)	20 (51.3%)	0.112	1.00 0.927 (0.387-2.220) 3.415 (1.195-9.765) 1.00 3.556 (1.381-9.155)
	CC	37 (41.1%)	13 (33.3%)	<b>0.031</b>	
	CG	43 (47.8%)	14 (35.9%)	0.864	
	GG	10 (11.1%)	12 (30.8%)	<b>0.022</b>	
	CC+CG	80 (88.9%)	27 (69.2%)	/	
	GG	10 (11.1%)	12 (30.8%)	<b>0.009</b>	
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	37 (41.1%)	13 (33.3%)	/	
	CG+GG	53 (58.9%)	26 (66.7%)	0.438	
	CC	26 (28.9%)	13 (33.3%)	0.634	
	CT	36 (40.0%)	17 (43.6%)		
	TT	28 (31.1%)	9 (23.1%)	/	
	CC+CT	62 (68.9%)	30 (76.9%)	/	
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	TT	28 (31.1%)	9 (23.1%)	0.403	
	CC	26 (28.9%)	13 (33.3%)	/	
	CT+TT	64 (71.1%)	26 (66.7%)	0.678	
	GG	18 (20.0%)	5 (12.8%)	0.403	
	GA	49 (54.4%)	20 (51.3%)		
	AA	23 (25.6%)	14 (35.9%)	/	
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG+GA	67 (74.4%)	25 (64.1%)	/	0.290
	AA	23 (25.6%)	14 (35.9%)	/	
	GG	18 (20.0%)	5 (12.8%)	/	
	GA+AA	72 (80.0%)	34 (87.2%)	0.454	

Al comparar los diferentes tipos tumorales, CE de tipo endometriode y CE de tipo no endometriode se observó una asociación significativa con los polimorfismos ATG5 (rs2245214) y ATG16L1 (rs2241880). En el caso de ATG5, el genotipo GG se asocia con CE de tipo no endometriode ( $p=0.005$ ;  $OR=4.120$  (1.546-10.981)), siendo éste un tipo más agresivo de tumor (siempre de grado III). Algo similar ocurre con ATG16L1, en el que el genotipo AA se asocia también con un CE de tipo no endometriode ( $p=0.022$ ;  $OR=2.781$  (1.162-6.655)). (Tabla 13):

Tabla 13. Frecuencias genotípicas en los polimorfismos de los genes de autofagia entre los pacientes con CE de tipo endometriode frente a los pacientes con CE de tipo no endometriode.

SNP	Genotipo	Endometriode	No endometriode	p-valor	OR (IC 95%)
ATG2B rs3759601 Gln1383Glu	CC	36 (35.6%)	12 (42.9%)	0.735	
	CG	41 (40.6%)	11 (39.3%)		
	GG	24 (23.8%)	5 (17.9%)		
	CC+CG	77 (76.2%)	23 (82.1%)	/	
	GG	24 (23.8%)	5 (17.9%)	0.615	
	CC	36 (35.6%)	12 (42.9%)	/	
	CG+GG	65 (64.4%)	16 (64.4%)	0.513	
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CC	41 (40.6%)	9 (32.1%)	<b>0.018</b>	1.00
	CG	48 (47.5%)	9 (32.1%)	0.761	0.854 (0.310-2.354)
	GG	12 (11.9%)	10 (35.7%)	<b>0.018</b>	3.796 (1.255-11.481)
	CC+CG	89 (88.1%)	18 (64.3%)	/	
	GG	12 (11.9%)	10 (35.7%)	<b>0.005</b>	4.120 (1.546-10.981)
	CC	41 (40.6%)	9 (32.1%)	/	
	CG+GG	60 (59.4%)	19 (67.9%)	0.513	
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	29 (28.7%)	10 (35.7%)	0.712	
	CT	43 (42.6%)	10 (35.7%)		
	TT	29 (28.7%)	8 (28.6%)		
	CC+CT	72 (71.3%)	20 (71.4%)	/	
	TT	29 (28.7%)	8 (28.6%)	1.00	
	CC	29 (28.7%)	10 (35.7%)	/	
	CT+TT	72 (71.3%)	18 (64.3%)	0.492	
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG	18 (17.8%)	5 (17.9%)	<b>0.05</b>	1.00
	GA	59 (58.4%)	10 (35.7%)	0.418	0.610 (0.184-2.018)
	AA	24 (23.8%)	13 (46.4%)	0.275	1.950 (0.588-6.467)
	GG+GA	77 (76.2%)	15 (53.6%)	/	
	AA	24 (23.8%)	13 (46.4%)	<b>0.022</b>	2.781 (1.162-6.655)
	GG	18 (17.8%)	5 (17.9%)	/	
	GA+AA	72 (80.0%)	34 (87.2%)	0.454	

## 2. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en pacientes con carcinoma de endometrio

Con el fin de analizar la expresión de proteínas que intervienen en el proceso autofágico en pacientes con tumores endometriales, se estudió mediante western blot la expresión de dichas proteínas en 60 muestras de tejido tumoral.

### 2.1. Estudio de la expresión de p62

El estudio de expresión de la proteína p62 mostró una gran variabilidad, aunque en la mayoría de los casos se observó una expresión disminuida o nula independientemente del tipo tumoral (Figura 16):

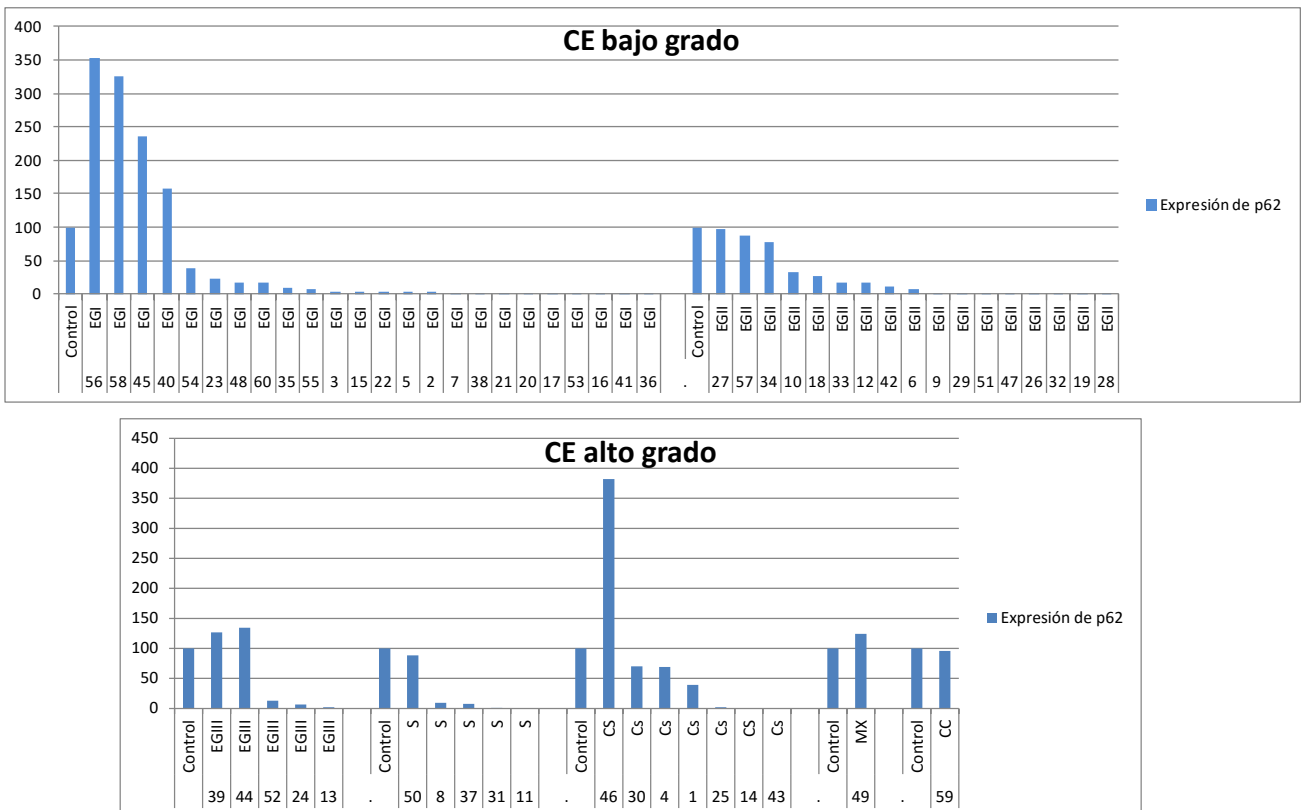


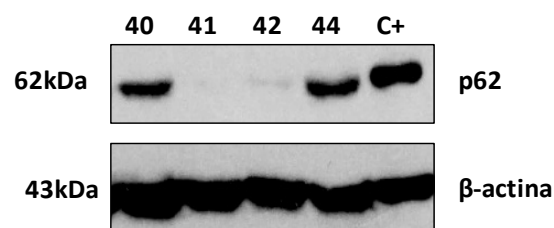
Figura 16. Representación gráfica de la expresión de p62 cuantificada en muestras tumorales de CE. Se representa el ratio p62/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control. [EGI, II, III: carcinoma endometrioide de grados I, II y III; S: seroso; Cs: carcinosarcoma; CC: células claras; Mx: mixto].

Cuando dividimos la expresión de p62 en baja o nula (0-65% en relación con el control) y normal o alta (>65%) observamos que estaba disminuida o nula en el 75% de los tumores y normal o con sobreexpresión en el resto (25%). Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de tumores y la expresión de p62 normal o alta se relacionó con carcinoma de alto grado ( $p=0.043$ ;  $OR=3.532$  (1.042-11.979)). (Tabla 14).

**Tabla 14. Porcentajes de pacientes según la expresión de p62.**

Tipo/expresión p62	Baja o nula (<65%)	Normal o alta (>65%)	Total
CE de bajo grado	34	7	41
	82,9%	17,1%	100,0%
CE de alto grado	11	8	19
	57,9%	42,1%	100,0%
Total	45	15	60
	75,0%	25,0%	100,0%

En la Figura 17 mostramos la variabilidad en la expresión de p62 en algunos de los tumores incluidos en el estudio:



**Figura 17. Western blot de la expresión de p62 en cuatro tumores de CE y un control (C+). [β-actina: control de carga].**

## 2.2. Estudio de la expresión de LC3B

El estudio de la proteína LC3B mediante western blot en tumores de endometrio mostró una gran variabilidad entre los diferentes tumores incluidos en nuestro trabajo (Figura 18):

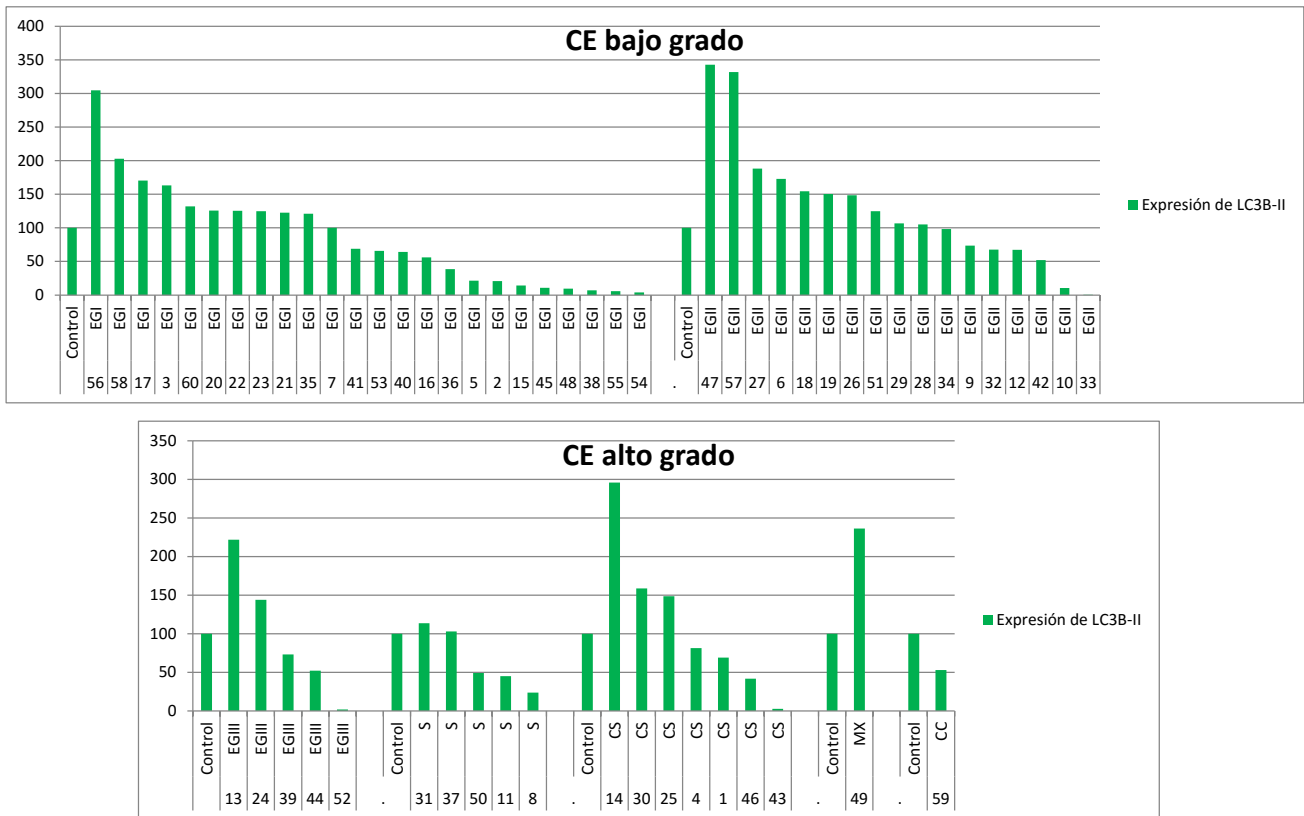


Figura 18. Representación gráfica de la expresión de LC3B-II cuantificada en muestras tumorales de CE. Se representa el ratio LC3-II/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control. [EG I, II, III: carcinoma endometriode de grados I, II y III; S: seroso; Cs: carcinosarcoma; CC: células claras; Mx: mixto].

La mayoría de los tumores incluidos en nuestro estudio presentaron expresión normal de LC3B-II (63.3%) frente a un 36.7% de tumores con expresión disminuida. Dentro de cada grupo tumoral la distribución fue similar al conjunto de tumores (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentajes de pacientes según la expresión de LC3B-II.

Tipo/expresión LC3B-II	Baja o nula (<65%)	Normal o alta (>65%)	Total
CE de bajo grado	14	27	41
	34,1%	65,9%	100,0%
CE de alto grado	8	11	19
	42,1%	57,9%	100,0%
Total	22	38	60
	36,7%	63,3%	100,0%

En la figura 19 mostramos un western blot que refleja la expresión variable de LC3B en algunos de los tumores incluidos en nuestro trabajo.

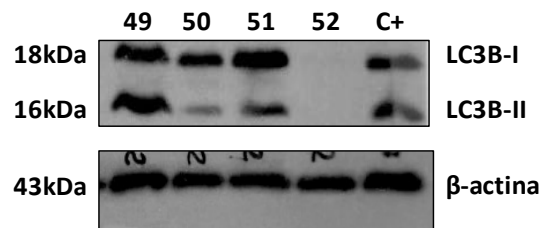


Figura 19. Western blot de la expresión de LC3B en cuatro pacientes de CE y un control (C+). [β-actina: control de carga].

### 2.3. Estudio de la expresión de Beclin1

El análisis de la expresión de Beclin1 mediante western blot mostró, como en los casos anteriores, una expresión de Beclin1 muy variable en los diferentes tumores aunque más elevada en los de alto grado (Figura 20):



En la Figura 21 se muestra un ejemplo de la expresión de Beclin1 en algunos de los tumores incluidos en nuestro trabajo:

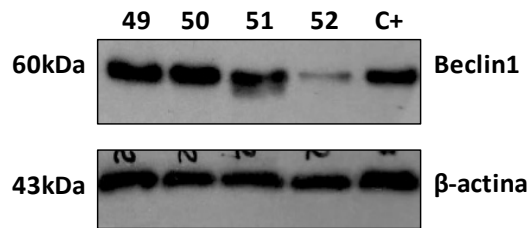


Figura 21. Western blot de la expresión de Beclin1 en cuatro pacientes de CE y un control (C+). [β-actina: control de carga).

## 2.4. Estudio de la expresión de PIK3CA

Los resultados de la cuantificación de la expresión de la proteína PIK3CA se muestran en la Figura 22, en la que se observa que en la mayoría de los tumores hay una expresión inferior al control.

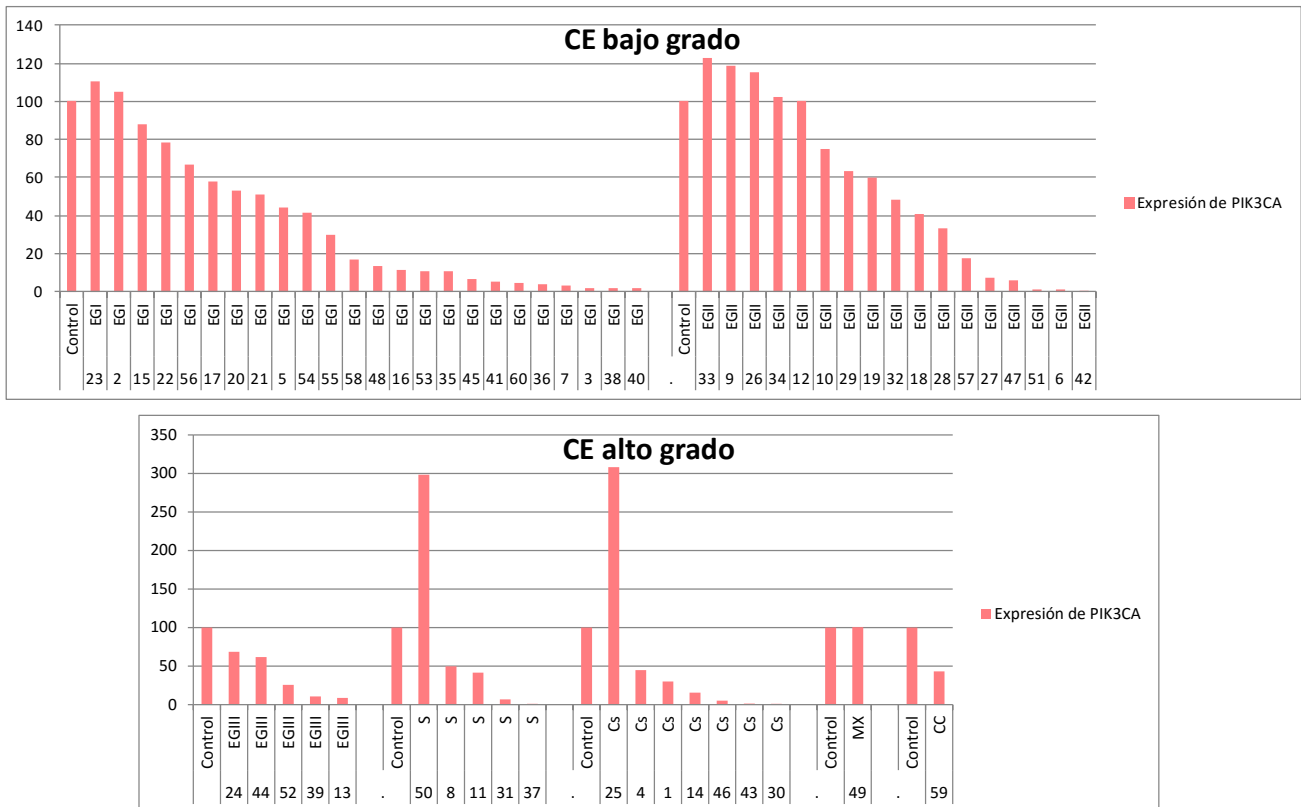


Figura 22. Representación gráfica de la expresión de PIK3CA cuantificada en muestras tumorales de CE. Se representa el ratio PIK3CA/β-actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control. [EGI, II, III: carcinoma endometriode de grados I, II y III; S: seroso; Cs: carcinosarcoma; CC: células claras; Mx: mixto].



Al analizar los porcentajes entre los tumores de alto y bajo grado se encontró también una disminución de la expresión (Tabla 17):

Tabla 17. Porcentajes de pacientes según la expresión de PIK3CA.

Tipo/expresión PIK3CA	Baja o nula (<65%)	Normal o alta (>65%)	Total
CE de bajo grado	30	11	41
	73,2%	26,8%	100,0%
CE de alto grado	15	4	19
	78,9%	21,1%	100,0%
Total	45	15	60
	75,0%	25,0%	100,0%

En la Figura 23 mostramos unos ejemplos de la expresión de esta proteína por western blot en algunos tumores incluidos en nuestro trabajo:

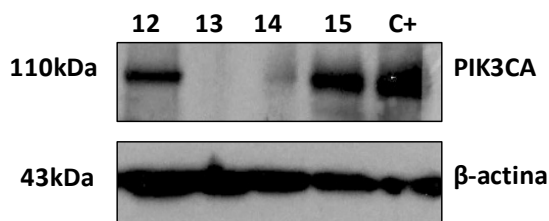


Figura 23. Western blot de la expresión de PIK3CA en cuatro tumores de CE y un control (C+). [β-actina: control de carga].

## 2.5. Estudio de la expresión de mTOR

El estudio de la expresión proteica de mTOR mostró en el 85% de los pacientes presentaron una expresión baja o nula de la proteína y solo un 15% la expresaron de forma normal o incrementada. (Figura 24):



El análisis por western blot mostró que, aunque la mayoría de los tumores presentaron una expresión muy baja de mTOR, en 52 de los 60 tumores analizados se observó la presencia de un fragmento adicional de aproximadamente 80kDa (Figura 25). 19 tumores lo expresaron en pequeña cantidad (36% de los tumores que lo expresan) y el resto lo expresó de forma elevada (64%).

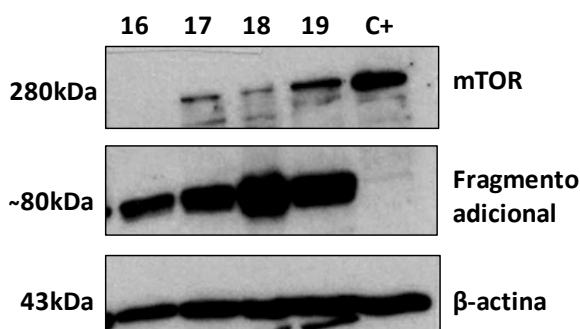


Figura 25. Western blot de la expresión de mTOR en cuatro tumores de CE y un control (C+). [ $\beta$ -actina: control de carga].

Varios de los tumores que no expresaron la forma canónica de mTOR (220kDa, 280kDa en un gel de poliacrilamida) mostraron únicamente el fragmento de 80kDa (Figura 26).

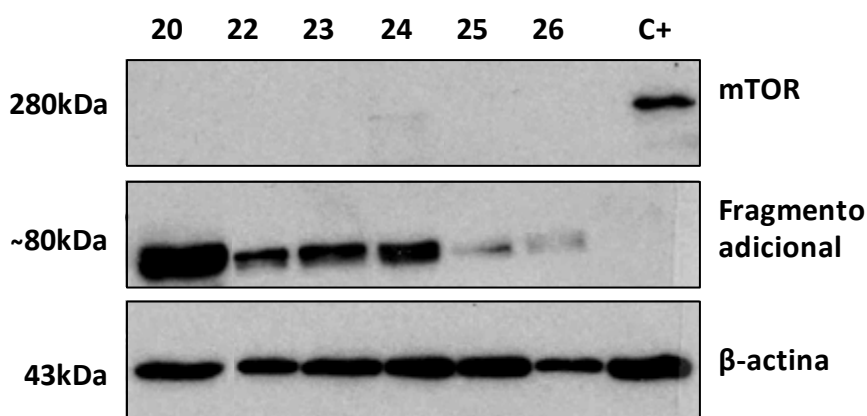


Figura 26. Western blot de la expresión de mTOR en 6 tumores de CE y un control (C+). Los tumores seleccionados muestran únicamente el fragmento adicional y no expresan la forma canónica de mTOR. [ $\beta$ -actina: control de carga].

## 2.6. Estudio de la expresión de PKCz

El análisis de la proteína PKCz en los tumores endometriales analizados mostró una expresión similar a la del control en la mayoría de los casos (Figura 27).

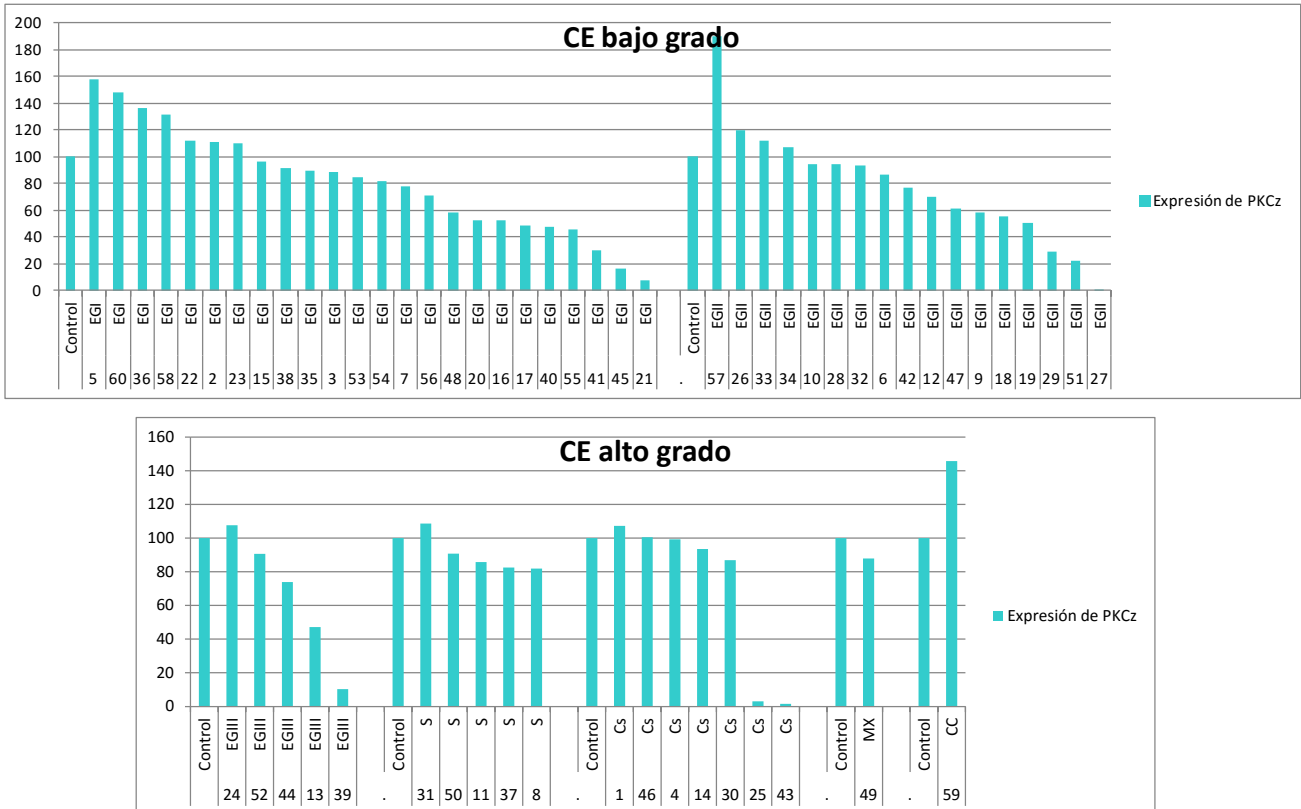


Figura 27. Representación gráfica de la expresión de PKCz cuantificada en muestras tumorales de CE. Se representa el ratio PKCz/ $\beta$ -actina de cada una de las muestras normalizadas respecto al control. [EGI, II, III: carcinoma endometrioide de grados I, II y III; S: seroso; Cs: carcinosarcoma; CC: células claras; Mx: mixto].

Dos tercios de los tumores expresaron la proteína PKCz de forma normal o sobreexpresada (66.7%). Dentro de los dos grupos la distribución fue similar, pero los tumores de bajo grado mostraron en mayor número una expresión disminuida de la proteína (Tabla 19):

Tabla 19. Porcentajes de pacientes según la expresión de PKCz.

Tipo/expresión PKCz	Baja o nula (<65%)	Normal o alta (>65%)	Total
CE de bajo grado	16	25	41
	39,0%	61,0%	100,0%
CE de alto grado	4	15	19
	21,1%	78,9%	100,0%
Total	20	40	60
	33,3%	66,7%	100,0%

En la Figura 28 se muestran cuatro ejemplos de expresión de PKCz en los tumores incluidos en nuestro trabajo:

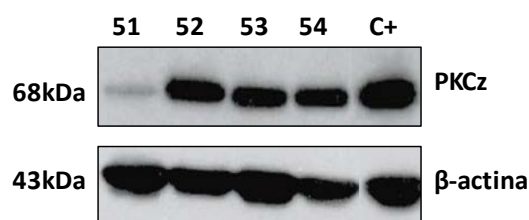


Figura 28. Western blot de la expresión de PKCz en cuatro pacientes de CE y un control (C+). [ $\beta$ -actina: control de carga].

## 2.7. Estudio de la expresión de TRAF6

El análisis de la expresión de la proteína TRAF6 en tumores de endometrio mostró que el 31.7% de los tumores presentan una expresión inferior al tejido control (Figura 29):



En la Figura 30 se muestran unos ejemplos de western blot en muestras incluidas en nuestro estudio:

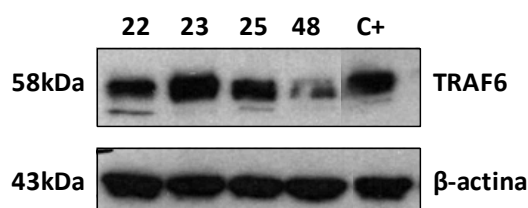


Figura 30. Western blot de la expresión de TRAF6 en cuatro tumores de CE y un control (C+). [β-actina: control de carga).

## 2.8. Correlación de la expresión de las proteínas que intervienen en el proceso de autofagia en tumores de endometrio

Para analizar la posible correlación entre las diferentes proteínas incluidas en el estudio se llevó a cabo un test de Spearman utilizando los valores cuantitativos normalizados correspondientes a la expresión de las proteínas en cada uno de los tumores. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21 en la que se observa una correlación entre la expresión de p62 y Beclin1; p62 y mTOR; p62 y TRAF6; mTOR y TRAF6, y Beclin1 y mTOR. No se ha encontrado una correlación significativa entre la expresión de las demás proteínas.

Tabla 21. Correlación entre la expresión de proteínas.

	p62		Beclin1		LC3B		PIK3CA		mTOR		PKCz		TRAF6	
	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor	CC
<b>p62</b>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Beclin1</b>	<b>0.022</b>	<b>0.296</b>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LC3B</b>	0.785	-0.36	0.993	0.001	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PIK3CA</b>	0.611	0.067	0.604	-0.068	0.829	-0.028	-	1	-	-	-	-	-	-
<b>mTOR</b>	<b>0.041</b>	<b>0.265</b>	<b>0.008</b>	<b>0.341</b>	0.263	-0.147	0.478	0.093	-	1	-	-	-	-
<b>PKCz</b>	0.336	0.126	0.882	0.020	0.736	-0.044	0.141	0.192	0.386	-0.114	-	1	-	-
<b>TRAF6</b>	<b>0.030</b>	<b>0.280</b>	0.162	0.183	0.907	-0.015	0.926	0.012	<b>0.021</b>	<b>0.297</b>	0.821	-0.030	-	1

CC: Coeficiente de correlación (valores positivos: correlación positiva; valores negativos: correlación negativa). Significación estadística con un p-valor <0.05.

En la Figura 31 se muestra una representación gráfica de la correlación entre proteínas en los casos en los que se encontró significación estadística:



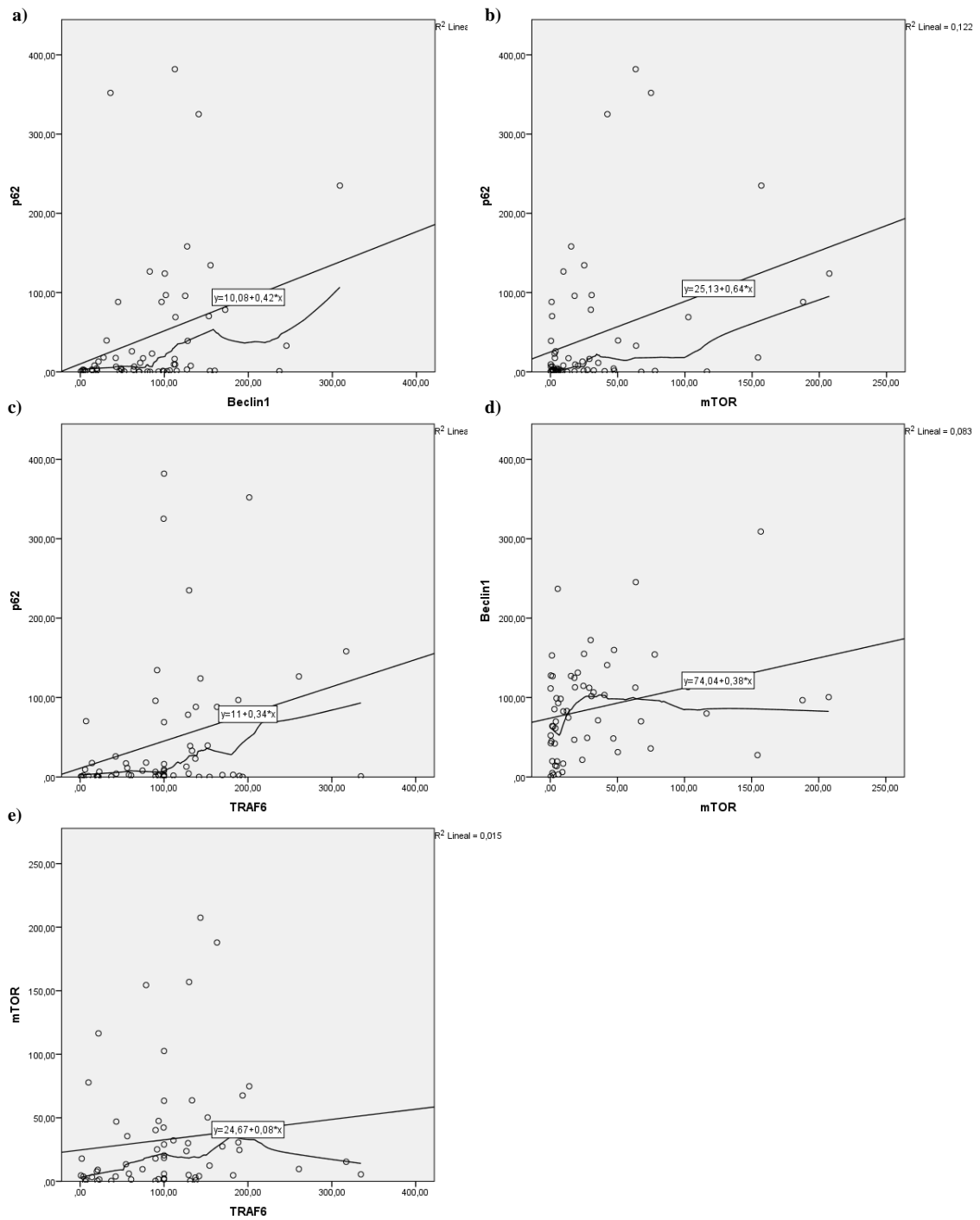


Figura 31. Representación gráfica de la correlación entre proteínas entre las que existe significación estadística. Correlación entre: a) p62 y Beclin1, CC=0.296 (p=0.022); b) p62 y mTOR, CC=0.265 (p=0.041); c) p62 y TRAF6, CC=0.280 (p=0.030); d) Beclin1 y mTOR, CC=0.341 (p=0.008); y e) mTOR y TRAF6, CC=0.297 (p=0.021).

En todos los casos en los que se encontró una asociación significativa, la correlación es positiva, y los coeficientes muestran una asociación discreta entre cada uno de los pares de proteínas comparadas.

## 2.9. Estado de la autofagia al analizar la expresión conjunta de p62 y LC3B

El estudio conjunto de la expresión de p62 y LC3B nos permite predecir cómo se encuentra la autofagia en los tumores analizados, agrupando para ello las muestras en cuatro grupos (Tabla 22). Este análisis nos ha permitido clasificar los tumores en cuatro grupos: 1) expresión baja de ambas; 2) expresión alta de p62 y baja de LC3B; 3) expresión baja de p62 y alta de LC3B, y 4) expresión alta de ambas [125].

Tabla 22. Expresión conjunta de p62 y LC3B en pacientes con CE.

	Expresión de p62+LC3B				Total
	1. bajo p62; bajo LC3B	2. alto p62; bajo LC3B	3. bajo p62; alto LC3B	4. alto p62; alto LC3B	
CE bajo grado	11 26,8%	2 4,9%	23 56,1%	5 12,2%	41 100,0%
CE alto grado	6 31,6%	2 10,5%	7 36,8%	4 21,1%	19 100,0%
<b>Total</b>	17 28,3%	4 6,7%	30 50,0%	9 15,0%	60 100,0%

Los tumores que pertenecen al grupo 1 presentan niveles basales de autofagia, mientras que los del grupo 3 presentan activación de la ruta. Por otro lado, los dos grupos restantes corresponden a autofagia aberrante; el grupo 2 correspondería a una autofagia basal interrumpida en etapas tardías del proceso y el grupo 4 a una autofagia activada, que también se ha visto interrumpida en etapas tardías del proceso [125].

Alrededor de un tercio de los tumores endometriales incluidos en nuestro trabajo pueden ser clasificados como del grupo 1, es decir, tienen una autofagia basal independientemente del grado tumoral. Un porcentaje muy bajo de los tumores, un 6.7% del total (4.9% de los CE de bajo y 10.5% de los de alto grado) presentan una

autofagia basal aberrante. La mayoría, un 50%, de los tumores analizados se pueden incluir en el grupo 3, lo que significa que tienen una autofagia activada, aunque este porcentaje varía entre los dos grados histológicos (56.1% de los CE de bajo grado y 36.8% de alto grado). Por último, un 15% de todos los tumores analizados, poseen una autofagia activada que se ha visto interrumpida y es aberrante, sobreexpresando ambas proteínas; un 21.1% de los pacientes con CE de alto grado tienen este patrón de expresión, mientras que de los tumores de bajo grado el porcentaje respecto al total es menor (12.2%).

### **2.10. Correlación entre el estado de la autofagia, la expresión de PIK3CA y mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN**

En un estudio previo de nuestro grupo se analizó mediante secuenciación por el método de Sanger la presencia de mutaciones patogénicas en los genes PIK3CA y PTEN en parte de la serie de tumores incluidos en nuestro trabajo [120], en este trabajo se ha completado el estudio genético en 15 pacientes que no habían sido incluidos. Como ya hemos señalado anteriormente PIK3CA y PTEN tienen funciones contrarias sobre la autofagia, siendo el primero un inhibidor y el segundo un activador; por ello, hemos estudiado el estado de la ruta autofágica (expresión conjunta de p62 y LC3B) en los tumores de endometrio de agrupándolos de acuerdo con la expresión de la proteína PIK3CA y con las mutaciones detectadas en los genes PIK3CA y PTEN (Tabla 23):

Tabla 23. Pacientes con CE analizados. Resultados de la expresión de PIK3CA, mutaciones en PIK3CA y PTEN y estado de la autofagia.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	Expresión de PIK3CA (%)	Mutación en PIK3CA	Mutación en PTEN	Estado de la autofagia (según p62+LC3)
2	EGI	105,17	p.Y1021H	no	Autofagia basal
3	EGI	1,90	p.M1043V	p.I253fsX2, p.L320S	Autofagia activada
5	EGI	43,94	p.N1044K	p.G132D, p.I253fsX2	Autofagia basal
6	EGII	1,08	no	p.G132A	Autofagia activada
7	EGI	3,05	no	p.R130P	Autofagia activada
9	EGII	118,41	no	p.136fsX1	Autofagia activada
10	EGII	74,87	no	no	Autofagia basal
12	EGII	100,21	no	p.R130G	Autofagia activada
15	EGI	87,62	no	no	Autofagia basal
16	EGI	11,72	p.H1065L	p.R130G	Autofagia basal
17	EGI	57,82	no	no	Autofagia activada
18	EGII	40,68	no	p.R130Q, p.T131P	Autofagia activada
19	EGII	59,77	no	no	Autofagia activada
20	EGI	53,07	p.M1043V	no	Autofagia activada
21	EGI	51,09	no	p.N323insAfsX1	Autofagia activada
22	EGI	78,71	no	p.R335X	Autofagia activada
23	EGI	110,82	no	p.E299X	Autofagia activada
26	EGII	115,31	no	p.N323insAfsX1	Autofagia activada
27	EGII	7,17	no	no	Autofagia activada interrumpida
28	EGII	33,59	no	p.R130P, p.R130L	Autofagia activada
29	EGII	63,04	no	no	Autofagia activada
32	EGII	48,51	no	no	Autofagia activada
33	EGII	122,83	no	p.R130G, p.R130L, p.V158V	Autofagia activada
34	EGII	102,09	no	no	Autofagia activada interrumpida
35	EGI	10,47	no	no	Autofagia activada
36	EGI	3,74	no	no	Autofagia basal
38	EGI	1,65	no	no	Autofagia basal
40	EGI	1,58	no	no	Autofagia basal interrumpida
41	EGI	5,33	no	p.A262TfsX4	Autofagia activada
42	EGII	0,55	no	p.R233X	Autofagia basal
45	EGI	6,86	no	no	Autofagia basal interrumpida
47	EGII	6,03	no	p.D92H, p.T318_320fsX, p.L42P	Autofagia activada
48	EGI	13,58	p.C420R	no	Autofagia basal
51	EGII	1,23	no	no	Autofagia activada
53	EGI	10,49	no	no	Autofagia activada
54	EGI	41,36	no	no	Autofagia basal
55	EGI	29,64	no	no	Autofagia basal
56	EGI	66,64	p.Q546R	p.F341V	Autofagia activada interrumpida
57	EGII	17,87	no	no	Autofagia activada interrumpida
58	EGI	16,91	no	no	Autofagia activada interrumpida
60	EGI	4,90	no	p.T318_320fsX	Autofagia activada
1	TM	30,05	no	p.R172fsX6	Autofagia activada
4	TM	44,70	no	no	Autofagia activada interrumpida
8	S	49,73	no	no	Autofagia basal
11	S	41,45	no	no	Autofagia basal
13	EGIII	8,60	no	p.P248fsX6	Autofagia activada
14	CS	15,58	no	p.E256X	Autofagia activada
24	EGIII	68,58	p.K1024N, p.T1025A	p.R130Q, p.R142W, p.R173Y	Autofagia activada
25	TM	307,99	no	no	Autofagia activada
30	TM	1,03	p.M1043I	no	Autofagia activada interrumpida
31	S	6,83	no	no	Autofagia activada
37	S	1,09	no	no	Autofagia activada
39	EGIII	10,66	no	p.R130G	Autofagia activada interrumpida
43	TM	1,34	no	no	Autofagia basal
44	EGIII	61,70	p.M1043V	p.E285X, p.T68H	Autofagia basal
46	CS	4,97	no	p.W274X	Autofagia basal
49	MX	100,49	no	no	Autofagia activada interrumpida
50	S	298,30	no	no	Autofagia basal interrumpida
52	EGIII	25,51	no	no	Autofagia basal
59	CC	43,13	no	no	Autofagia basal interrumpida

Nuestros resultados muestran que 10 tumores presentan mutaciones en PIK3CA y 26 en PTEN, en 6 coexisten mutaciones en ambos genes y 30 no poseen mutaciones en ninguno de los dos genes.

De los 10 tumores (16.6%) con mutaciones en el gen PIK3CA, 7 presentan niveles disminuidos de expresión de la proteína y 3 sobreexpresión.

Asimismo, se analizó la posible relación entre mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN y el estado del proceso de autofagia de las muestras analizadas. De los tumores incluidos (n=60), 4 contienen mutaciones en PIK3CA, pero poseen PTEN germinal. De estos cuatro tumores, el 50% presentó una autofagia basal y el otro 50% activada (Tabla 24):

**Tabla 24. Pacientes con PIK3CA mutado y PTEN germinal.**

Estado de la autofagia (según p62+LC3B)	Nº de Tumores
Autofagia basal	2
Autofagia basal interrumpida	0
Autofagia activada	1
Autofagia activada interrumpida	1
<b>Total: 4</b>	

De las 26 muestras que contienen mutaciones en PTEN, 20 presentan PIK3CA germinal. La mayoría de tumores con mutaciones solo en PTEN presentaron una autofagia activada (expresión de p62 disminuida y alta de LC3B) (Tabla 25):

**Tabla 25. Pacientes con PIK3CA germinal y PTEN mutado.**

Estado de la autofagia (según p62+LC3B)	Nº de Tumores
Autofagia basal	2
Autofagia basal interrumpida	0
Autofagia activada	17
Autofagia activada interrumpida	1
<b>Total: 20</b>	

En los 6 tumores de nuestra cohorte en los que coexisten mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN, tres tumores mostraron niveles de autofagia basal y los otros tres activada. (Tabla 26):

**Tabla 26. Pacientes con PIK3CA y PTEN mutados.**

Estado de la autofagia (según p62+LC3B)	Nº de Tumores
Autofagia basal	3
Autofagia basal interrumpida	0
Autofagia activada	2
Autofagia activada interrumpida	1
<b>Total: 6</b>	

Por último, 30 tumores no presentaron mutaciones en ninguno de los dos genes y observamos niveles basales de autofagia en el 46.6% y activación de la misma en un 53.3%. (Tabla 27):

**Tabla 27. Pacientes con PIK3CA y PTEN germinales.**

Estado de la autofagia (según p62+LC3B)	Nº de Tumores
Autofagia basal	10
Autofagia basal interrumpida	4
Autofagia activada	10
Autofagia activada interrumpida	6
<b>Total: 30</b>	

### **3. Efecto del tratamiento con Panobinostat®, cloroquina y metformina en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio**

Con el fin de estudiar la respuesta de tumores de endometrio a nuevas estrategias terapéuticas, se seleccionaron tres fármacos diferentes: Panobinostat®, un inhibidor de histonas desacetilasas; la cloroquina, usado comúnmente como antimalárico y actualmente, utilizado como inhibidor de la autofagia; y la metformina, un conocido antidiabético recientemente asociado con protección frente al cáncer.

#### **3.1. Estudio del efecto de Panobinostat® en líneas tumorales de carcinoma de endometrio**

La incubación con Panobinostat® (LBH589) en las cuatro líneas celulares derivadas de cáncer de endometrio: AN3CA, HEC1B, KLE y SKUT1, se llevó a cabo con cinco concentraciones diferentes de LBH589 (10nM, 25nM, 50nM, 75nM y 100nM), hasta un máximo de 72 horas. Como se muestra en la Figura 32, se observó una inhibición del crecimiento celular en todas las líneas y a todas las concentraciones, siendo más eficaz desde 25nM.

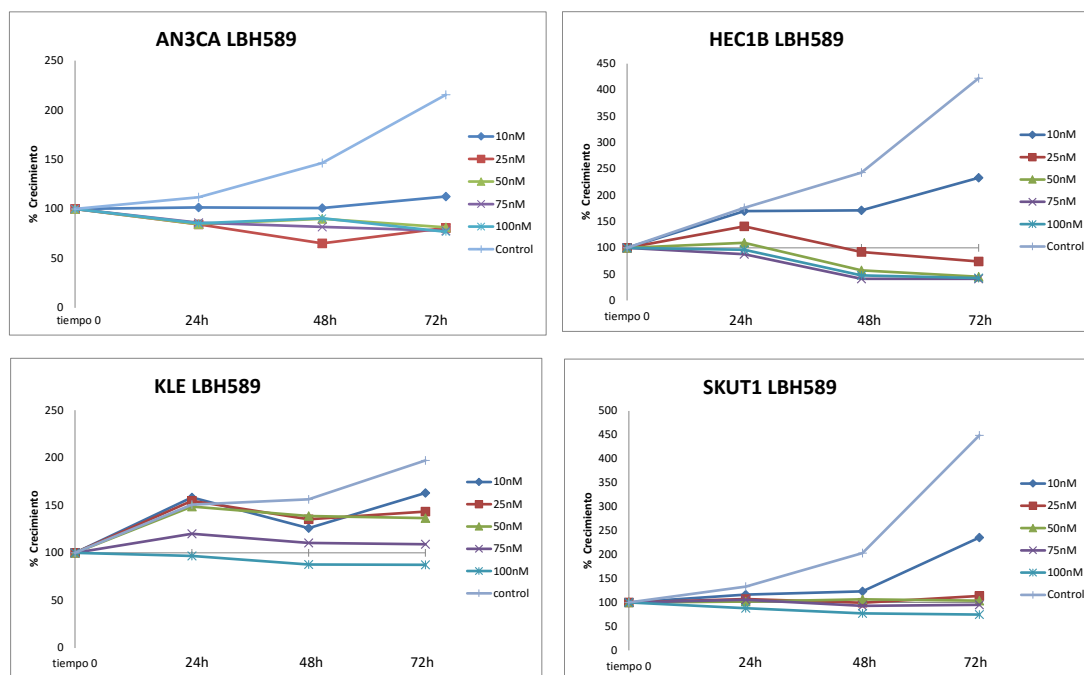


Figura 32. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de CE tratadas con LBH589 durante 24, 48 y 72 horas. Se observa una susceptibilidad al compuesto en todas las líneas, con inhibición del crecimiento a todas las concentraciones. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de dos experimentos independientes.

Las células tratadas a la concentración de 10nM mantienen la capacidad de proliferar, aunque en una proporción mucho menor que las células sin tratamiento. A partir de 25nM todas las líneas muestran una marcada inhibición de la viabilidad, siendo esto observable gráficamente desde las 24 horas en contacto el fármaco.

El estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo se realizó con una concentración intermedia de fármaco (50nM) tras la incubación durante 72 horas. Los resultados se muestran representados gráficamente en la Figura 33:



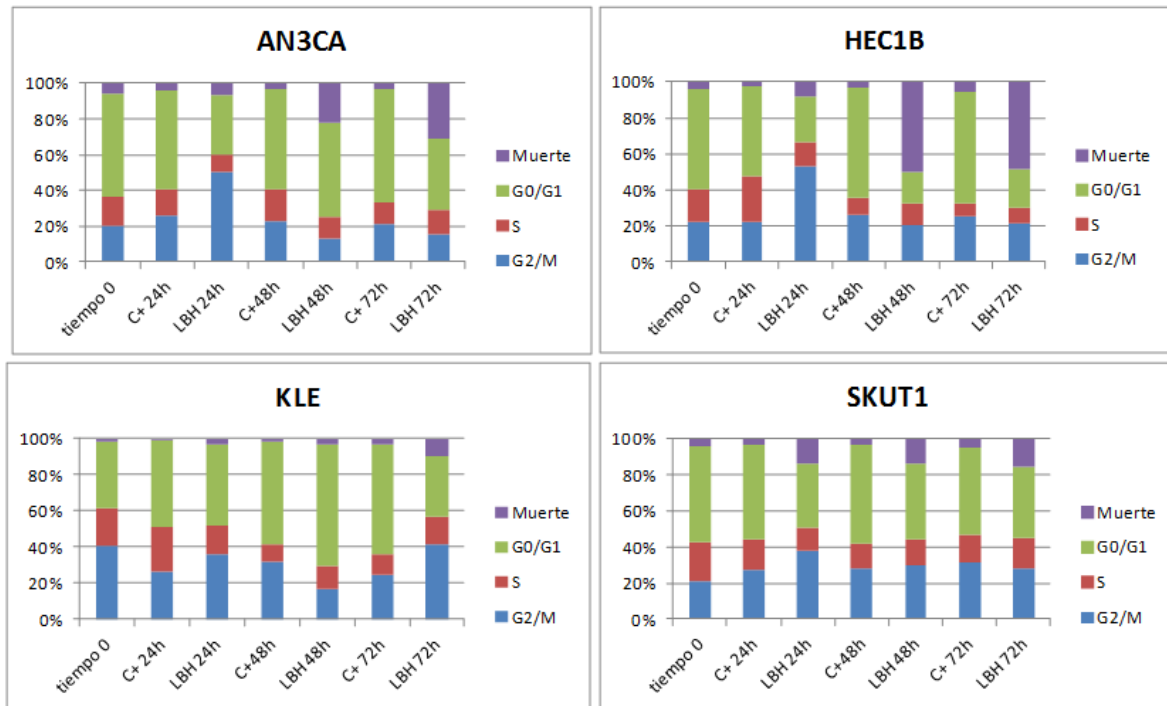


Figura 33. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las cuatro líneas celulares de CE tratadas con LBH589 50nM. Se puede observar una respuesta diferente al fármaco en las distintas líneas, presentando AN3CA y HEC1B una alta tasa de muerte celular. Las líneas KLE y SKUT1 muestran una menor muerte celular, aunque siempre mayor que las células sin tratamiento. [Tiempo 0: corresponde al análisis del ciclo al comienzo del experimento, sin tratamiento.; C+: control sin tratamiento a cada uno de los tiempos analizados]. Los datos representados corresponden a la media de dos experimentos independientes.

El análisis de los resultados mostró una tasa de mortalidad mayor en las células tratadas que en los controles. La línea celular AN3CA tratada no muestra diferencias frente a la no tratada a las 24 horas ( $p=0.334$ ), pero la tasa de mortalidad aumenta notablemente hasta el 22.7% a las 48h, ( $p<0.01$ ) y el 31.39% a las 72h ( $p<0.01$ ). La línea celular HEC1B muestra ya a las 24 horas una mortalidad superior a la no tratada, pero después se incrementa hasta casi un 50% a las 48 y 72 horas ( $p<0.05$ ). Las células de las líneas celulares KLE y SKUT1 presentan una mortalidad más moderada frente al fármaco. En las células KLE se observa una mortalidad ligeramente mayor con LBH que sin tratamiento a las 72 horas ( $p<0.01$ ), mientras que en SKUT1, aunque más discreta que en las dos primeras líneas, se observa un mayor porcentaje de muerte desde las 24 horas de tratamiento, un 13.84% a las 24 horas ( $p<0.05$ ), un 14.08% a las 48 horas ( $p<0.05$ ) y un 15.85% a las 72 horas ( $p<0.01$ ). Cabe destacar que las líneas

AN3CA, HEC1B y SKUT1 presentan un bloqueo en la fase G2/M a las 24 horas de tratamiento ( $p < 0.05$  en las tres líneas). Por otro lado, KLE muestra un aumento de células en G2/M a las 72 horas de tratamiento, que coincide con el mayor porcentaje de células muertas ( $< G0/G1$ ).

Para determinar si existía un efecto del LBH589 sobre la autofagia, se analizó la expresión de proteínas mediante western blot e inmunofluorescencia. El ensayo de western blot se llevó a cabo tras la incubación con LBH589 50nM durante 24, 48 y 72 horas, tras ello, se extrajeron proteínas y se estudió la expresión de p62, LC3B y Beclin1.

La expresión de p62 en las muestras tratadas con LBH589 disminuyó en las cuatro líneas de CE utilizadas (Figura 34). En la línea AN3CA se observó una disminución del 50% en la expresión de p62. KLE y SKUT1 mostraron un fragmento adicional de mayor tamaño que p62 que aumenta su expresión con el tiempo de exposición al fármaco.

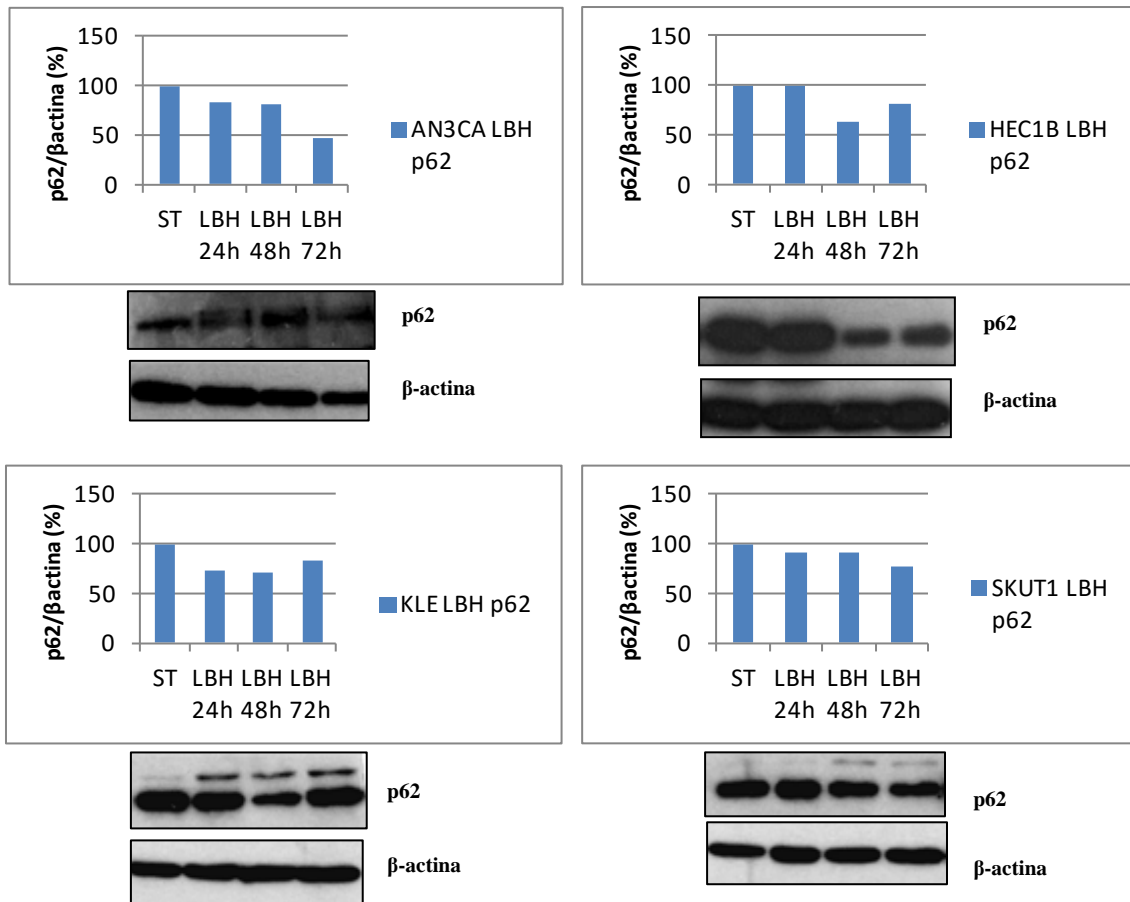


Figura 34. Expresión de la proteína p62 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con LBH589 50nM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio p62/β-actina. [ST: células sin tratamiento; β-actina: control de carga].

El tratamiento con LBH589 50nM causa un ligero aumento en la expresión de la proteína Beclin1 similar en todas las líneas celulares (Figura 35).

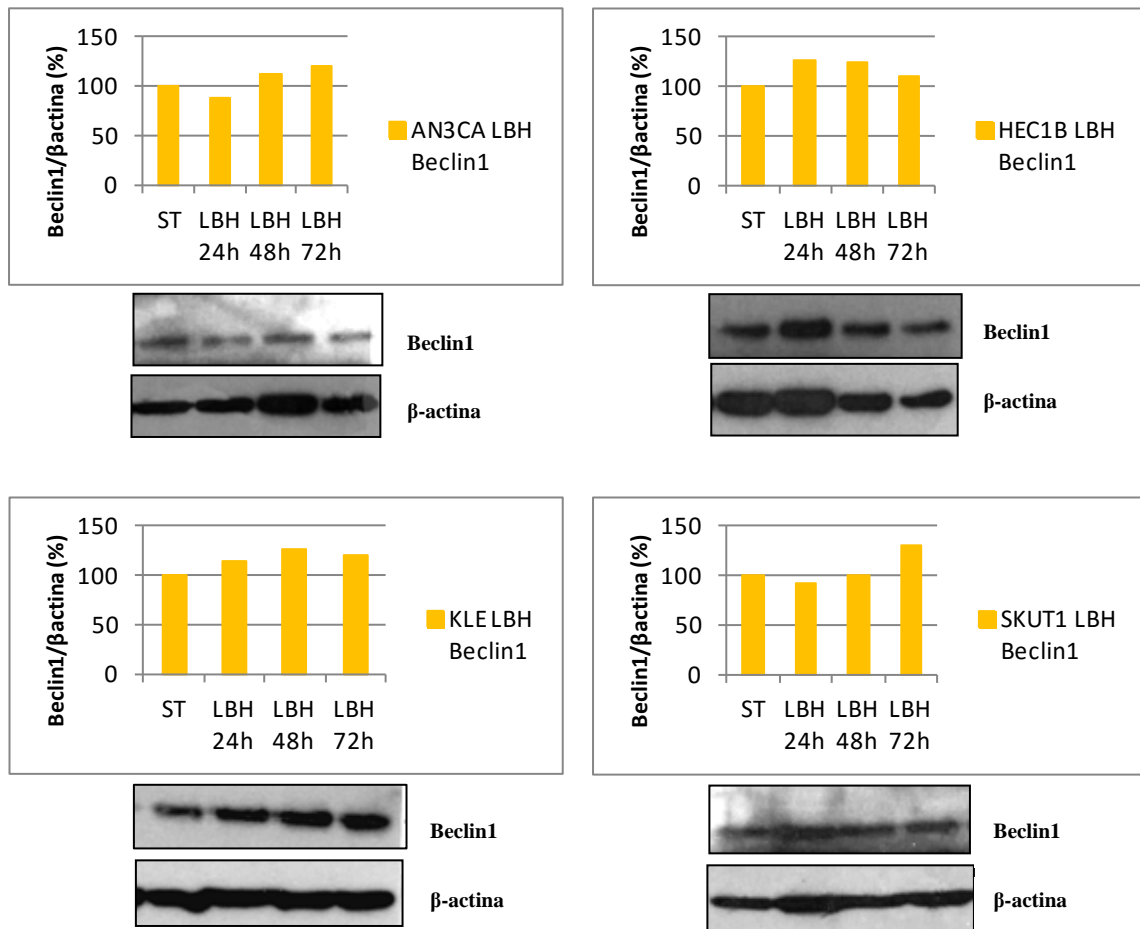


Figura 35. Expresión de la proteína Beclin1 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con LBH589 50nM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio Beclin1/β-actina. [ST: células sin tratamiento; β-actina: control de carga].

La expresión de LC3B-II aumentó muy ligeramente al incrementar el tiempo de exposición al fármaco en las líneas AN3CA, KLE y HEC1B. Sin embargo, en la línea celular SKUT1 se observó un aumento de expresión muy acusado (Figura 36).

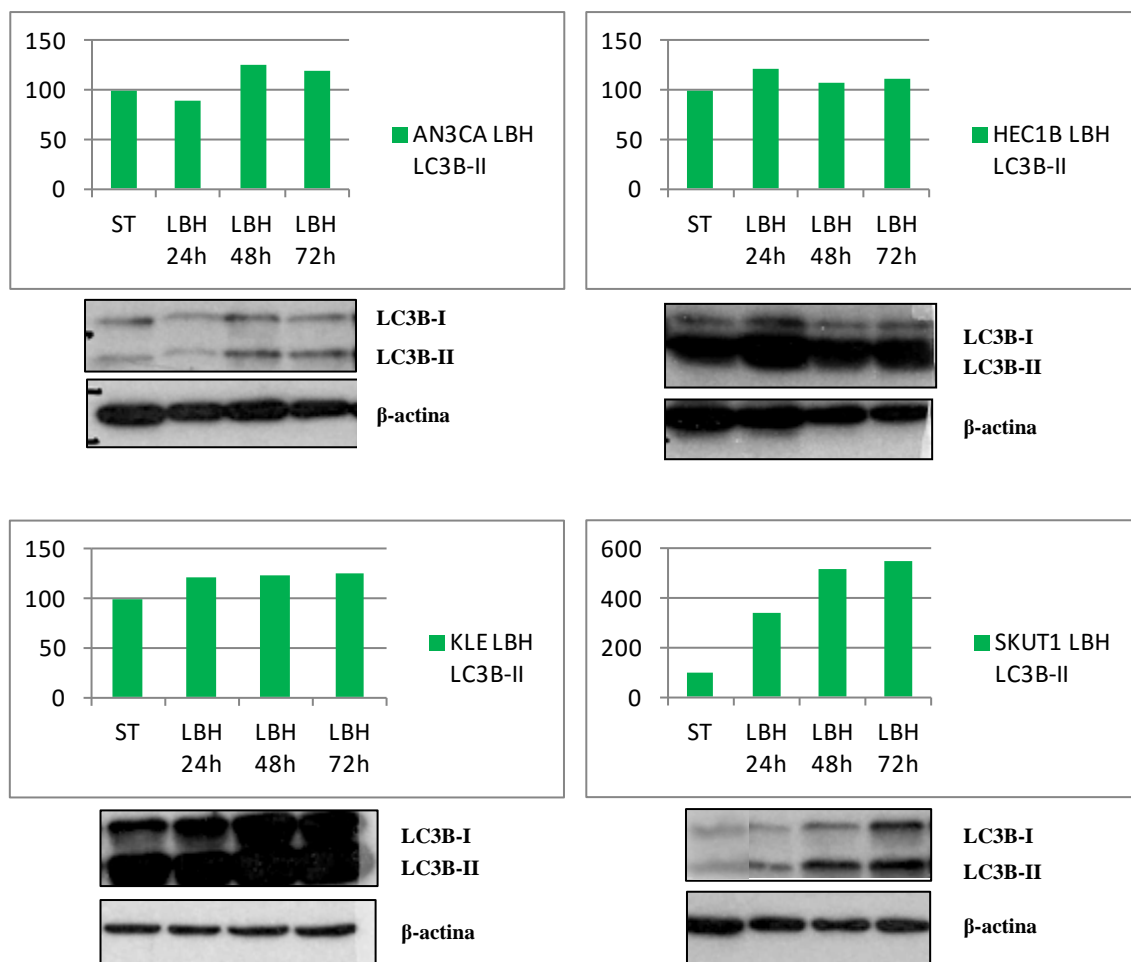


Figura 36. Expresión de la proteína LC3B en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con LBH589 50nM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio LC3B-II/ $\beta$ -actina. Se representa únicamente la isoforma II puesto que es la más sensible a variaciones en el flujo de autofagia. [ST: células sin tratamiento;  $\beta$ -actina: control de carga].

Por otro lado, tras incubar las cuatro líneas celulares durante 72h con LBH589 se realizó una inmunofluorescencia, observando, al igual que en los estudios de western blot, una ligera disminución de la expresión de p62, más visible en la línea AN3CA. La proteína p62 se distribuye por todo el citoplasma, en todas las líneas celulares y en las líneas HEC1B, KLE y SKUT1 se observa un pequeño número de acúmulos de la proteína (Figura 37). La proteína LC3B se localiza por todo el citoplasma y también en el núcleo, y en la línea celular SKUT1 se observan acúmulos de la proteína (Figura 38).

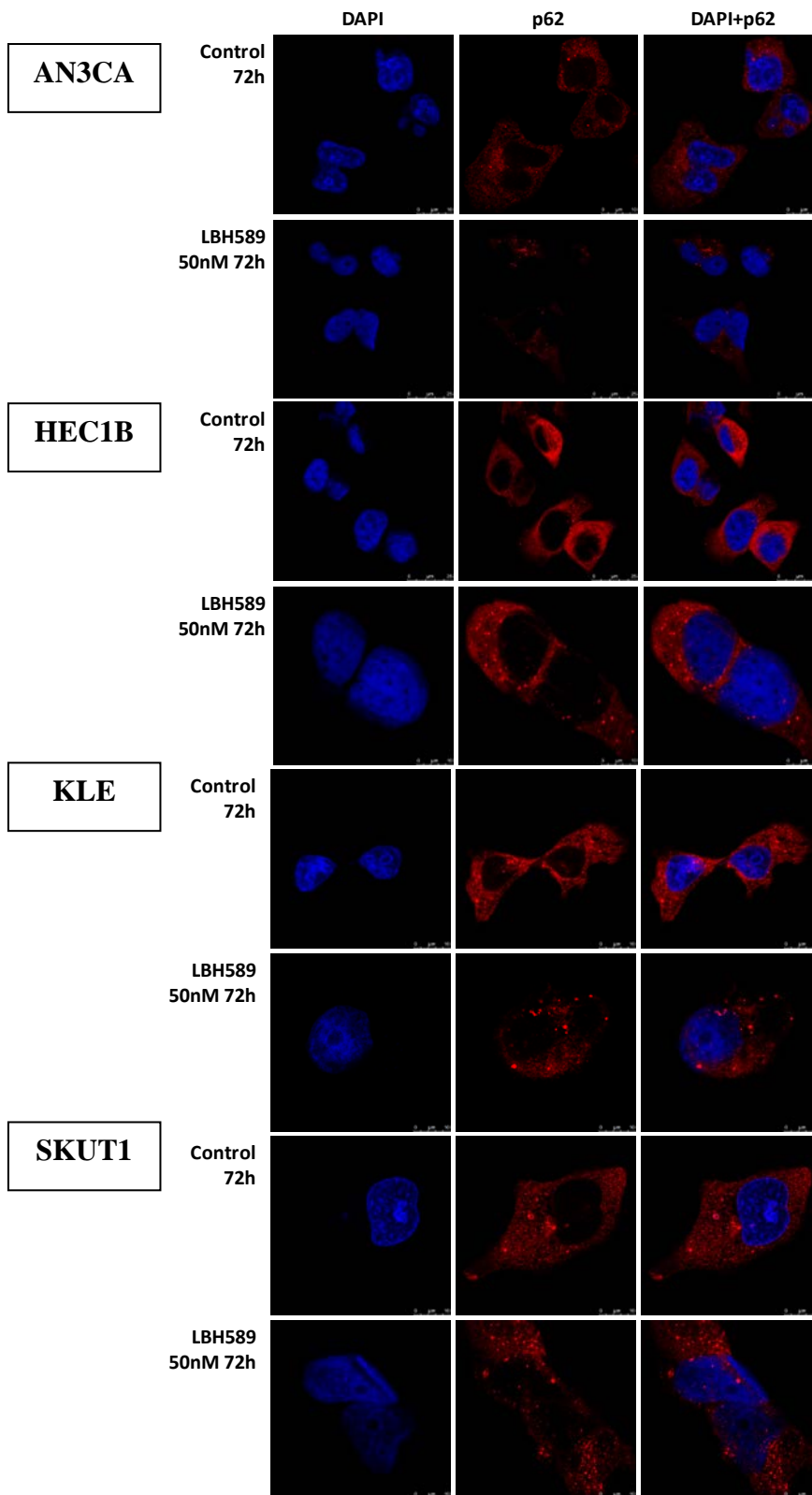


Figura 37. Expresión de p62 mediante inmunofluorescencia en células tratadas con LBH589 50nM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); p62: rojo].

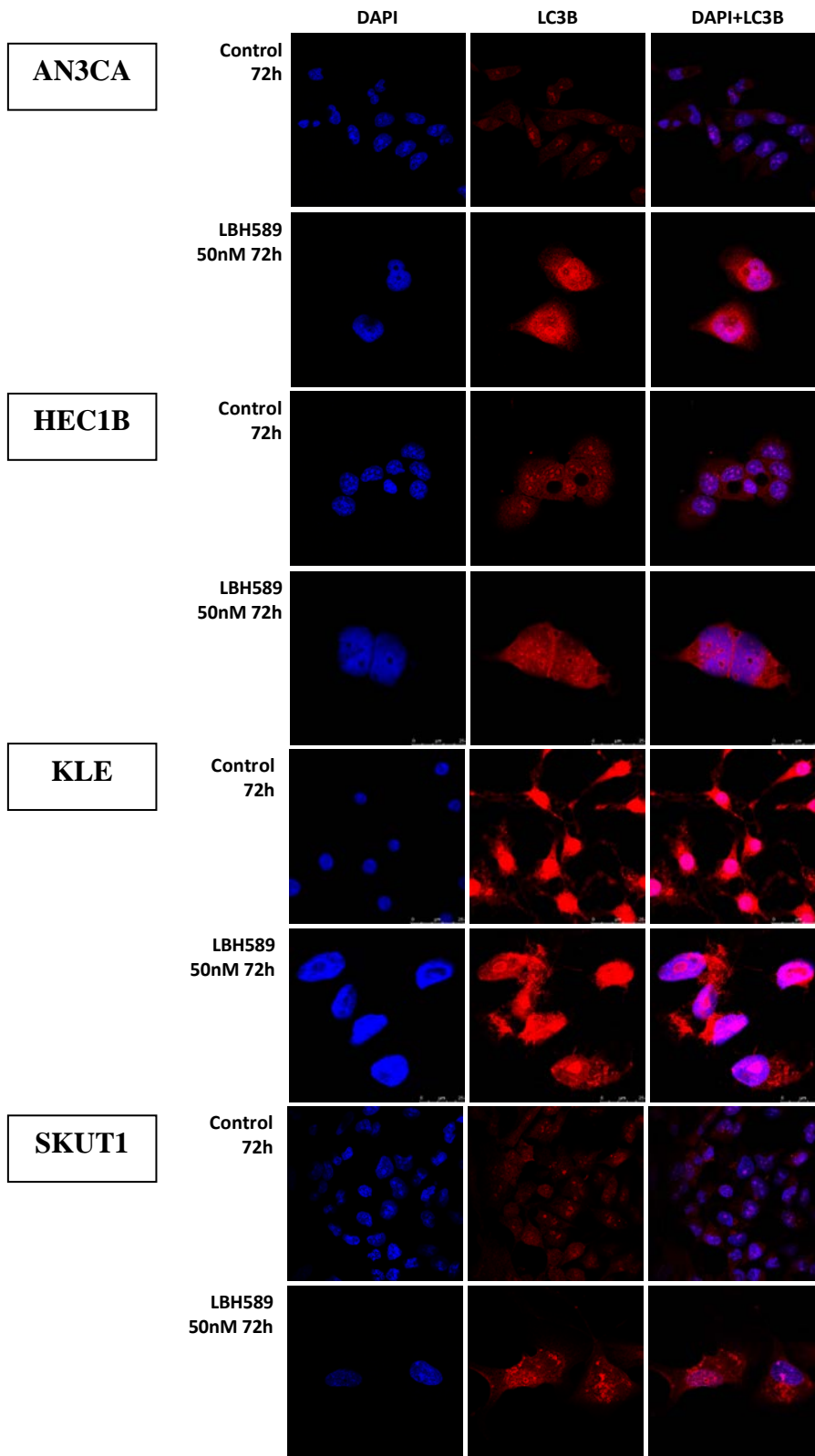


Figura 38. Expresión de LC3B mediante inmunofluorescencia en células tratadas con LBH589 50nM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); LC3B: rojo].

### 3.2. Estudio del efecto de la cloroquina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio

Las líneas celulares de carcinoma de endometrio se sometieron al tratamiento con un fármaco inhibidor de la autofagia, la cloroquina, con concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125  $\mu\text{M}$  del fármaco (Figura 39).

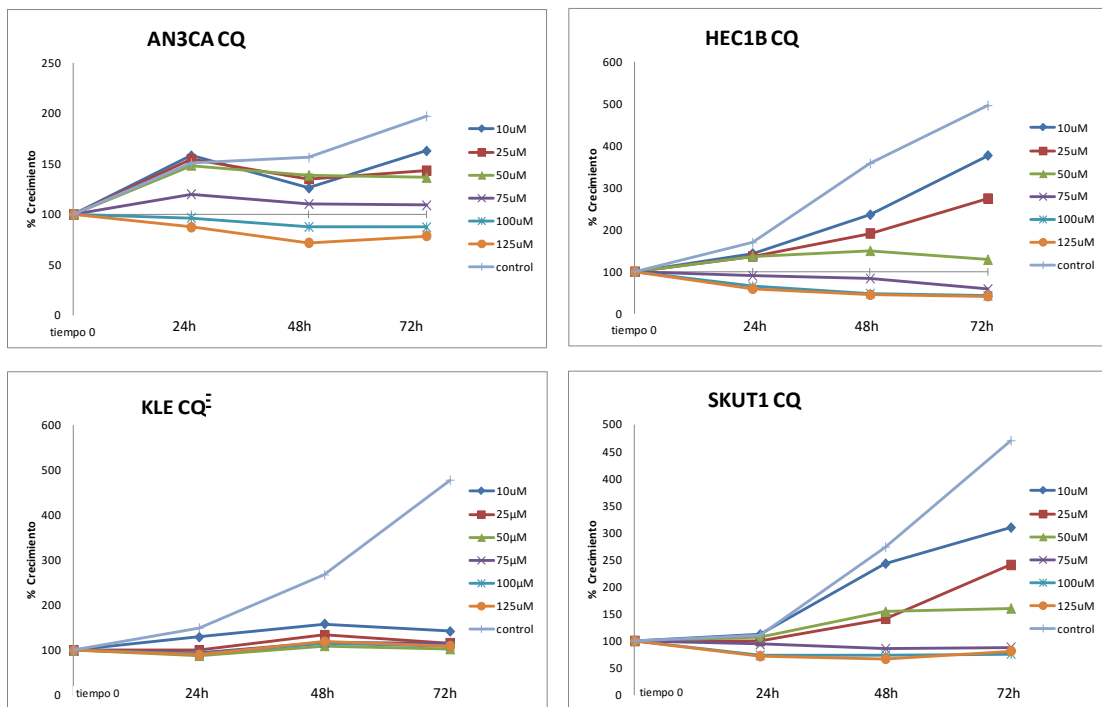


Figura 39. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de CE tratadas con cloroquina durante 24, 48 y 72 horas. Se observa una susceptibilidad al compuesto en todas las líneas, con inhibición gradual del crecimiento según aumenta la concentración de fármaco. KLE parece más sensible, ya que su crecimiento se bloquea desde la menor concentración. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de dos experimentos independientes.

La incubación de las células AN3CA, HEC1B y SKUT1 con concentraciones crecientes de cloroquina muestra una disminución de la viabilidad celular. Por otro lado, la línea KLE es más susceptible a la cloroquina que los demás tipos celulares, presentando una inhibición significativa del crecimiento desde 10  $\mu\text{M}$ .

Para llevar a cabo el estudio del ciclo celular bajo el efecto de este compuesto se seleccionó la concentración de 25  $\mu\text{M}$  de cloroquina (Figura 40):



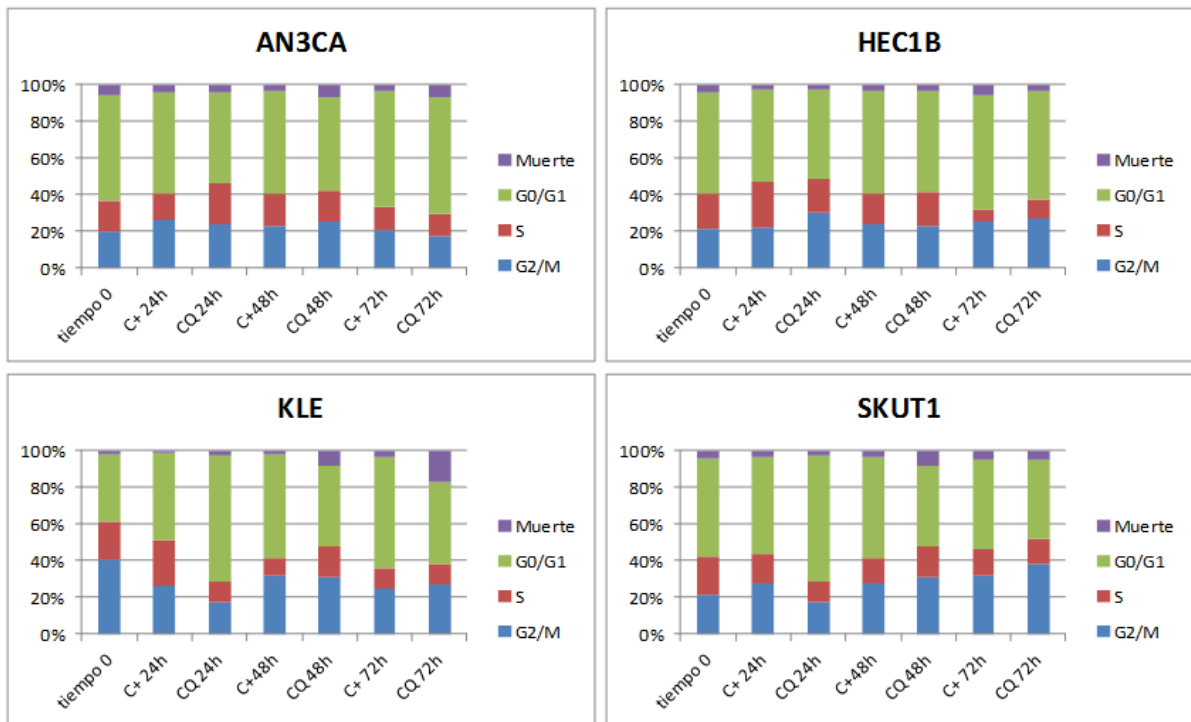


Figura 40. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las cuatro líneas celulares de CE tratadas con cloroquina 25 $\mu$ M. Todas las líneas muestran un discreto efecto del fármaco en el ciclo celular, en AN3CA hay un aumento muy ligero en la tasa de mortalidad respecto al control y en KLE es un aumento más notable. [Tiempo 0: corresponde al análisis del ciclo al comienzo del experimento, sin tratamiento.; C+: control sin tratamiento a cada uno de los tiempos analizados]. Los datos representados corresponden a la media de dos experimentos independientes.

El tratamiento con cloroquina a 25 $\mu$ M durante 72 horas no produjo cambios significativos respecto a las fases del ciclo celular. En AN3CA y KLE se produjo un aumento en la mortalidad, tan solo del 6.8% en la primera, y desde un 7.81% a las 48 horas hasta un 16.96% a las 72 horas ( $p < 0.05$ ) en la segunda.

Se analizó el efecto que causaba el tratamiento con cloroquina sobre la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en líneas celulares de carcinoma de endometrio. Para ello se cuantificó la expresión de p62, Beclin1 y LC3B en células tratadas con cloroquina 25 $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas, además de en células no tratadas. La expresión de p62 aumentó en todas las líneas celulares de carcinoma de endometrio (Figura 41).

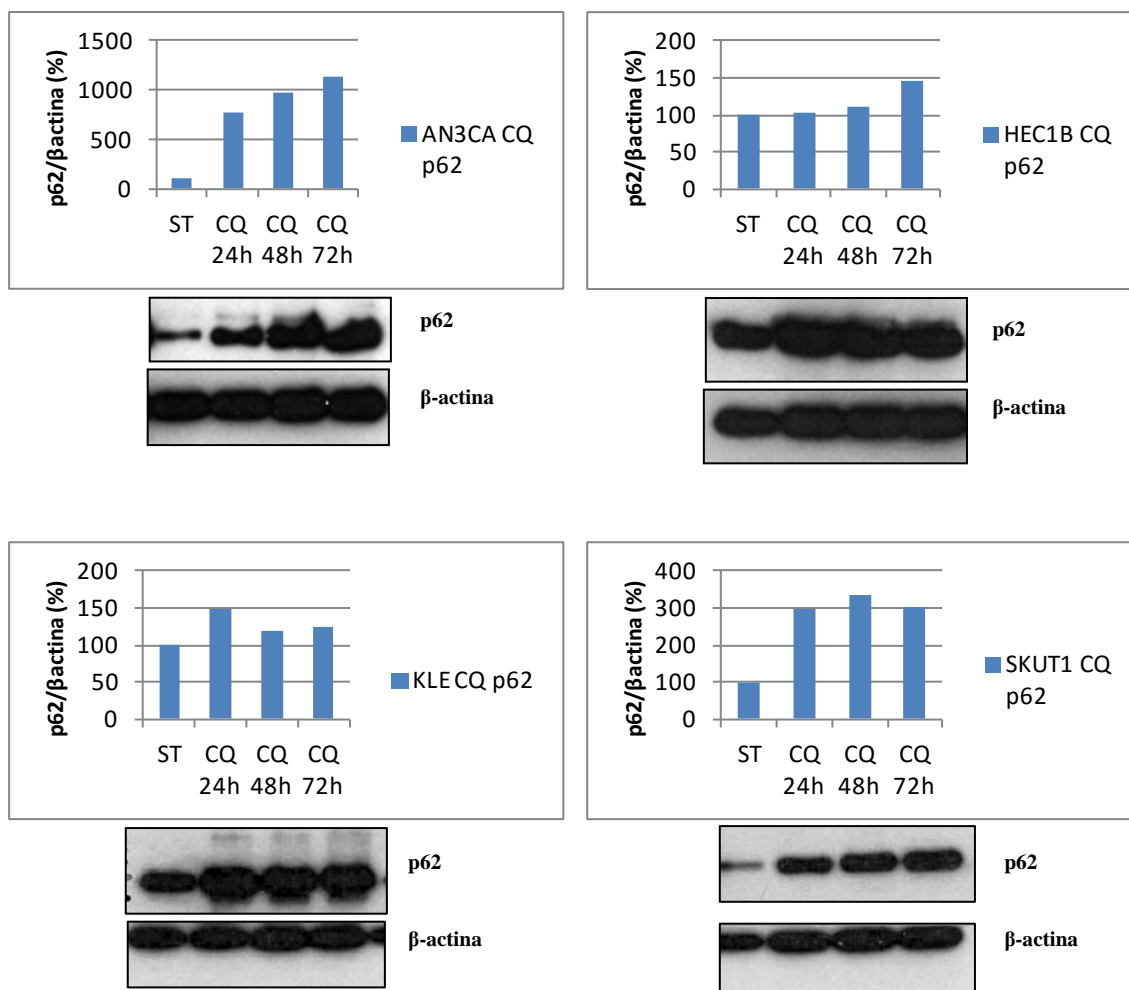


Figura 41. Expresión de la proteína p62 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con cloroquina 25 $\mu$ M. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio p62/ $\beta$ -actina. [ST: células sin tratamiento;  $\beta$ -actina: control de carga].

En las líneas AN3CA y SKUT1 el aumento de expresión es muy significativo respecto a las células no tratadas y parece incrementarse cuanto mayor es el tiempo de exposición a la droga. En las otras dos líneas, HEC1B y KLE también aumentó p62, pero en este caso de manera menos acusada.

La expresión de Beclin1 es diferente en las distintas líneas celulares utilizadas. La expresión de la proteína aumentó al incubar con cloroquina las líneas AN3CA y SKUT1, siendo este incremento progresivo y máximo a las 72 horas. Las células HEC1B y KLE apenas mostraron cambios en la expresión de esta proteína (Figura 42).

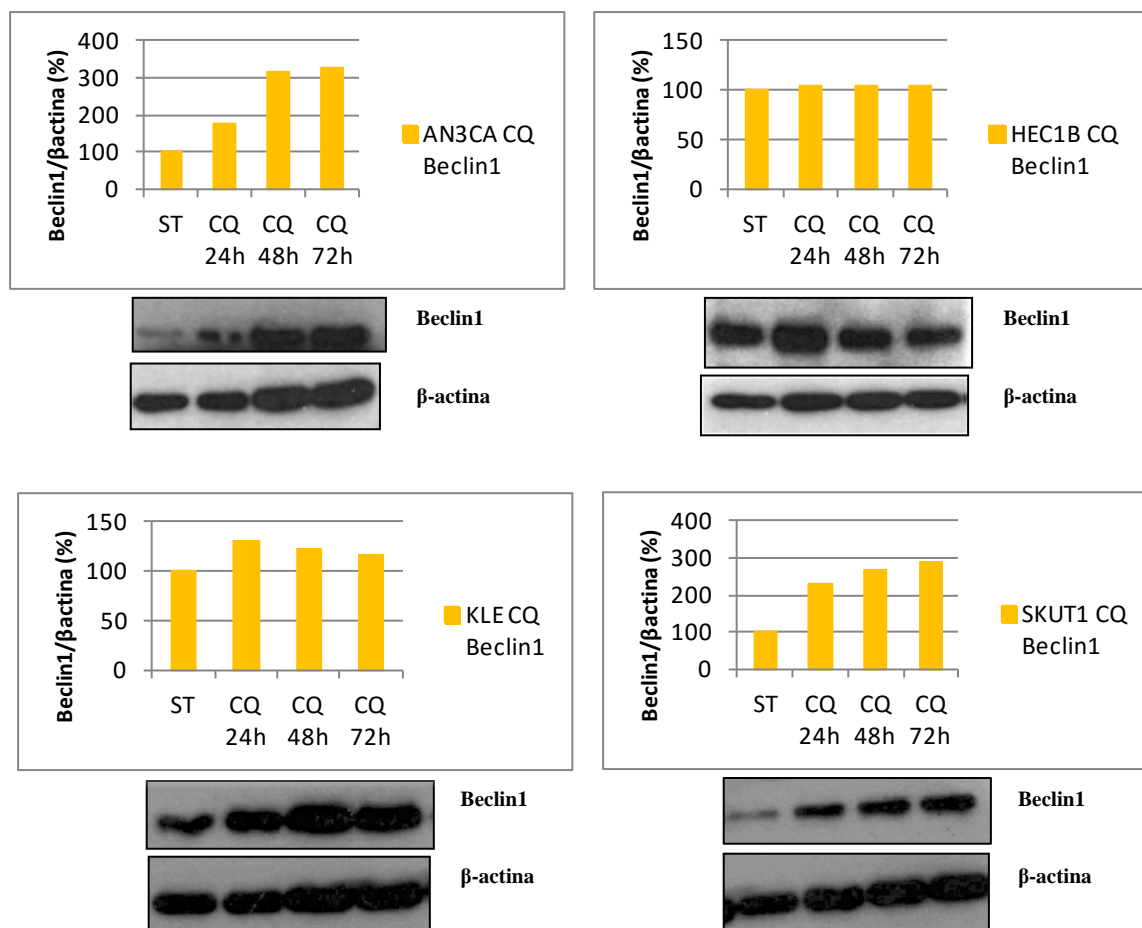


Figura 42. Expresión de la proteína Beclin1 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con cloroquina 25 $\mu$ M. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio Beclin1/ $\beta$ -actina. [ST: células sin tratamiento;  $\beta$ -actina: control de carga].

El análisis de la expresión de LC3B tras el tratamiento con cloroquina muestra un aumento de expresión en todas las líneas celulares respecto a las células sin tratar, y la expresión de la proteína aumenta con el tiempo de exposición al fármaco. En todos los casos la isoforma citosólica (LC3B-I) también aumentó su expresión (Figura 43).

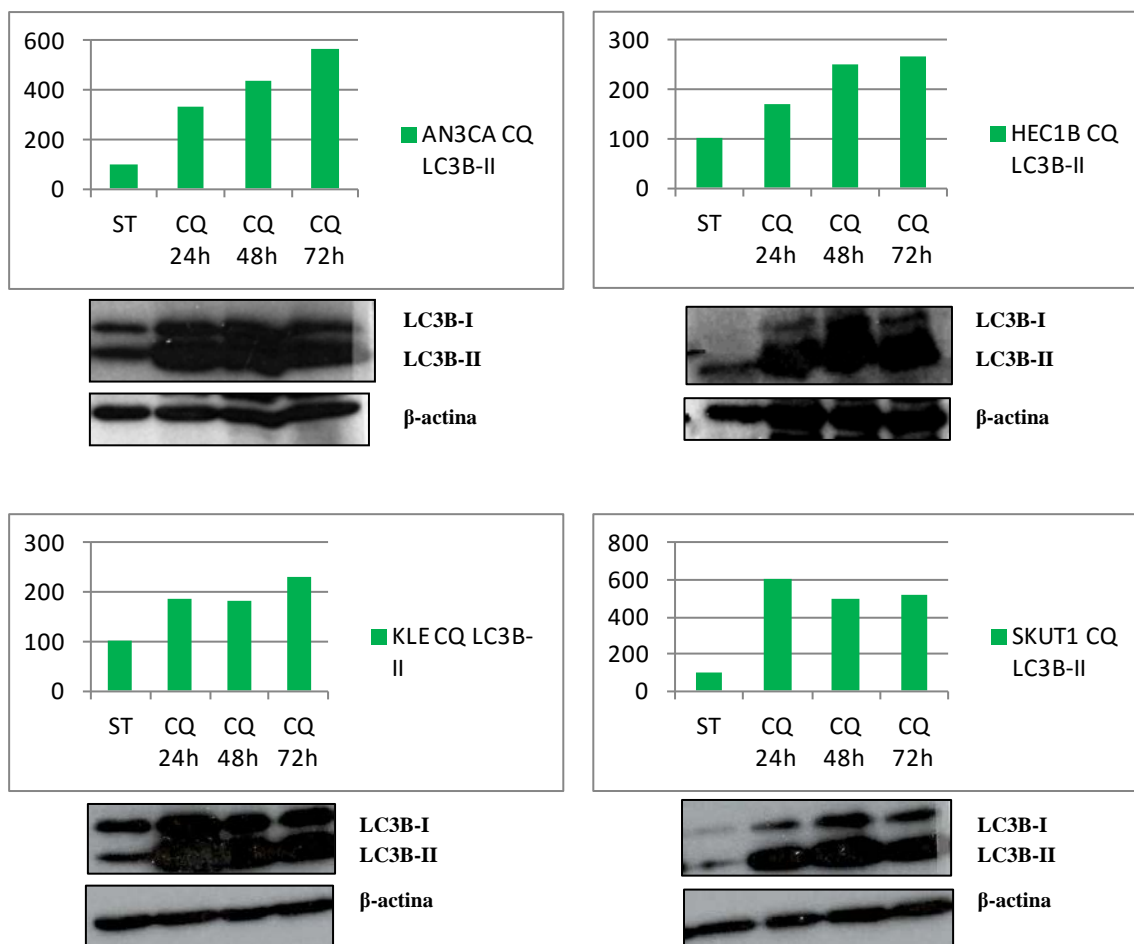


Figura 43. Expresión de la proteína LC3B en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con cloroquina 25 $\mu$ M. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio LC3B-II/ $\beta$ -actina. Se representa únicamente la isoforma II puesto que es la más sensible a variaciones en el flujo de autofagia. [ST: células sin tratamiento;  $\beta$ -actina: control de carga].

Para observar el efecto de la cloroquina sobre las proteínas p62 y LC3B dentro de las células se realizó una inmunofluorescencia. En todas las líneas celulares se observa el incremento de p62 en forma de acúmulos el citoplasma celular (Figura 44). La proteína LC3B en células con el compuesto se presenta en forma de acúmulos principalmente en proximidad al núcleo, no observable en células sin tratamiento (Figura 45).

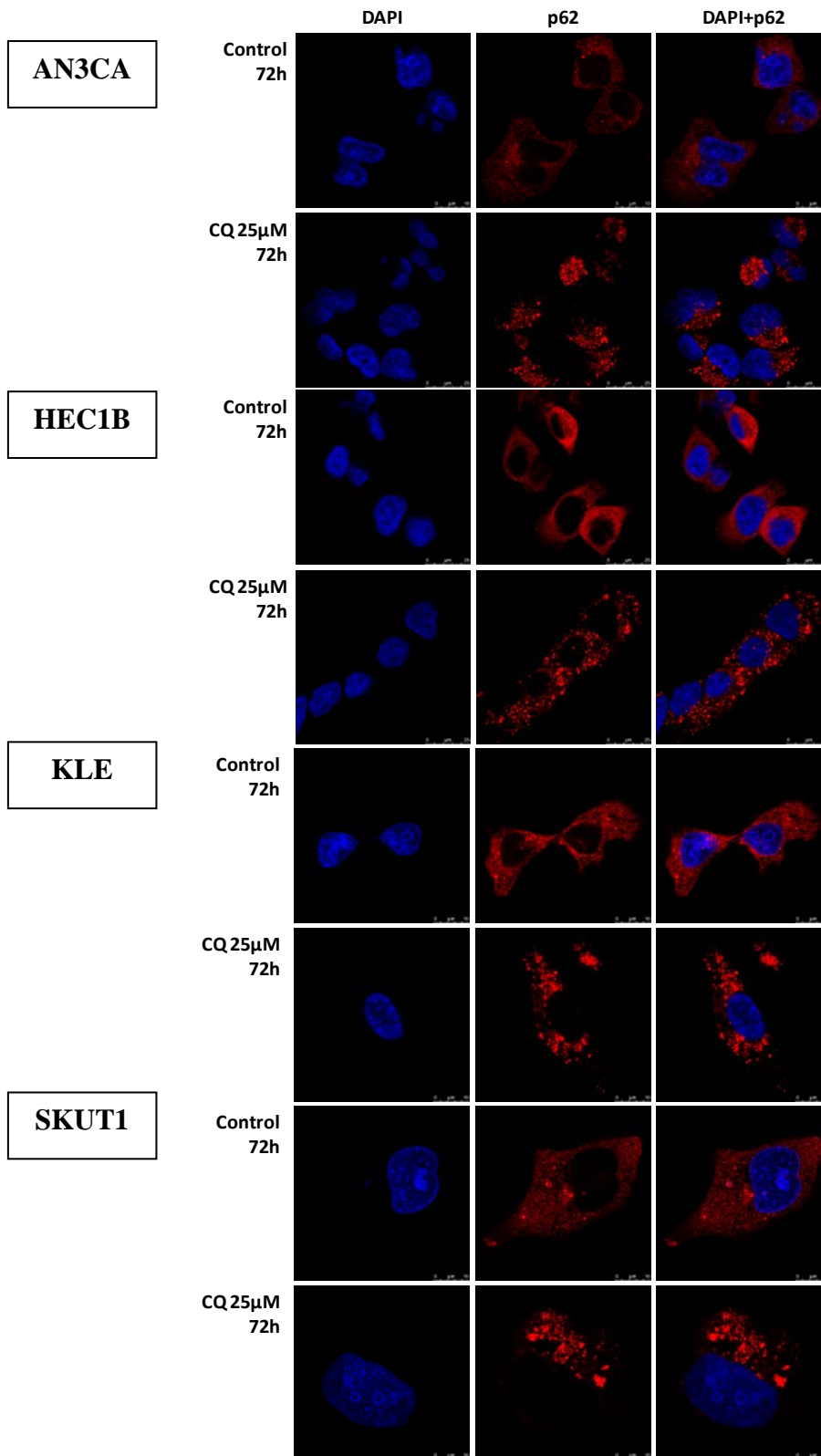


Figura 44. Expresión de p62 mediante inmunofluorescencia en células tratadas con cloroquina 25µM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); p62: rojo].

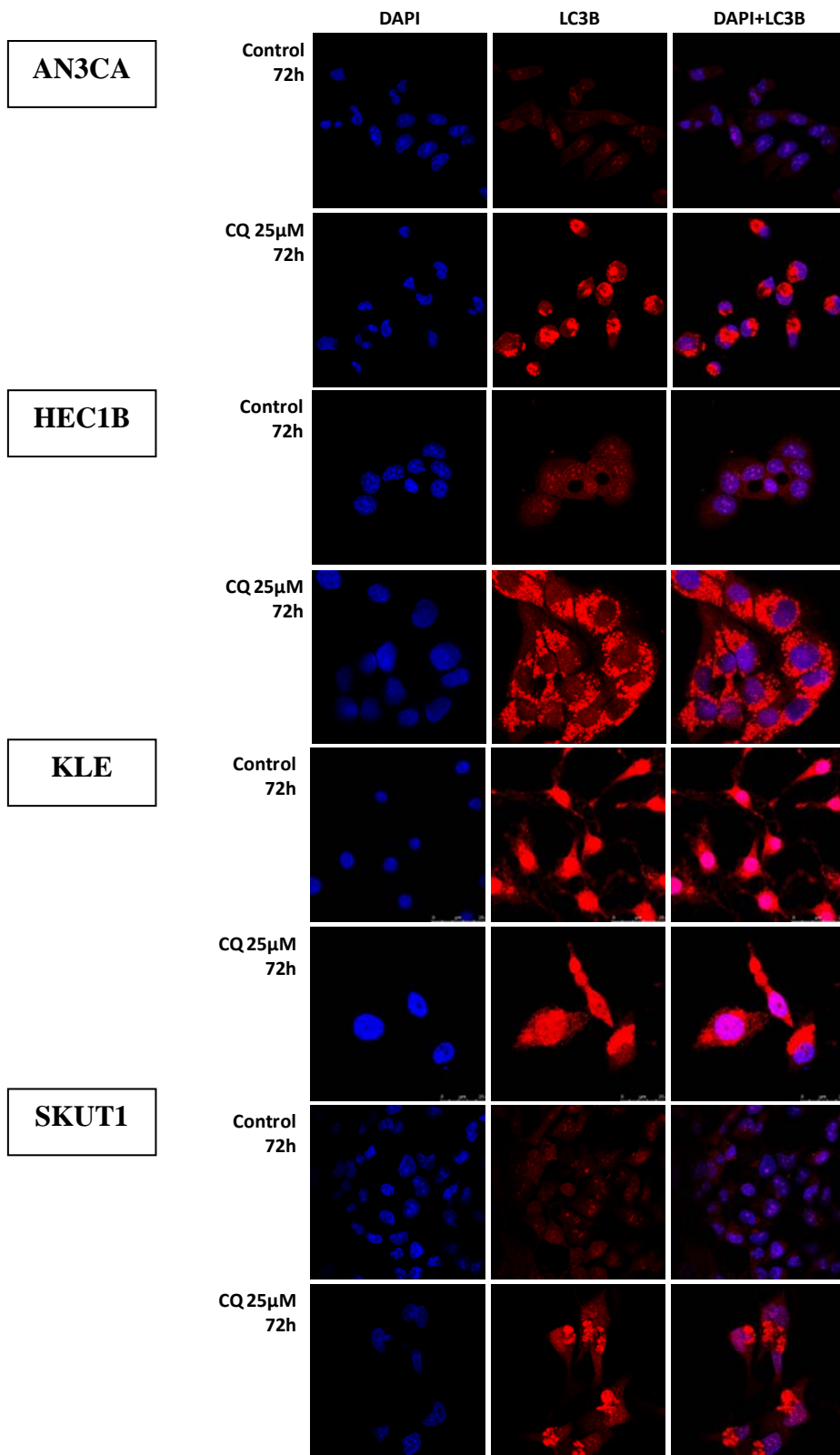


Figura 45. Expresión de LC3B mediante inmunofluorescencia en células tratadas con cloroquina 25µM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); LC3B: rojo].

### 3.3. Estudio del efecto de la metformina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio

Se estudió el efecto de la metformina sobre la proliferación se realizaron ensayos de viabilidad celular (MTT) en las cuatro líneas celulares de carcinoma de endometrio. Para ello, se utilizó metformina a 0.5, 1, 2.5, 5, 6.5 y 8mM desde 24 a 72 horas (Figura 46).

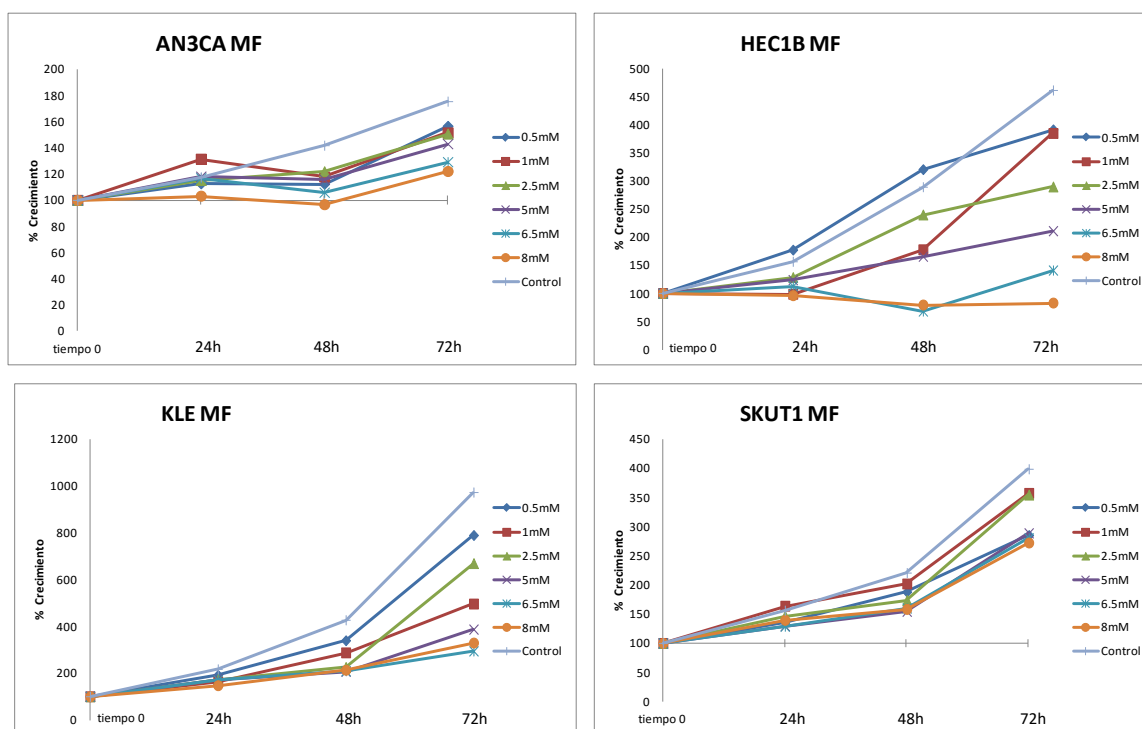
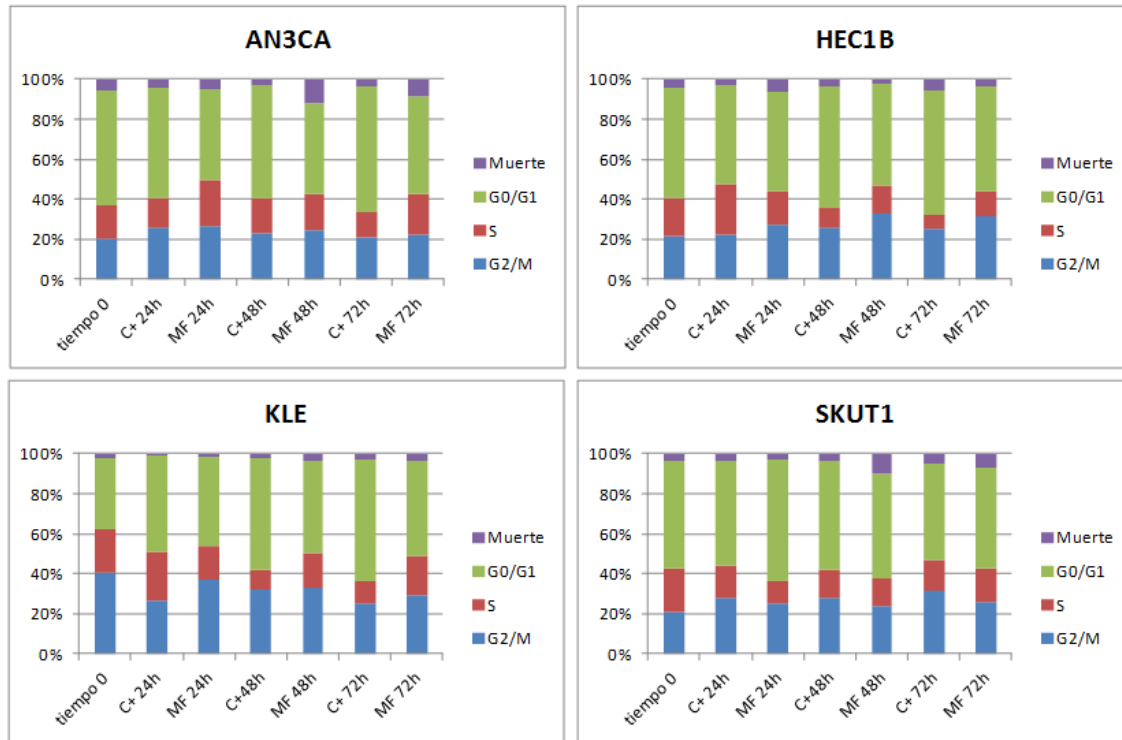


Figura 46. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de CE tratadas con metformina. Se observa una susceptibilidad discreta al compuesto en todas las líneas, con disminución gradual del crecimiento según aumenta la concentración de fármaco. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de dos experimentos independientes.

Los resultados del ensayo de viabilidad mostraron una disminución de la proliferación, pero menor que con el tratamiento con Panobinostat® y cloroquina. En todas las líneas se observa una reducción gradual en el crecimiento según se incrementa la concentración de la droga, presentando la máxima inhibición a 8mM.

El estudio del ciclo celular se realizó con una concentración de metformina de 8mM, ya que los efectos parecían ser mínimos a menores concentraciones. En la Figura 47 se presentan los resultados del análisis del ciclo por citometría de flujo:



**Figura 47.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las cuatro líneas celulares de CE tratadas con metformina 8mM. El efecto del fármaco sobre el ciclo celular es mínimo, las células tratadas presentan porcentajes en cada una de las fases muy similares a las células control sin tratamiento. Únicamente AN3CA y SKUT1 muestran un pequeño aumento en la tasa de mortalidad con respecto a sus controles. [Tiempo 0: corresponde al análisis del ciclo al comienzo del experimento, sin tratamiento.; C+: control sin tratamiento a cada uno de los tiempos analizados]. Los datos representados corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Los resultados mostraron cambios mínimos en cada una de las fases del ciclo comparando las células tratadas con sus controles. En cuanto a la tasa de células muertas y SubG1, únicamente las líneas AN3CA y SKUT1 superaron en porcentaje a los controles. Las células AN3CA mostraron una muerte de alrededor del 10% a las 48 y 72 horas ( $p < 0.05$ ). La línea SKUT1 también presentó mayor muerte a las 48 y 72 horas de tratamiento ( $p < 0.05$ ), aunque no superó el 10% de células.

En este trabajo, hemos analizado la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en respuesta a la incubación con metformina 8mM durante 24, 48 y 72 horas.

La expresión de p62 fue diferente en las distintas líneas celulares de CE tras la exposición al fármaco. Las líneas AN3CA y SKUT1 presentaron un aumento en la expresión de p62, mientras que las otras dos líneas, HEC1B y KLE sufrieron una



disminución de la proteína. En este caso, también se puede apreciar una banda adicional que aparece sobre p62 (Figura 48).

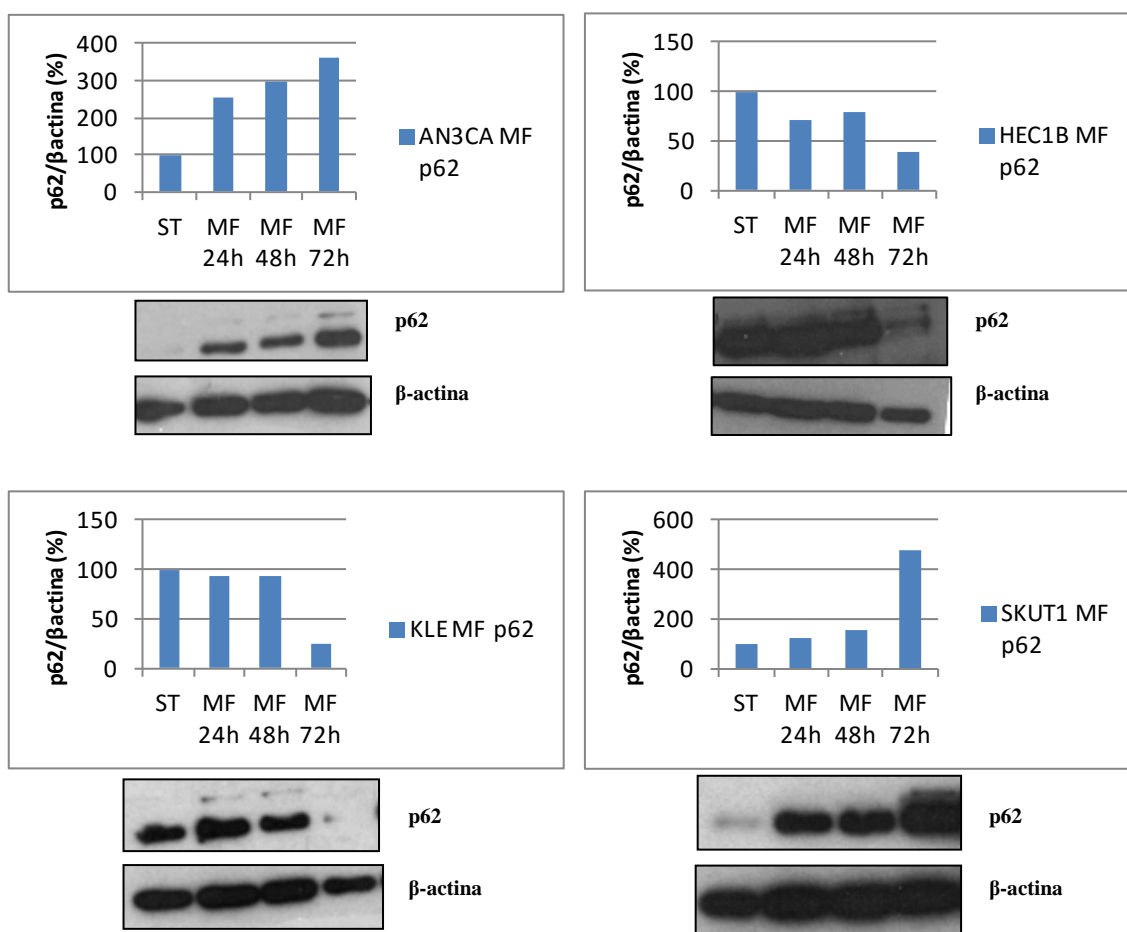


Figura 48. Expresión de la proteína p62 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con metformina 8mM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio p62/β-actina. [ST: células sin tratamiento; β-actina: control de carga].

La expresión de la proteína Beclin1 también fue cuantificada y analizada en las cuatro líneas de CE tratadas con metformina. La expresión de la proteína fue similar en las líneas celulares AN3CA y SKUT1, observándose un incremento en la expresión en ambas. En las otras dos líneas, la expresión de Beclin1 disminuye conforme aumenta el tiempo de exposición a la metformina, aunque en KLE permanece prácticamente invariable (Figura 49).

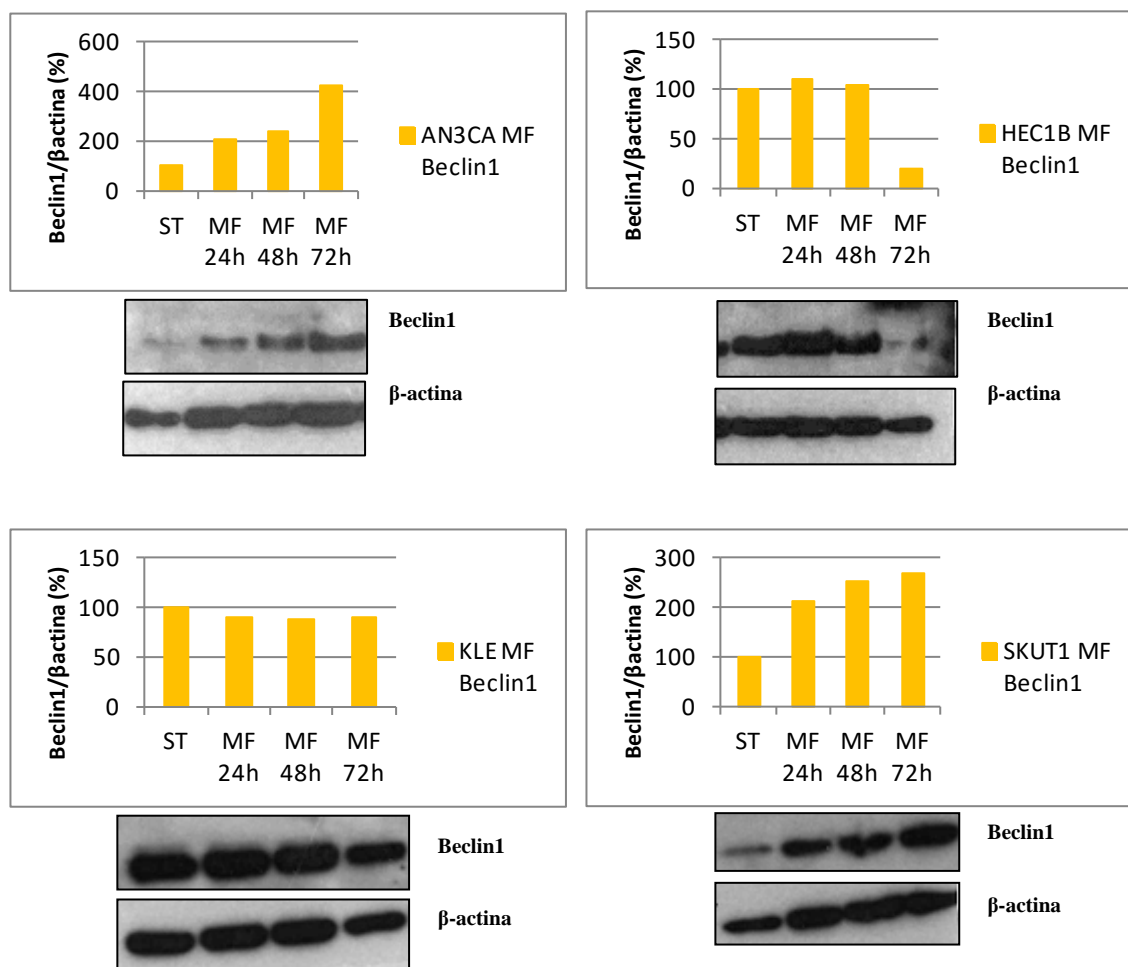


Figura 49. Expresión de la proteína Beclin1 en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con metformina 8mM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio Beclin1/β-actina. [ST: células sin tratamiento; β-actina: control de carga].

La proteína LC3B-II aumentó sus niveles de expresión al aumentar el tiempo de incubación con la droga en las líneas AN3CA, HEC1B y SKUT1. KLE mostró una pequeña disminución en la expresión de la isoforma II de la proteína (Figura 50).

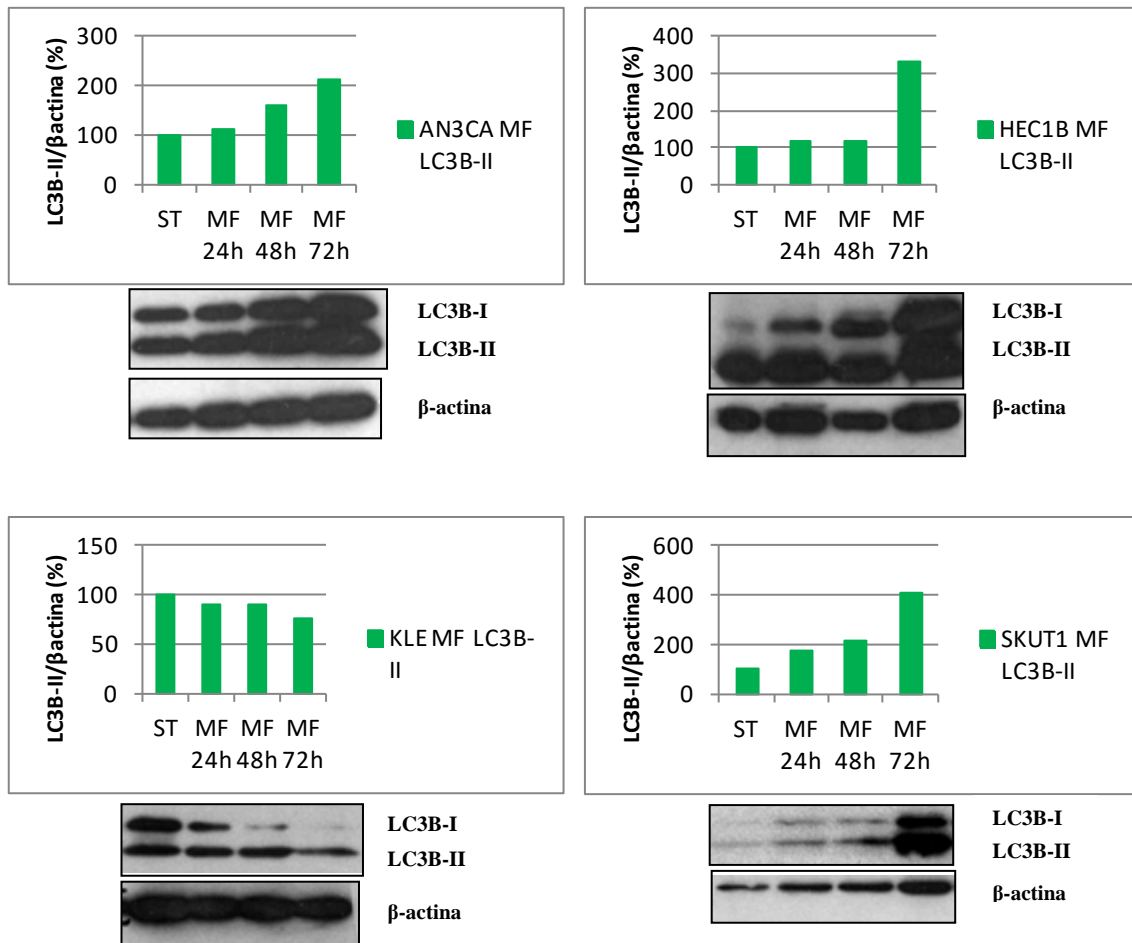


Figura 50. Expresión de la proteína LC3B en líneas celulares tumorales de carcinoma de endometrio bajo el tratamiento con metformina 8mM. Los gráficos muestran la expresión proteica cuantificada en forma de ratio LC3B-II/β-actina. Se representa únicamente la isoforma II puesto que es la más sensible a variaciones en el flujo de autofagia. [ST: células sin tratamiento; β-actina: control de carga].

Al igual que en el caso del tratamiento con LBH589 y con cloroquina, se procedió a observar la expresión y localización de las proteínas p62 y LC3B mediante inmunofluorescencia de células tratadas con metformina 8mM.

La localización de la proteína p62 no pareció variar respecto a los controles correspondientes a cada línea (Figura 51).

En el caso de la proteína LC3B, a diferencia del incremento en forma de acúmulos que se producía tras la incubación con cloroquina, con metformina LC3B aumenta pero se distribuye equitativamente por todo el citoplasma (Figura 52).

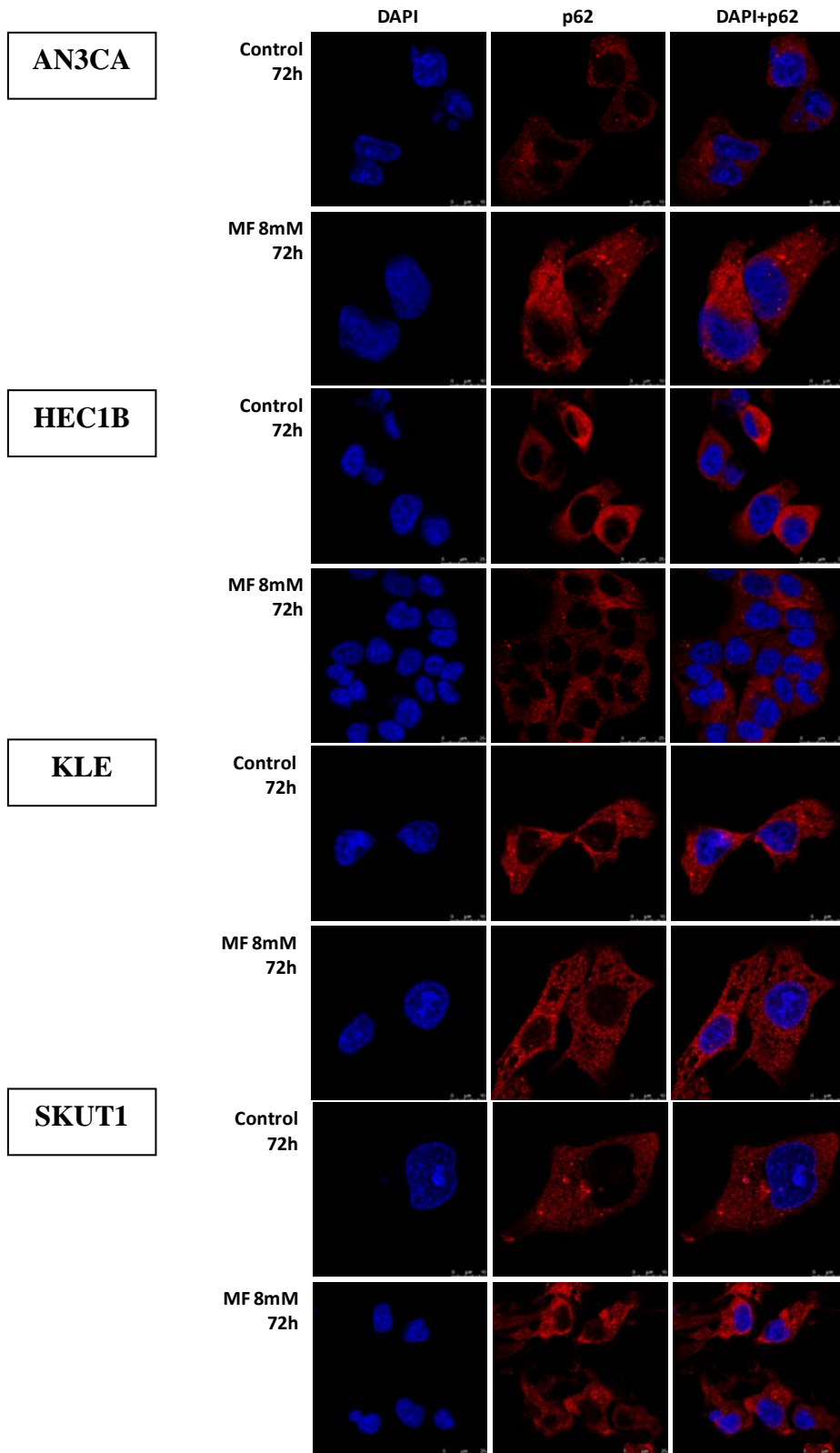


Figura 51. Expresión de p62 mediante inmunofluorescencia en células tratadas con metformina 8mM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); p62: rojo].

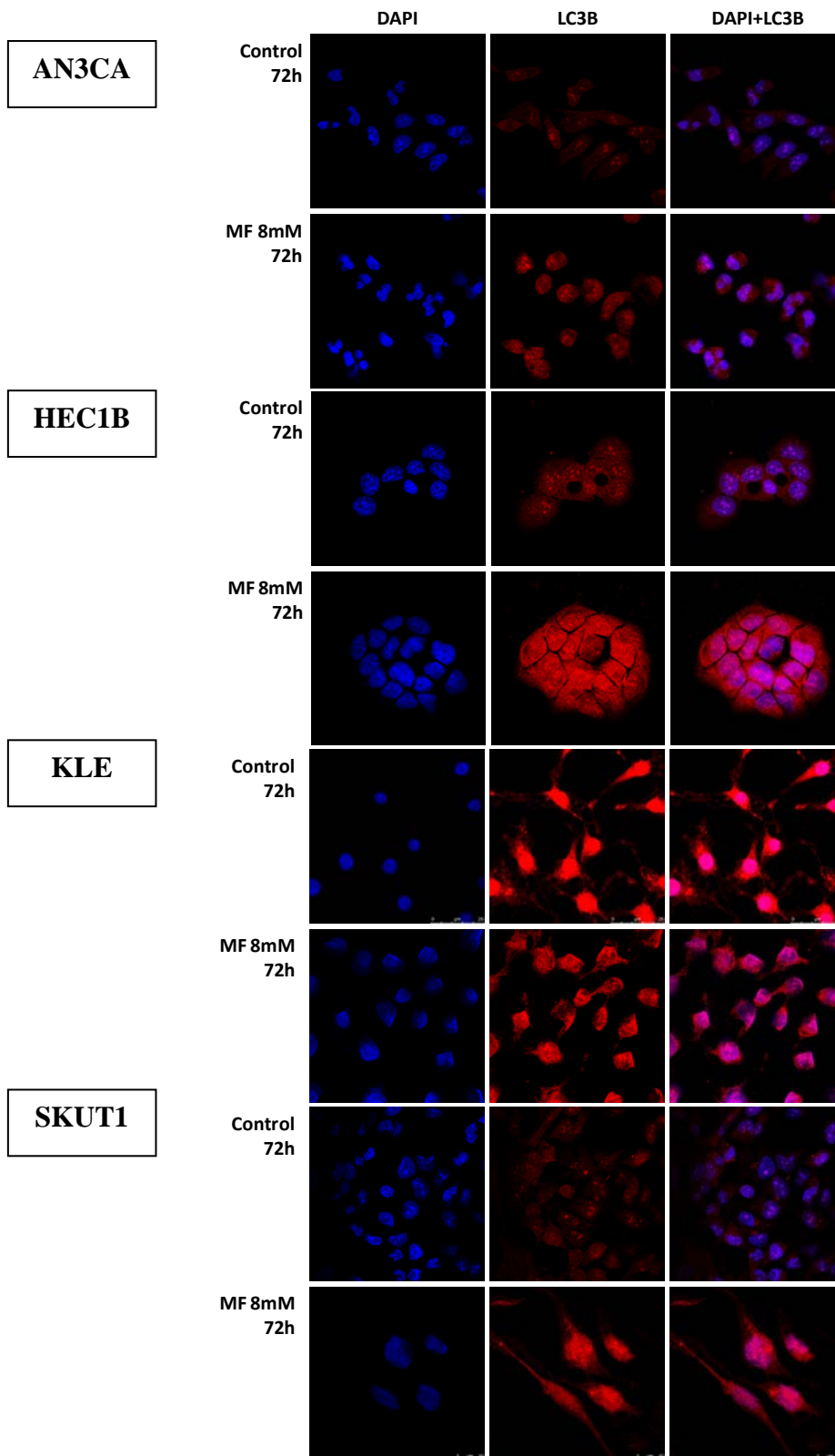


Figura 52. Expresión de LC3B mediante inmunofluorescencia en células tratadas con metformina 8mM durante 72h y en células control sin tratamiento. [DAPI: azul (núcleos); LC3B: rojo].



## **DISCUSIÓN**

---

---





## **1. Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia podrían incrementar el riesgo de desarrollar tumores de endometrio**

La autofagia es un proceso de vital importancia en la célula, es indispensable para la degradación de macromoléculas y orgánulos y su desregulación está implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades. El conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso autofágico comenzó con el descubrimiento de los genes ATGs (Autophagy-related Genes) en levaduras. Estos genes participan en diferentes etapas de la ruta, forman parte de importantes complejos y son clave en la inducción de la autofagia, en la formación del autofagosoma y en la fusión de éste con el lisosoma [56, 57].

En nuestro trabajo hemos seleccionado polimorfismos (SNPs) en cuatro genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de autofagia, ATG10 (rs1864183), ATG5 (rs2245214), ATG16L1 (rs2241880) y ATG2B (rs3759601), para evaluar el posible papel de estas variantes en la susceptibilidad a padecer carcinoma de endometrio (Tabla 8). Tres de los SNPs analizados son mutaciones de cambio de sentido (genes ATG10, ATG16L1 y ATG2B), mientras que el polimorfismo del gen ATG5 es una mutación intrónica. Los genes ATG5, ATG10 y ATG16L1 se seleccionaron por codificar proteínas que forman del complejo de ubiquitinación junto con ATG12 y ATG2B porque codifica una proteína necesaria para completar el cierre de la membrana aislada en el autofagosoma.

La proteína ATG10 es una enzima E2-like que media la unión entre ATG12 y ATG5 para formar el complejo ATG12-ATG5 que, posteriormente, junto con ATG16L1 conformarán un complejo multimérico [78]. Nuestros resultados muestran que poseer el genotipo TT del polimorfismo de ATG10 rs1864183 confiere un mayor

riesgo a padecer carcinoma de endometrio. Este SNP de ATG10 consiste en el cambio de una Treonina por una Metionina en el codón 212, encontrando la variante p.212Met asociada con la enfermedad. . En un estudio llevado a cabo por *Songane et al.* en pacientes con tuberculosis se encontró que existían diferencias significativas entre los genotipos CC y TT del gen ATG10 (rs1864183) y se asociaban con diferentes niveles de IL-8 [126]. La proteína IL-8 es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria y funciona como un activador de la angiogénesis. El proceso angiogénico es clave para que un tumor pueda dotar a sus células de nutrientes y de oxígeno, y su desregulación se relaciona con numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer [127]. Si el genotipo TT (Met/Met) de ATG10 es capaz de alterar la producción de IL-8 y ésta a su vez de activar la angiogénesis, podría ser este el mecanismo por el que aumente la susceptibilidad a que se desarrolle un tumor endometrial.

El polimorfismo de ATG5 rs2245214 ha sido previamente estudiado en enfermedades como la tuberculosis, el lupus eritematoso, la enfermedad ósea de Paget y el cáncer de tiroides no medular [126, 128-130]. Nuestros resultados sugieren que ser portador del genotipo GG se asocia con un carcinoma de endometrio de mayor grado y también a que éste sea de tipo no endometriode. El genotipo GG, o el alelo G, ha sido hasta el momento el relacionado con incremento del riesgo a desarrollar las enfermedades anteriormente mencionadas. Parece por tanto, que este cambio en un nucleótido intrónico se relaciona con enfermedades, aunque el mecanismo no se ha identificado hasta la fecha. El SNP de ATG5 podría estar asociado a otro cambio exónico o con otro gen localizado en la proximidad no incluido en nuestro estudio.

El complejo multiproteico del que forma parte ATG16L1 es indispensable para la correcta lipidación de la proteína LC3 durante la formación del autofagosoma [131]. En nuestro trabajo hemos estudiado el SNP de ATG16L1 rs2241880, observando que el

genotipo AA (Thr/Thr) aumenta el riesgo de que el carcinoma de endometrio sea de tipo no endometriode. Se trata de una mutación de cambio de sentido que produce el cambio Thr300Ala en la proteína ATG16L1. La variante p.300Ala ha sido descrita por varios autores como un alelo de riesgo a padecer, entre otras, la enfermedad de Crohn [132, 133]. Sin embargo, otros autores sostienen que los heterocigotos GA y los homocigotos GG tienen menor riesgo a padecer cáncer gástrico y encuentran que ser portador del alelo G (Ala) protege frente al cáncer gástrico [134]. Además, *Grimm et al.* mantienen que los portadores del genotipo Ala/Ala presentan una mayor supervivencia y menor potencial metastásico de cáncer colorrectal debido al papel que un aumento del Interferón tipo I inducible, producido en estos pacientes, podría tener sobre la progresión de la enfermedad [135]. En nuestro estudio, aunque el genotipo Ala/Ala no se asocia con un menor riesgo a desarrollar la enfermedad o un fenotipo más agresivo, ser portador del genotipo Thr/Thr se asocia con un CE de características más agresivas, como es el carcinoma de endometrio de tipo II (no endometriode). El mecanismo por el que el polimorfismo en ATG16L1 puede relacionarse con enfermedades como el cáncer no está claro y existen estudios contradictorios, por lo que son necesarios análisis más exhaustivos y en nuestro caso, ampliar la muestra con un mayor número de pacientes, preferiblemente con CE de alto grado y de tipo no endometriode.

La proteína ATG2B es necesaria en la formación de los autofagosomas y en la regulación de la morfología y dispersión de las “gotas” lipídicas [136]. En nuestra serie de pacientes se analizó la variante de ATG2B rs3759601, pero no se encontraron diferencias significativas entre mujeres con carcinoma de endometrio frente a las mujeres sanas ni entre grados o tipos de tumor, por lo que pensamos que este SNP en ATG2B no incrementa la susceptibilidad a desarrollar CE.

Nuestros resultados sugieren por primera vez que algunas variantes polimórficas en genes ATG se relacionan con el CE, ya que ser portador del genotipo TT del gen ATG10 (rs1864183) aumenta la susceptibilidad a padecer la enfermedad, el genotipo GG del gen ATG5 (rs2245214) incrementa el riesgo de que el CE sea de mayor grado y de tipo II (no endometriode) y el genotipo TT del gen ATG16L1 (rs2241880) confiere mayor riesgo de que el CE sea de tipo no endometriode (generalmente más agresivo).

## **2. La expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia está alterada en pacientes con carcinoma de endometrio**

Es conocido que la autofagia está alterada en muchos tumores y que puede desempeñar un importante papel como mecanismo supresor tumoral. Este rol como supresor tumoral se basa principalmente en que, en algunos tumores, una autofagia deficiente se asociada con progresión tumoral [109, 110]. Sin embargo, paradójicamente, la autofagia también podría ayudar a sustentar a un tumor en determinadas condiciones, ya que esta ruta puede funcionar suministrando nutrientes a células en condiciones hipóxicas antes de que se produzca la angiogénesis [137], permitiendo que el tumor satisfaga su demanda energética y se establezca.

Aunque la autofagia ha sido estudiada ampliamente en numerosos tipos de cáncer, la expresión de proteínas implicadas directamente en esta ruta y en otras rutas relacionadas no se ha estudiado a fondo en el caso del carcinoma de endometrio. Nuestro estudio abarca un amplio análisis de expresión de proteínas en pacientes con esta enfermedad y podría servir para conocer mejor las posibles implicaciones de esta vía en la patogénesis del cáncer endometrial.

## 2.1. p62

La proteína p62 es la principal molécula receptora que interviene en el reconocimiento del material que se degrada en la autofagia selectiva [100]. Debido a que p62 desempeña múltiples funciones y actúa en diferentes rutas metabólicas, alteraciones genéticas o expresión aberrante de esta proteína se han relacionado con diferentes enfermedades. Por ejemplo, se ha detectado la acumulación de agregados de p62 en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, cáncer y desórdenes hepáticos [138]. Además, se ha identificado a p62 como una diana patogénica en los casos con amplificación de la región 5q en cáncer de riñón [139]. También se han encontrado alteraciones genéticas en p62 en pacientes con enfermedad ósea de Paget, demencia frontotemporal y esclerosis lateral amiotrófica [140].

La detección de una expresión aumentada de p62 se relaciona con la acumulación de agregados proteicos de p62, lo que significa que en el tejido se está produciendo una autofagia defectiva o aberrante. En nuestro trabajo, analizamos la expresión de p62 en muestras de tejido tumoral de pacientes con CE, encontrando que el 75% presentaban expresión disminuida o nula de la proteína y un 25% una expresión aumentada (Tabla 14). Sin embargo, al comparar la expresión de p62 en los tumores de bajo y alto grado se encontró que los tumores de alto grado presentan mayor expresión de esta proteína, por lo que hemos encontrado relación entre la expresión o sobreexpresión de p62 y un mayor riesgo a padecer un CE más agresivo. Muy recientemente, *Iwadate et al.* han demostrado que una alta expresión de p62 se asocia a un fenotipo más agresivo de CE, es decir, tumores de alto grado, con invasión miometrial y vascular y, además, con un peor pronóstico [141]. Nuestros resultados apoyan el hecho de que p62 se acumule en tumores agresivos debido a una autofagia

aberrante y sugiere que p62 podría servir como un biomarcador pronóstico en tumores endometriales.

## 2.2. LC3B

La proteína LC3B forma parte de uno de los sistemas de ubiquitinación y su lipidación es esencial en el proceso de formación de los autofagosomas [81]. LC3B conecta la maquinaria autofágica de degradación con material ubiquitinado a través de su unión con p62 y de éste con mono- o poliubiquitinas (a través del dominio UBA) [101]. LC3B se ha identificado como el marcador más específico y preciso de la autofagia [142, 143].

Nuestros resultados muestran que la proteína LC3B se expresa en la mayoría de las muestras de tumores de endometrio analizadas (Tabla 15, Figura 18). De acuerdo con los estudios realizados por diferentes laboratorios, la relación de la expresión de LC3B con las características clínicas o con la supervivencia varía dependiendo del tumor. En carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, la expresión aumentada de LC3B está relacionada con menor supervivencia y en carcinoma cutáneo de células escamosas, con mayor estadio y mayor diámetro del tumor [144, 145]. Asimismo, en carcinoma papilar de tiroides es más alta la expresión de LC3B comparado con tejido normal y lo mismo ocurre en cáncer colorrectal, donde además, la alta expresión también se relaciona con una menor diferenciación del tumor [146, 147]. Al contrario que en los tumores anteriormente descritos, en carcinoma de cérvix y de ovario, se ha encontrado menor expresión de LC3B en las células tumorales que en el tejido adyacente [148, 149]. Por último, en el carcinoma esofágico la baja expresión de la proteína se asocia con un mayor grado de invasión del tumor, mayor metástasis, menor supervivencia y, además, en este caso, la progresión del tumor estaría facilitada por la

angiogénesis (al observarse un incremento de la expresión de VEGF-A en estas células) [150].

Los estudios realizados hasta el momento sobre la expresión de LC3B en diferentes tipos tumorales ponen de manifiesto que la expresión de la proteína varía en cada tipo de tumor (Tabla 28).

**Tabla 28. Relación de la expresión de LC3B con mal pronóstico de la enfermedad en distintos tipos de tumores.**

EXPRESIÓN DE LC3B	Peor pronóstico, mayor agresividad o menor supervivencia
Expresión Baja	-Carcinoma de cérvix -Carcinoma de ovario -Carcinoma de esófago
Expresión Alta	-Carcinoma de células escamosas de la cavidad oral -Carcinoma papilar de tiroides -Cáncer colorrectal -Carcinoma cutáneo de células escamosas

En carcinoma de endometrio no se han realizado estudios de expresión de LC3B hasta el momento, pero sí con LC3A (proteína de la misma familia y también relacionada con la autofagia). *Sivridis et al.* encontraron que en tejido tumoral de endometrio había considerablemente más SLS (“Stone-like” structures, estructuras que contienen LC3A y se asocian con una autofagia excesiva) que en tejido sano o hiperplásico. Además, la presencia de estas estructuras también se ha asociado con una mayor invasión miometrial y una menor supervivencia a los 5 años [151]. Esta característica que diferencia el tejido tumoral del tejido sano o con hiperplasia podría ser un factor diagnóstico efectivo en este tipo de cáncer. Aunque no existan trabajos que relacionen directamente la expresión de LC3B con pronósticos más graves, debido a que LC3B y LC3A son proteínas de la misma familia y ambas relacionadas con la autofagia, podemos sugerir que LC3B también podría servir como marcador, aunque son necesarios más estudios para establecer una relación clara entre la expresión de esta proteína y el carcinoma de endometrio.

### 2.3. p62 y LC3B. Estado de la autofagia

El análisis de la expresión conjunta de estas proteínas es la forma más fiable de establecer el estado del proceso autofágico, LC3B es un marcador de autofagosomas, ya que su forma lipídica (LC3-II) se encuentra en sus membranas, y p62 es un marcador del flujo autofágico que sirve de puente entre LC3B y sustratos ubiquitinados y es degradada por el fagosoma disminuyendo su cantidad [152].

El análisis conjunto de la expresión de p62 y LCB en nuestra serie de tumores de endometrio (Tabla 22) mostró que casi un tercio de todos los tumores presentan autofagia basal, siendo similar para ambos grados tumorales. Un 50% de los tumores endometriales analizados presentan activación de la ruta y un 21.7% muestran una autofagia aberrante; sin embargo, esto difiere al comparar los tumores de bajo y alto grado. Los tumores de menor grado presentan, en su mayoría (56.1%), una autofagia activada, frente al 36.8% de los tumores de alto grado. Por el contrario, el 31.6% de los tumores de alto grado presentan un proceso autofágico aberrante, ya sea basal o activado, mientras que solo un 17.1% de los tumores de bajo grado presenta una interrupción de la ruta. Nuestros resultados concuerdan con los descritos por otros grupos en cáncer endometrial, que encuentran de manera frecuente una activación de la autofagia, a diferencia de lo encontrado en otros tumores ginecológicos, como el cáncer de cérvix, en el que es frecuente una autofagia inhibida [153]. Por otro lado, aunque no hemos podido encontrar significación estadística, probablemente debido al reducido tamaño muestral, las diferencias observadas entre los tumores de bajo y alto grado sugieren la existencia de defectos en la autofagia en los tumores de mayor grado y más agresivos. Se sabe que, la autofagia es capaz de reducir la inestabilidad genómica de las células tumorales; sin embargo, en células con una autofagia defectiva, dicha inestabilidad promueve la adquisición de mutaciones secundarias necesarias para el



crecimiento y la diseminación de las células [154]. El grupo de *Mathew et al.* utilizó un modelo de autofagia defectiva en cáncer de mama y observaron que en estas células se producía un incremento en los niveles de p62 intracelulares (que no se degradaba), y esto contribuía a un aumento del estrés oxidativo producido por ROS y como consecuencia a una activación de la ruta NFκB, eventos implicados en la transformación tumoral [155]. En nuestro trabajo, hemos encontrado una autofagia defectiva en los tumores de CE de alto grado, que podría estar implicado en la capacidad de metastatizar y ser más agresivos, siendo necesarios otros estudios para confirmar esta hipótesis.

Si esta hipótesis fuese correcta, el uso de moduladores de la autofagia podría plantearse como una terapia prometedora dependiendo de la fase en que se encuentre la enfermedad.

## **2.4. Beclin1**

Beclin1, es el ortólogo en mamíferos de Atg6 de levaduras [156]. Beclin1 es una proteína clave en la formación del complejo PI3K de clase III, uno de los primeros componentes reclutados por el autofagosoma en desarrollo, y es esencial para la autofagia. Dependiendo de las proteínas con las que forma complejos Beclin1 es capaz de regular la autofagia de forma positiva o negativa [59, 74]. Debido a que es esencial en el inicio de la formación del autofagosoma, muchos estudios han centrado sus análisis en Beclin1. Tanto la sobreexpresión de esta proteína, como su expresión disminuida, se han relacionado con diferentes pronósticos en varios tipos de cáncer.

*Ding et al.* encontraron que la pérdida de Beclin1 en células tumorales era el principal patrón de expresión en carcinomas hepatocelulares y se relacionaba con formas recurrentes de la enfermedad [157]. En tumores cerebrales de alto grado también se encontró expresión disminuida de Beclin1 y niveles elevados de esta proteína se

relacionaron con mejor pronóstico [158, 159]. En contraposición a estos estudios, *Koukourakis et al.* asociaron la sobreexpresión de Beclin1 en cáncer colorrectal con marcadores histológicos de agresividad tumoral como afectación nodal, alto grado histológico e invasión vascular [160].

En nuestro trabajo, el 60% de las muestras de carcinoma de endometrio estudiadas presentaron expresión o sobreexpresión de Beclin1, expresándose más en los tumores de alto grado (Tabla 16). Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo en el que se encontró una asociación entre altos niveles de expresión de Beclin1 con tumores endometriales más agresivos y, además, de peor pronóstico, y con invasión miometrial [161], aunque en nuestro caso, no podemos establecer relación con parámetros clínicos.

Hasta el momento no se ha encontrado una relación homogénea en la expresión de Beclin1 en los diferentes tipos tumorales, ya que existe una relación variable entre la expresión de esta proteína y el pronóstico de la enfermedad dependiendo del tipo tumoral (Tabla 29) y por tanto el valor pronóstico de esta proteína será diferente para cada tipo tumoral.

**Tabla 29. Relación de la expresión de Beclin1 con mal pronóstico de la enfermedad en distintos tipos de tumores.**

EXPRESIÓN DE BECLIN1	Peor pronóstico, mayor agresividad o menor supervivencia
Expresión Baja	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cáncer de mama[162]</li> <li>-Cáncer de ovario[163]</li> <li>-Carcinoma colangiocelular intrahepático[164]</li> <li>-Carcinoma esofágico de células escamosas[165]</li> <li>-Cáncer de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma[166]</li> <li>-Carcinoma hepatocelular[157]</li> <li>-Carcinoma de células escamosas de laringe e hipofaringe[167, 168]</li> <li>-Varios tipos de linfomas[169-171]</li> <li>-Cáncer gástrico[172]</li> <li>-Carcinoma duodenal[173]</li> <li>-Carcinoma de cérvix [174]</li> </ul>
Expresión Alta	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Carcinoma de endometrio[161]</li> <li>-Cáncer colorrectal[175]</li> <li>-Carcinoma de células escamosas de la cavidad oral[176]</li> <li>-Carcinoma de nasofaringe[177]</li> </ul>

El comportamiento de los tumores de endometrio en relación con la expresión de Beclin1 difiere de otros tumores ginecológicos, como el cáncer de ovario y el de cérvix, en los que la expresión disminuida de esta proteína se relaciona con pronósticos menos favorables, estadios más avanzados en el cáncer de ovario y menor supervivencia en el carcinoma de cérvix [174, 178]. Aunque en carcinoma endometrial, los patrones de expresión de proteínas relacionadas con la autofagia difieren de otros tumores ginecológicos, son similares a tumores como el de colon y recto y el de células escamosas de la cavidad oral. Por ello, a la hora de establecer un tratamiento diana basado en el estado de la autofagia, el carcinoma de endometrio podría incluirse en este pequeño grupo de tumores y no, como cabría pensar, con otros tumores ginecológicos.

## 2.5. PIK3CA

Una de las vías de señalización más importante implicada en la carcinogénesis de tumores ginecológicos es la vía PI3K/AKT/mTOR. Translocaciones, mutaciones y amplificaciones de los componentes de esta vía resultan en una activación aberrante de la misma [179-181].

La activación de miembros de la ruta PI3K/AKT/mTOR, como PIK3CA, producen una activación constitutiva de efectores como mTOR, conocido inhibidor de la autofagia; sin embargo, existen moléculas que antagonizan la acción de PIK3CA, como el gen supresor PTEN, que puede ser considerado un activador de la autofagia. En nuestro trabajo hemos analizado la expresión tanto de PIK3CA, como de mTOR en 60 tumores de endometrio.

La expresión de PIK3CA está disminuida en la mayoría de los tumores de endometrio incluidos en nuestra serie (75%), independientemente del grado del tumor (Tabla 17). Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros grupos si

consideramos que el 53.3% de los tumores la expresan de forma moderada, es decir, más del 40% de expresión respecto al control (Figura 22). Por ejemplo, en muestras de cáncer gástrico estudiadas por *Liang et al.* se encontraron altos niveles de la proteína PIK3CA en el 44.86% de los casos y además, se relacionó con un peor pronóstico [182]. También en tumores gástricos, se ha observado una mayor expresión de PIK3CA en el tejido tumoral que en el adyacente, y la expresión de la proteína se encontró más incrementada en muestras de metástasis en los nódulos linfáticos [183]. En otro estudio se encontró que en carcinoma de nasofaringe existe una sobreexpresión de la proteína PIK3CA detectada mediante inmunohistoquímica en el 44.6% de los tumores [184]. Es necesario mencionar, que en la mayoría de trabajos, la expresión de PIK3CA en muestras tumorales se estudia mediante inmunohistoquímica, por lo que los resultados podrían diferir de los encontrados mediante western blot.

### **2.5.1. No existe correlación entre el estado de la autofagia, la expresión de PIK3CA y mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN**

PIK3CA y PTEN tienen efectos contrarios sobre la autofagia, siendo el primero un inhibidor y el segundo un activador (Figura 53). Debido a este papel antagónico sobre la autofagia y a que en tumores endometriales son muy comunes las mutaciones en estos dos genes y la coexistencia de mutaciones en ambos [31, 185, 186], hemos intentado correlacionar la presencia de mutaciones en ambos genes con el estado de la autofagia en tumores de endometrio (Tabla 23).

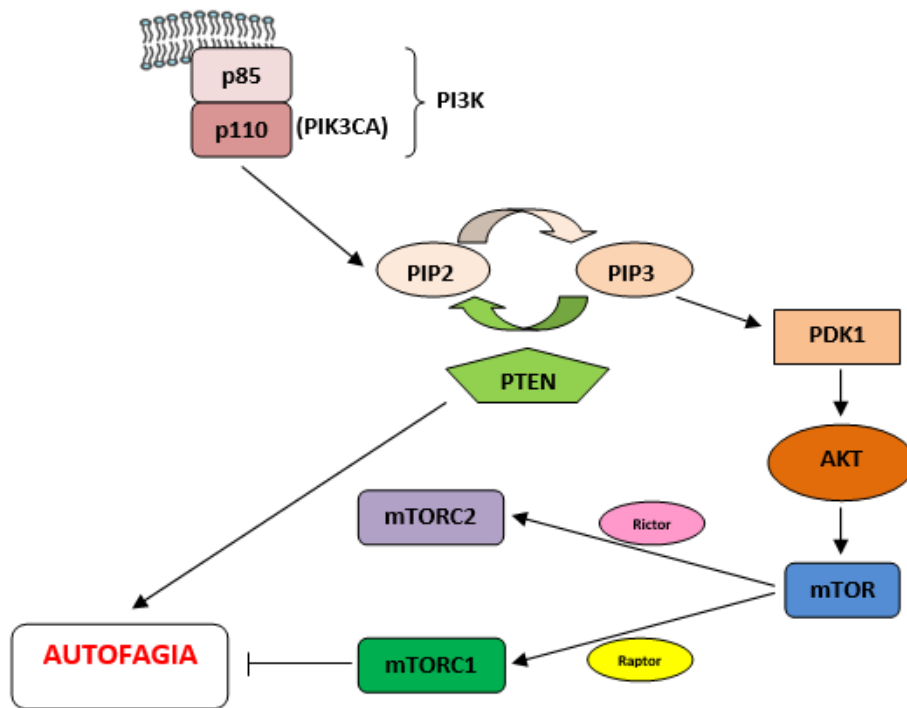


Figura 53. Resumen de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR. La subunidad catalítica del complejo PI3K de clase I, p110 (PIK3CA), transforma PIP2 en PIP3 e inicia la cascada de señalización que en última instancia activará al efector “aguas abajo”, mTOR. El complejo mTORC1 cuando se encuentra activado inhibe la ruta de autofagia. PTEN revierte la función de PIK3CA, es decir, convierte PIP3 en PIP2 a través de su función fosfatasa, por lo que impide la activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR y es por tanto, un activador de la autofagia.

Las mutaciones en el oncogén PIK3CA son activadoras. De los tumores analizados, 10 (16.6%) presentaron mutaciones en el gen PIK3CA; sin embargo, solo 3 presentaban niveles elevados de la proteína por western blot mientras que en los 7 restantes la expresión estaba disminuida en relación con la línea celular empleada como control en nuestro trabajo. El mecanismo por el que la proteína presenta una expresión variable podría ser debido a regulación epigenética que no hemos incluido en nuestro análisis o a variaciones en los niveles de expresión de los factores de transcripción que regulan la expresión de este gen.

En nuestra cohorte (n=60), 26 tumores presentaron mutaciones en el gen PTEN, de los que 6 presentaron coexistencia con mutaciones en el gen PIK3CA. Por otro lado, 30 de los tumores analizados no mostraron mutaciones en ninguno de los dos genes.

Estos resultados y el estado de la autofagia encontrado, nos permiten agrupar los tumores en:

1. Tumores con mutaciones en el gen PIK3CA y con el gen PTEN germinal (Tabla 24): La proteína PIK3CA activa la ruta PI3K/AKT/mTOR que inhibe la autofagia. Sin embargo, la proteína PTEN podría revertir la conversión de PIP2 en PIP3 compensando la activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR y, por consiguiente, facilitando la activación de la autofagia. Los cuatro tumores incluidos en este grupo presentan niveles variables de actividad autofágica, por lo que podemos deducir que las mutaciones activadoras en el gen PIK3CA no se relacionan siempre con una mayor inhibición de la autofagia. Nuestra observación de una expresión variable de la proteína en tumores con mutación en PIK3CA podría explicar esta falta de correlación.
2. Tumores con el gen PIK3CA germinal y con mutaciones en el gen PTEN (Tabla 25): en estos casos PIK3CA desempeña su función con normalidad pero PTEN no podría revertir la conversión de PIP2 en PIP3 realizada por PIK3CA y la autofagia podría inhibirse si la vía PI3K/AKT/mTOR se activa mediante los estímulos necesarios. En nuestro trabajo hemos encontrado 20 tumores con PIK3CA germinal y PTEN mutado; sin embargo, la mayoría de las muestras presentan una autofagia activada, por lo que, en estos tumores, la pérdida de función de PTEN no se asocia con una inhibición de la autofagia probablemente debido a la existencia de otras vías de activación redundantes o por otros mecanismos compensadores de la inhibición secundaria a la pérdida de función de PTEN.
3. Tumores en los que coexisten mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN (Tabla 26): Al igual que en el caso anterior, la sobreexpresión de PIK3CA podría

inhibir la autofagia y este efecto no sería antagonizado por la acción de PTEN. De los 6 tumores incluidos en nuestro trabajo con estas características, 3 presentan una autofagia basal y otros 3 activada, por lo que podemos deducir que la coexistencia de una proteína PIK3CA sobreexpresada y la ausencia de la proteína PTEN no provoca una mayor inhibición de la autofagia.

4. Finalmente, hemos encontrado 30 tumores que presentan PIK3CA y PTEN germinales (Tabla 27): En estos tumores no encontramos un patrón uniforme de actividad autofágica, lo que sugiere que la inducción de esta vía podría depender de estímulos exógenos que reciben las células tumorales, existiendo un balance en la activación/inhibición de la ruta PI3K/AKT/mTOR que se inclina hacia uno u otro lado según la naturaleza de dichos estímulos.

## 2.6. mTOR

mTOR es una Serina/Treonina kinasa clave en la regulación de importantes funciones celulares, tales como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia, la motilidad celular y la angiogénesis [187-190] actuando como sensor de nutrientes y regulando la inducción de autofagia a través de la kinasa ULK1 mediante la formación del complejo mTORC1 [64, 65].

De las 60 muestras tumorales de carcinoma de endometrio en las que hemos estudiado la proteína mTOR, el 15% mostró expresión de la proteína y el 85% presentó una expresión muy disminuida e incluso nula (Tabla 18). La expresión de mTOR (o de su forma activada, fosfo-mTOR) se ha encontrado incrementada respecto al tejido sano adyacente en tumores como el colangiocarcinoma extrahepático y en tumor primario de hígado [191, 192] y también en cáncer de próstata [193], en cáncer colorrectal [147,

194], en carcinoma cervical de células escamosas [195] y en cáncer de cabeza y cuello [196], entre otros.

En carcinoma de endometrio, *Kourea et al.* encontró una sobreexpresión de la forma activada de mTOR en tejido endometrial no neoplásico, mientras que en tejido tumoral la expresión estaba disminuida [197]. Otro estudio, observó que la expresión de mTOR estaba disminuida en los tumores endometriales cuando estos presentaban ya una invasión miometrial profunda y que una mayor expresión de la proteína se correlacionaba con una mayor supervivencia libre de enfermedad [198]. Por último, en el estudio realizado por *No JH et al.* en 141 muestras de pacientes con CE, solo un 7.1% de los tumores presentaron sobreexpresión de mTOR, y la alta expresión se relacionó con una mayor edad y un estado postmenopáusico [199]. Nuestros resultados se asemejan a los encontrados por otros grupos en cuanto a la baja expresión en la mayoría de tumores endometriales y al pequeño porcentaje que presenta mayor expresión de mTOR, aunque en nuestro trabajo hemos analizado la expresión de la proteína por western blot y no por inmunohistoquímica, por lo que los resultados pueden ser ligeramente diferentes.

Por primera vez hemos identificado en carcinoma de endometrio un fragmento adicional de aproximadamente 80kDa (Figuras 25 y 26) que se detecta con el anticuerpo utilizado para el análisis de expresión de mTOR (Cell Signaling #2972). Este fragmento se detecta en la gran mayoría de los pacientes de CE estudiados (52 de 60) y se presenta de forma muy notable en casi dos tercios de los tumores que lo expresan.

Hasta el momento no se ha descrito otra isoforma de mTOR que se exprese de manera específica en tumores, aunque *Panasyuc et al.* identificaron en 2009 una isoforma de mTOR de unos 80kDa, a la que denominan mTORbeta, que se expresaba



en algunas líneas celulares y en algunos tejidos sanos [200]; de los siete posibles transcritos alternativos del gen mTOR, tres de ellos codifican proteínas (Tabla 30):

**Tabla 30. Transcritos del gen mTOR humano.**

Nombre	ID del Transcrito	pb	Proteína
<b>mTOR-001</b>	ENST00000361445	8677	2549aa
<b>mTOR-002</b>	ENST00000376838	4017	754aa
<b>mTOR-005</b>	ENST00000455339	694	161aa
<b>mTOR-003</b>	ENST00000495435	2356	No
<b>mTOR-006</b>	ENST00000490931	1111	No
<b>mTOR-007</b>	ENST00000473471	862	No
<b>mTOR-004</b>	ENST00000476768	610	No

Tomado de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

La forma canónica de mTOR es la 001, el cDNA de esta isoforma consta de 8677 pares de bases y codifica una proteína de 2549 aminoácidos. De los tres transcritos que codifican proteínas, el 002 se traduce en una proteína de 754 aminoácidos, que en un gel de poliacrilamida podría situarse en torno a los 80kDa. Dado que el fragmento detectado en nuestros estudios de western blot tiene alrededor de 80kDa, pensamos que estamos detectando esta isoforma.

El anticuerpo utilizado en nuestro laboratorio reconoce el residuo Ser2481 de la proteína, que está presente tanto en mTOR-001 como en mTOR-002. La isoforma 002 conserva únicamente los últimos 4017 nucleótidos del extremo C-terminal, que corresponden a los 754 últimos aminoácidos de la proteína. Tal y como se aprecia en la Figura 54, la isoforma 002 ha perdido por completo el dominio HEAT y gran parte del dominio FAT, concretamente hasta el aminoácido 1796, que corresponde a un residuo de Metionina (ATG) que actúa como codón iniciador de esta segunda isoforma de mTOR.

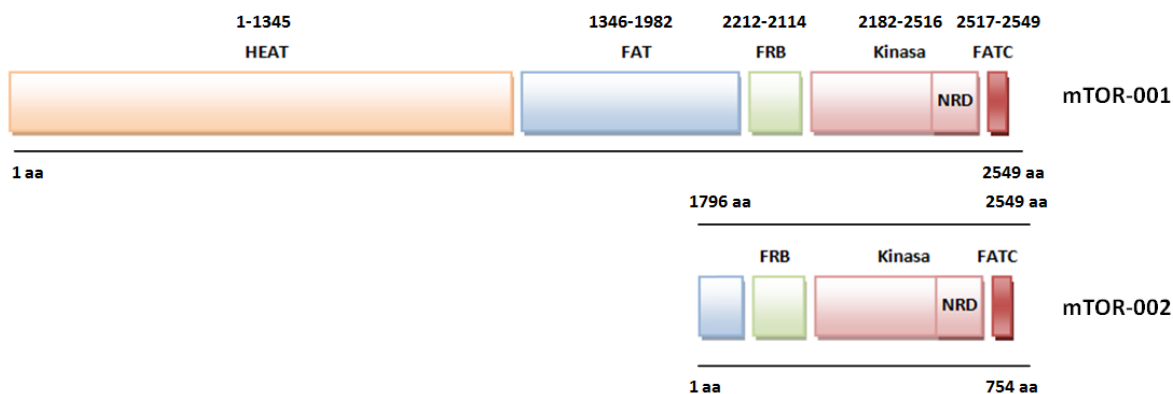


Figura 54. Dominios de las isoformas 001 (canónica) y 002 de mTOR. Dominio de repeticiones HEAT (Huntingtin, Elongation Factor 3, A subunit of PP2A, TOR1); Dominio FAT (FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein)/TOR), ATM, (ataxia-telangiectasia), TRRAP (transactivation/transformation domain-associated protein); Dominio FRB (FKBP12-rapamycin binding); Dominio catalítico kinasa, que contiene una región NRD (negative regulatory domain); y Dominio FATC (FAT C-terminal).

La región N-terminal de la isoforma 001 mTOR, al igual que otras proteínas kinasa, está compuesta por numerosos motivos repetitivos en forma de  $\alpha$ -hélice que normalmente forman plataformas para la interacción proteína-proteína [201, 202]. El análisis detallado de la secuencia de mTOR en esta región ha demostrado que contiene numerosas repeticiones HEAT (hasta 32 repeticiones) y repeticiones TPR (tetratricopeptide repeats) que conforman su dominio FAT [203].

Se sabe que la proteína mTOR puede localizarse en la membrana plasmática y en las membranas externas del retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, la mitocondria, y los lisosomas, así como en el núcleo asociada a los ribosomas y que, dependiendo de esta localización, la señalización de mTOR podría ser diferente[204]. Se ha demostrado que mTOR es capaz de situarse en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi a través de secuencias de localización que se encuentran en sus dominios HEAT (región C-terminal del mismo, aminoácidos del 931 al 1039) y FAT (región N-terminal, aminoácidos 1362 a 1443) [205, 206]. En la isoforma 002 de mTOR esta región no está presente, por lo que perdería su capacidad de localización en estos dos orgánulos.

La ausencia del dominio HEAT en mTOR-002 supone la pérdida de diferentes funciones de la proteína, tales como:

- La capacidad de unión con Raptor, indispensable para la formación del complejo mTORC1, ya que Raptor se une a la región N-terminal de este dominio [207].
- La capacidad de mTOR para fosforilar a otras proteínas, ya que el residuo Ser1231 al ser fosforilado promueve la posterior fosforilación de proteínas como S6K y 4E-BP1 [207]; además, también se ha demostrado que la pérdida de la repetición 19 del dominio inhibe la capacidad de mTOR para promover la fosforilación de S6K [206].
- La interacción con proteínas como Tel2 (Telomere Maintenance 2) y FBXW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7) entre otras [207]. Tel2 regula la estabilidad de proteínas de la familia PI3K, entre ellas mTOR [208] y FBXW7 actúa como un supresor tumoral que marca a mTOR para ser ubiquitinado y consecuentemente, degradado [209].

Por otra parte, la pérdida del dominio FAT supone la incapacidad de unión con la proteína inhibidora de mTOR, DEPTOR [207].

Además, aunque la isoforma 002 mantenga presentes los dominios FRB (unión de rapamicina), kinasa (catalítico) y FATC, es probable que la conformación proteica diste mucho de la que posee la forma canónica, por lo que puede que estos dominios también se vean afectados.

En el trabajo de *Panasyuc et al.* anteriormente mencionado, encuentran que mTORbeta (mTOR-002) coprecipita con Raptor, por lo que estas dos proteínas estarían formando un complejo [200]. Sin embargo, el sitio de unión de Raptor se encontraría

ausente en la isoforma mTOR-002, ya que tal y como sostienen algunos autores, Raptor se une al dominio HEAT de mTOR [207]. Por ello pensamos que Raptor podría unirse a otra región de mTOR y mantener su capacidad para formar el complejo, o bien, que el hecho de que Raptor y mTORbeta coprecipiten juntos se deba a un error experimental, ya que por otra parte, los experimentos de *Panasyuc et al.* no han sido reproducidos por otros autores. Además, este grupo encuentra que mTORbeta mantiene la capacidad para fosforilar a efectores como S6K [200], lo que es un hecho contradictorio ya que otros autores han demostrado que tanto el residuo Ser1231 como la repetición 19 del dominio HEAT (ambos ausentes en mTOR-002) son necesarios para la fosforilación de S6K y su pérdida provocaría la incapacidad de fosforilar a esta proteína [206, 207].

Si Raptor no puede unirse a mTOR-002 para formar el complejo mTORC1, o se une a otra región, conformando así un complejo mTORC1 no funcional o aberrante, el complejo kinasa ULK1 (ULK1-ATG13-FIP200-ATG101) nunca sería inhibido por parte de mTORC1 y estaría libre para fosforilar a sus propios componentes y así activar la autofagia de forma constitutiva por parte de esta vía.

En las muestras de CE incluidas en nuestro trabajo, 52 de los 60 tumores mostraron mayoritariamente expresión de la isoforma 002 de mTOR. De los 8 pacientes que no presentaron esta isoforma, 4 mostraron sobreexpresión de la isoforma 001 (tumores 10, 45, 48 y 50); en estos 4 tumores, que no expresan la isoforma 002, la autofagia se encontró de forma basal (o basal interrumpida), por lo que en estos casos mTOR podría estar inhibiendo la autofagia. Cuando los niveles de expresión de mTOR-001 son inferiores al 15% de lo encontrado en los controles y mTOR-002 está sobreexpresado, lo que ocurre en 21 tumores, la autofagia se encuentra activada en 16 de ellos, es decir en un 71.43% de los casos. En estos tumores, la expresión de la

isoforma 002 de mTOR y su incapacidad para formar el complejo inhibidor mTORC1 podría estar relacionada con una activación de la ruta de autofagia.

Los demás tumores, que expresan ambas isoformas, no expresan ninguna, o expresan mayoritariamente la isoforma 002, presentan una autofagia activada o basal en proporción similar. En estos casos, la activación o inhibición de la autofagia ocurriría a través de otras vías o mediante algún mecanismo que desconocemos.

En el presente trabajo hemos analizado por primera vez la expresión de la proteína mTOR en carcinoma de endometrio mediante técnicas de western blot, mostrando la expresión mayoritaria de la isoforma 002, que hasta el momento no se ha detectado en tumores. Nuestro laboratorio ha analizado con el mismo anticuerpo esta proteína en diferentes tumores, no encontrando expresión de la isoforma 002 en ninguno de los casos analizados hasta el momento, por lo que parece una isoforma específica de tumores endometriales. Dado que hasta el momento no hay estudios que analicen los mecanismos que dan lugar a la expresión de esta isoforma ni su función celular, consideramos de gran interés profundizar en su estudio.

## 2.7. PKC $\zeta$ (PKCz)

Las proteínas kinasas C, conforman una gran familia multigénica de serina/treonina kinasas que intervienen en múltiples rutas de transducción de señales y están implicadas en numerosas respuestas celulares a factores de crecimiento y otros estímulos [210, 211]. Las enzimas de esta familia poseen un dominio catalítico altamente conservado y un dominio regulador responsable del mantenimiento de la conformación activa o inactiva de la enzima. Existen varias isoformas de PKCs y se organizan en tres grupos: las isoformas clásicas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ; las isoformas nuevas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$  y  $\mu$ ; y las isoformas atípicas  $\nu$ / $\lambda$  y  $\zeta$  (z) [212].

PKC $\zeta$  es uno de los miembros de las PKCs atípicas y está implicada en la regulación de la transformación celular y la carcinogénesis. Se ha demostrado previamente que esta proteína está implicada en múltiples rutas de señalización como la activación de la cascada ERK/MAPK, la ruta NF- $\kappa$ B, así como en la regulación de la polaridad celular [213]. Para su actividad, esta proteína necesita la interacción con otras proteínas como p62, Par-6 y MEK5. La interacción entre PKC $\zeta$  y p62 se produce a través de sus dominios PB1 (Phox/Bem1p) [103, 214] (Figura 55).

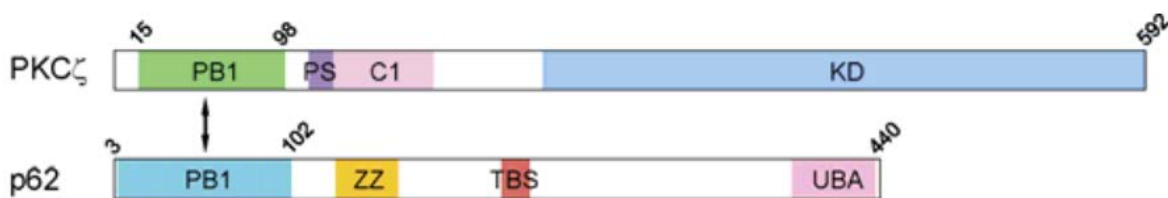


Figura 55. Dominios/motivos funcionales de PKC $\zeta$  y p62 [215].

En nuestro trabajo hemos analizado la expresión de PKC $\zeta$  mediante western blot en 60 tumores de pacientes con CE encontrando expresión normal o ligeramente aumentada de la proteína en el 66.7% de las muestras (Tabla 19). Un tercio de los tumores mostraron una expresión disminuida de PKC $\zeta$ , aunque la ausencia total de expresión fue muy poco frecuente, encontrándose tan solo en cuatro pacientes. Se obtuvieron resultados similares en los dos grupos de CE pero los de bajo grado mostraron un mayor número de casos con expresión disminuida (39.9% frente a un 21.1%) y los de alto grado un mayor porcentaje con expresión elevada (78.9% frente a un 61%).

Las PKCs atípicas como PKC $\zeta$  y PKC  $\iota/\lambda$ , se han relacionado con la tumorigénesis, aunque el papel que tiene PKC $\zeta$  es controvertido y no está del todo claro. En un estudio del transcriptoma tumoral denominado *Oncomine 3.0* llevado a cabo por *Rhodes et al.* en 2007, se encontró que PKC $\zeta$  aparecía como la diana más

sobreexpresada en cáncer de próstata metastásico y no metastásico [216]. Por otra parte, la “bisindolylmaleimide I” se une a PKC $\zeta$  inhibiéndola y es capaz de detener el crecimiento en células de glioblastoma [217]. Además, se ha encontrado que PKC $\zeta$  podría estar relacionado con la tumorigénesis en el ovario, ya que su sobreexpresión aumenta la supervivencia celular y su bloqueo disminuye la motilidad de la célula tumoral [218]. En líneas celulares uterinas, la sobreexpresión de isoformas de PKC está relacionada con una alta tasa proliferativa y podría estar implicada en la patogénesis de este tipo de tumores [219]. Nuestro estudio ha sido el primero en analizar la expresión de PKC $\zeta$  en tejido tumoral de pacientes con CE y nuestros resultados muestran que la proteína se expresa en la mayoría de los casos, y en mayor porcentaje en los tumores de mayor grado.

A la vista de estos resultados, el empleo de fármacos inhibidores de la función de PKC $\zeta$  podría ser una nueva diana terapéutica a tener en cuenta en carcinoma de endometrio, ya que se ha demostrado su efectividad en otros tipos de tumores.

## **2.8. TRAF6**

Las proteínas de la familia TRAF (Tumor necrosis factor-associated factors) fueron inicialmente descubiertas como proteínas adaptadoras que se acoplan a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) en la señalización de varias rutas celulares. TRAF6 se identificó como un adaptador de señales inducidas por las superfamilias TNFR y IL-1R/TLR (interleukin-1 receptor/Toll-like receptor) y se vio que desempeñaba un papel importante en la respuesta inmune innata [220]. Además de regular la actividad de IKK/NF $\kappa$ B, TRAF6 también modifica otras rutas de señalización; así, se encontró que TRAF6 mediaba la activación de proteínas como JNK y p38 [221] además de mediar la

ubiquitinación y activación de AKT [222], proteína que interviene en la ruta de activación de mTOR.

Recientes estudios han mostrado evidencias de que TRAF6 desempeña un importante papel en el cáncer. El análisis de la expresión de la proteína en tumores de endometrio mostró que un 68.3% de los tumores presentaban una expresión normal o incrementada de TRAF6, mientras que solo un 31.7% mostraban disminución o ausencia de expresión, no encontrando diferencias según el grado tumoral (Tabla 20).

El porcentaje de muestras con expresión o sobreexpresión de TRAF6 en los tumores incluidos en nuestra serie es superior al encontrado en otros tipos de tumores. Por ejemplo, en cáncer gástrico se encontró expresión de la proteína en un 58.9%, mientras que en tejido no tumoral la expresión se perdía o disminuía considerablemente. En este tipo de tumor, la sobreexpresión de TRAF6 se relacionó con un peor pronóstico, mayor capacidad de invasión y disminución de la apoptosis [223]. En cáncer de pulmón se ha visto que TRAF6 actúa como un oncogén amplificado, sirviendo de “puente” entre las rutas de RAS y NFκB [224]. En otros tumores, como es el caso del cáncer de esófago, el osteosarcoma, el cáncer de colon, el mieloma o el glioma, TRAF6 parece estar relacionado con la tumorigénesis, al asociarse con una mayor proliferación y modificación de la apoptosis [225-229]. No obstante, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios antes citados analizan la expresión de TRAF6 mediante inmunohistoquímica mientras que en nuestro trabajo la hemos determinado por western blot.

Nuestro estudio ha sido el primero que ha analizado la expresión de TRAF6 en carcinoma de endometrio. La observación de que la mayoría de los tumores de endometrio incluidos en nuestro trabajo presentan sobreexpresión de esta proteína, nos



permite sugerir que su inhibición podría resultar en una disminución de la proliferación celular y, por lo tanto, ser una posible diana terapéutica.

## **2.9. Correlación entre la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en tumores de endometrio**

En nuestro trabajo, hemos encontrado correlación en la expresión en tumores de endometrio entre varias proteínas implicadas en la ruta de autofagia. Así, encontramos una asociación significativa entre la expresión de p62 y mTOR-001, TRAF6 y Beclin1; entre mTOR-001 y Beclin1, y entre mTOR-001 y TRAF6.

La correlación encontrada entre p62, TRAF6 y mTOR-001 podría ser debida a algunas de las funciones biológicas que poseen estas proteínas. La proteína p62 funciona como molécula adaptadora de la señalización de múltiples rutas, por ejemplo, posee un importante papel en la proliferación y la supervivencia celular a través de la activación de mTORC1 [105, 230]. Esto es llevado a cabo mediante la interacción de p62 con Raptor, componente esencial del complejo mTORC1, y mediante la facilitación de la translocación del complejo mTORC1 al lisosoma, proceso que implica la interacción de p62 con proteínas Rag [230]. Además, se ha demostrado que la ubiquitín-ligasa tipo E3, TRAF6, también es crucial en este proceso [231]. Por tanto, la interacción entre p62 y TRAF6 facilita el reclutamiento de mTORC1 al lisosoma y cataliza la poliubiquitinación del residuo K63 de la subunidad mTOR del complejo, lo que es requerido para su correcta activación por los niveles de aminoácidos [231]. La interacción de estas tres proteínas en la activación de mTORC1 regulada por los niveles de nutrientes, explica la correlación entre la expresión de las tres proteínas en tumores de endometrio.

Por otro lado, hemos encontrado una correlación positiva entre Beclin1 y p62 y entre Beclin1 y mTOR. Estas tres moléculas no intervienen conjuntamente en ninguna ruta diferente a la autofagia y en el proceso autofágico poseen papeles contrarios, ya que mTOR es un inhibidor de la ruta y Beclin1 es un regulador positivo. Además, la ausencia de expresión de p62 (y no su sobreexpresión) es el indicador de una activación de la vía, por lo que no cabría esperar una correlación entre estas proteínas, o encontrarla de forma negativa. Estos resultados podrían ser debidos a alteraciones en otras proteínas implicadas en la autofagia no analizados en nuestro trabajo.

### **3. Estudio del efecto de Panobinostat® en líneas tumorales de carcinoma de endometrio**

El Panobinostat® (LBH589) es un pan-inhibidor de histonas desacetilasas (HDAC) perteneciente a la familia del ácido hidroxámico, activo frente a HDAC de clase I, II, y IV [232], enzimas implicadas en la modificación epigenética de las histonas [233]. El desequilibrio entre la acetilación y desacetilación de histonas está implicado en el desarrollo tumoral [234]. La pérdida de acetilación es un evento común en tumores humanos y ocurre frecuentemente en estadios tempranos de la tumorigénesis [235]; por ello las proteínas HDAC podrían tener un importante papel en el inicio y la progresión tumoral, siendo utilizadas actualmente como dianas terapéuticas complementarias para el tratamiento del cáncer.

El fármaco LBH589 posee una actividad citotóxica muy potente en células tumorales, mientras que en células normales tiene una toxicidad mínima [232]. Este fármaco inhibe la eliminación de grupos acetilo por parte de enzimas HDAC facilitando la acetilación de proteínas histonas y no histonas y, como consecuencia, la acumulación de histonas y otras proteínas implicadas en el bloqueo del ciclo celular y apoptosis de

células tumorales. Se ha comprobado la eficacia de este compuesto en tumores hematológicos como el mieloma múltiple, la leucemia mieloide crónica, el linfoma cutáneo de células T y la leucemia mieloide aguda, y en tumores sólidos como el de próstata, páncreas y mama [236, 237].

El Panobinostat® produce una hiperacetilación de la  $\alpha$ -tubulina e inhibe a HDAC6 provocando una alteración del transporte de proteínas mal plegadas para su degradación en el autofagolisosoma, induciendo apoptosis [232]. Además, se ha visto que esta sustancia puede potenciar la actividad antitumoral de esteroides y agentes inmunomoduladores como la talidomida y la lenalidomida [238].

En nuestro trabajo hemos incubado cuatro líneas celulares tumorales derivadas de carcinoma de endometrio con diferentes concentraciones de Panobinostat®, lo que nos ha permitido analizar la viabilidad de las células incubadas con este compuesto. El Panobinostat® exhibe inhibición en el rango de concentraciones nanomolares para las HDACs de clase I, II y IV, por ello, tratamos las células tumorales de CE con concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100nM. Las cuatro líneas celulares mostraron inhibición de la capacidad proliferativa a todas las concentraciones del fármaco, aunque la línea KLE mostró una susceptibilidad más discreta y HEC1B más marcada (Figura 32).

El estudio del ciclo celular mostró diferente comportamiento dependiendo de la línea celular (Figura 33). Las células AN3CA y HEC1B presentaron una tasa de mortalidad elevada, siendo mucho más notable en la segunda. Las otras dos líneas mostraron una menor mortalidad y en el caso de la línea celular KLE se observó cierta resistencia al fármaco. Las cuatro líneas tumorales mostraron un bloqueo en la fase G2/M, AN3CA, HEC1B y SKUT1 a las 24 horas de tratamiento y KLE tras 72 horas de exposición al fármaco. En otros tumores se ha descrito que el LBH589 es capaz de

provocar un aumento de células bloqueadas en G2/M, por ejemplo en cáncer de próstata y carcinoma renal [239, 240]. La parada en esta fase del ciclo celular puede originar un aumento de muerte celular si el ciclo es incapaz de progresar [241-243]; por ello, el aumento en la mortalidad observado en AN3CA, HEC1B y SKUT1 comienza tras el bloqueo en G2/M a las 24 horas de tratamiento y en KLE se produce más tarde, tras 72 horas. La hiperacetilación de las histonas pericentroméricas inducida por inhibidores de HDAC podría provocar fallos en el ensamblaje de los microtúbulos del cinetocoro y ser la causa de la parada de la mitosis [244, 245]. Se sabe, que la sensibilidad celular a la radiación depende de en qué fase del ciclo se encuentren, siendo la fase G2/M en la que las células son más radiosensibles [246] por lo que el tratamiento de los tumores de endometrio con inhibidores de HDAC podría sensibilizarlos e incrementar la respuesta al tratamiento radioterápico.

La línea celular HEC1B posee una mutación en el gen KRAS, uno de los oncogenes más frecuentemente mutados en cáncer [247]. Los miembros de la familia RAS funcionan como GTPasas monoméricas con dos estados moleculares (activo o inactivo), de manera que los estados de unión a nucleótidos GDP o GTP determinan sus funciones biológicas.

Cuando están unidas a GTP, las proteínas RAS intervienen en varias rutas que influyen en el comportamiento celular [248]. En cáncer, es común que se produzcan mutaciones activadoras en KRAS, principalmente en los codones 12, 13, 61 y 146 [247, 249]. Estas mutaciones afectan a la actividad enzimática de la proteína, pero provocan un efecto aún mayor sobre la hidrólisis de GTP inducida por proteínas GAPs, causando que el equilibrio entre la forma unida a GDP o a GTP se incline hacia la segunda, es decir, provoca una forma constitutivamente activa (bloqueo de la forma unida a GTP) [249, 250], aumentando esto la actividad transformante de KRAS. Se sabe, que KRAS

también es regulada mediante modificaciones postraduccionales, entre ellas, por acetilación de la lisina 104. *Yang et al.* demostraron que dicha acetilación atenúa la actividad transformante de KRAS porque interfiere con el intercambio de nucleótidos mediado por GEFs [251]. El mismo grupo, identificó dos desacetilasas que regulaban la acetilación de KRAS en células tumorales, HDAC6 y SIRT2. Además, observaron que la inhibición de cualquiera de estas enzimas afectaba drásticamente al crecimiento de células con mutaciones activadoras en KRAS [252].

Las desacetilasas de residuos de lisina comprenden a las de clases I y II (HDAC 1-10) [253]. En la línea celular HEC1B, el tratamiento con LBH589 inhibiría HDAC6 por lo que el residuo Lys104 de KRAS se mantendrá acetilado y por tanto habría una menor actividad oncogénica de KRAS a pesar de que estas células poseen KRAS mutado (p.G12D). Si la capacidad transformante en las células HEC1B viene dada por la actividad oncogénica de KRAS, el tratamiento con Panobinostat® podría anular o atenuar dicha actividad y provocar una disminución en el crecimiento, además de un aumento de la mortalidad. Estos resultados sugieren que el tratamiento con inhibidores de HDAC en tumores que expresan formas oncogénicas de KRAS podría suponer una nueva vía terapéutica en carcinomas de endometrio con esta característica.

En la línea celular KLE no hemos podido encontrar una relación entre las características de estas células y la resistencia que presentan frente al fármaco. No obstante, aunque el LBH589 no produce una alta mortalidad en todas las líneas celulares incluidas en este trabajo, sí produce una inhibición de la proliferación en todas ellas, por lo que podría servir para frenar el crecimiento tumoral en carcinoma de endometrio y además, podría ser una efectiva terapia en aquellos tumores más susceptibles.

Tras el tratamiento con 50nM de LBH589 de las cuatro líneas de carcinoma de endometrio observamos una inducción de la autofagia. El Panobinostat® produce una

reducción en la expresión de la proteína p62, que es degradada en el proceso autofágico, y un aumento de la forma conjugada con fosfatidiletanolamina de la proteína LC3B (LC3B-II) en células de carcinoma de endometrio (Figuras 34 y 36). Además, una de las proteínas clave en la formación de los autofagosomas o vesículas autofágicas (AVs) y regulador positivo de la autofagia, Beclin1, aumenta ligeramente en las células tumorales de CE en respuesta al tratamiento (Figura 35). Asimismo, las inmunofluorescencias realizadas muestran pequeños acúmulos de LC3B, que corresponden a autofagosomas, sobretodo visible en la línea SKUT1 (Figura 38).

La razón por la que la línea celular SKUT1 exhibe un aumento mayor que el resto de las líneas celulares incluidas en el estudio de la proteína LC3B-II podría ser debido a que estas células poseen una mutación en el gen supresor tumoral del retinoblastoma (RB1). La relación entre RB1 y la autofagia ha sido estudiada por varios grupos, y parece que la pérdida de función de la proteína RB1 se asocia con un estímulo de la autofagia mediante mecanismos directos e indirectos [254]. Parte de los efectos de RB1 son secundarios a interacciones inhibitorias con factores de transcripción de la familia E2F [255] y mutaciones en el gen RB1 producen una desregulación de la actividad de las proteínas de esta familia [256]. Las células SKUT1 presentan pérdida de función de RB1, lo que provoca que la proteína E2F1 se active y, como consecuencia se produzca un aumento de la transcripción de genes autofágicos, entre ellos LC3 [257].

En otros tipos tumorales también se ha encontrado que el tratamiento con LBH589 causa una inducción de la autofagia. Varios grupos han comunicado que en cáncer de mama, incluido el cáncer de mama triple negativo, se produce un aumento de los niveles de expresión de LC3-II y Beclin1 y una disminución de p62 bajo el efecto de este inhibidor [258, 259]. En estudios en cáncer de colon se han encontrado resultados similares [260].

Otros pan-inhibidores de HDAC también producen una inducción de la autofagia, como el Vorinostat (SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid) en cáncer cervical [261], de ovario [262] o en condrosarcoma [263], o la Tricostatina A (TSA) en cáncer de colon [264]. Además, está probado que el tratamiento con inhibidores de HDAC puede inducir tanto apoptosis mediada por mitocondrias como muerte celular autofágica independiente de caspasas [265].

Hasta el momento, los inhibidores de HDAC han sido probados principalmente en combinación con otros fármacos. Por ejemplo, *Rao et al.* trataron células de cáncer de mama con Panobinostat® y cloroquina. La cloroquina provocó una inhibición de la autofagia que había sido previamente inducida por LBH589, dando lugar a una acumulación de proteínas ubiquitinadas tóxicas y de p62, causando una muerte celular de forma sinérgica, es decir potenciando la acción sobre la mortalidad de cada droga por separado y, además, produciendo un aumento en la supervivencia de los ratones usados como modelo [259]. En otro estudio se trataron células tumorales de cáncer de colon con otro paninhibidor de HDAC, la Tricostatina A (TSA), y se vio que el efecto antitumoral que producía este fármaco se veía potenciado al realizar el tratamiento en combinación con Bafilomicina A (inhibidor de la autofagia) y, además, estas células se volvían más sensibles a la radioterapia [264].

El tratamiento con LBH589 es efectivo en tumores endometriales ya que es capaz de producir muerte celular por sí solo en algunos tipos celulares y produce una inducción de la autofagia en todas las líneas celulares utilizadas. El Panobinostat® podría ser una nueva terapia antitumoral en carcinoma de endometrio y podría servir de base para tratamientos en combinación con otros fármacos.

#### **4. Estudio del efecto de la cloroquina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio**

La cloroquina (CQ) es un agente lisosomotrópico que funciona como una amina débil. En su conformación sin carga, esta droga se difunde fácilmente a través de las membranas lisosomales, pero también puede protonarse y quedar atrapada en vesículas acídicas como los lisosomas. La protonación de la CQ resulta en la inhibición de enzimas lisosomales que perturban el ambiente de este orgánulo, acidificándolo ( $\text{pH} < 5$ ) [266]; por ello, la cloroquina es una droga que, a lo largo de los años, se ha utilizado en el tratamiento de la malaria [267]. Debido a que la CQ posee efectos antiinflamatorios también se ha usado en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide [268], el lupus sistémico eritematoso [269] o el síndrome de Sjögren [270]. Más recientemente, la CQ se ha usado ampliamente como un agente que sensibiliza frente a determinadas terapias antitumorales ya que tiene un efecto sinérgico con la radiación ionizante y algunos agentes quimioterápicos de una forma específica del tipo de tumor [271-275]. Además, se ha demostrado que la CQ inhibe el crecimiento y/o induce la muerte celular en varios modelos tumorales: melanoma [276], glioma [277], cáncer de pulmón [278] y cáncer de mama [279], y muestra una baja citotoxicidad en células epiteliales no tumorales [280].

La CQ puede suprimir la autofagia mediante su acumulación en el lumen lisosomal inhibiendo la formación del autofagolisosoma [281]. Existen múltiples estudios que han revelado que la resistencia a ciertas terapias antitumorales, como la radiación, la quimioterapia o la terapia dirigida a dianas moleculares, se atribuye a una sobrerregulación de la autofagia que funciona como un mecanismo protector [282, 283]. Por esta razón, la CQ y sus derivados, como la hidroxicloroquina, han sido usados como inhibidores de la autofagia en varios estudios en pacientes con cáncer. Además, se ha



visto en varios modelos preclínicos que la inhibición de la autofagia que produce la CQ en combinación con otras drogas antitumorales produce de forma sinérgica un aumento de la citotoxicidad [284-286].

Todas las líneas celulares incluidas en el estudio mostraron susceptibilidad a la cloroquina (Figura 39). Las células AN3CA, HEC1B y SKUT1 mostraron una susceptibilidad dependiente de la dosis de droga empleada, observándose claramente una disminución en la viabilidad de las células al aumentar la concentración de CQ. Las células KLE parecen más susceptibles al fármaco. Aunque existen pocos trabajos sobre el efecto de la cloroquina en carcinoma endometrial, nuestros resultados concuerdan con los del grupo de *Fukuda et al.*, quienes encontraron que la CQ provocaba una inhibición de la proliferación dependiente de la dosis utilizada [287]. Asimismo, en carcinoma hepatocelular el tratamiento con CQ también causa una inhibición del crecimiento celular, tanto *in vitro* como *in vivo* [288].

La CQ no modifica el ciclo celular a la concentración ensayada (25 $\mu$ M) (Figura 40). Las líneas AN3CA y KLE son las que presentan un mayor porcentaje de células en fase subG1 (muertas), aunque no llega al 10% en la primera y en la segunda está en torno al 17%. El mayor efecto del fármaco sobre la mortalidad en la línea KLE es similar a lo encontrado en otro trabajo, en el que KLE también mostró mayor número de células en fase subG1 que AN3CA [287]. En carcinoma hepatocelular se ha observado un bloqueo en G0/G1, además de daño en el DNA y muerte por apoptosis, tras tratamiento con CQ [288]. En las líneas celulares de CE analizadas en nuestro trabajo no se ha encontrado un bloqueo tan significativo en G0/G1, aunque las líneas KLE y SKUT1 presentan un mayor porcentaje de células en esta fase que sus respectivos controles a las 24 horas de tratamiento, aunque las células progresan a partir de ese

momento y salen del bloqueo. En las células KLE, tras el bloqueo en G0/G1 a las 24 horas se inicia un aumento en la mortalidad, probablemente a causa del mismo.

En estudios realizados en células de carcinoma colorrectal se encontró que la CQ mostraba una actividad dual dependiente principalmente de la dosis utilizada. A dosis bajas, la CQ inhibe la autofagia, y a altas dosis provoca una permeabilización de la membrana lisosomal y una alta producción de ROS, que es letal para las células [289]. En nuestro trabajo, hemos tratado a las células a una concentración baja cuando hemos analizado el ciclo y la muerte celulares, lo que podría explicar la baja mortalidad encontrada.

El tratamiento con cloroquina produce una inhibición del crecimiento en líneas celulares de carcinoma de endometrio, aunque no causa una mortalidad elevada a la concentración utilizada. La cloroquina, puesto que provoca una marcada reducción en la proliferación incluso a bajas concentraciones, podría servir como fármaco adyuvante en terapias antitumorales en este tipo de tumores.

Como se ha mencionado, la autofagia se ve incrementada durante la quimioterapia y la radioterapia, y funciona como una respuesta adaptativa que media la resistencia a estos tratamientos [282]. Por ejemplo, la autofagia se correlaciona con la resistencia al cisplatino en cáncer de ovario [290]. El cisplatino es un agente quimioterápico importante en el tratamiento del CE, por lo que el uso de un inhibidor de la autofagia como la cloroquina podría ser una estrategia prometedora en la terapia de carcinomas endometriales con altos niveles de autofagia.

En nuestro laboratorio hemos tratado a las cuatro líneas celulares de CE con una concentración de 25 $\mu$ M de cloroquina durante un máximo de 72 horas. Hemos extraído las proteínas celulares cada 24 horas y hemos analizado por western blot la expresión de

p62, Beclin1 y LC3B. Hemos comprobado que la cloroquina provoca una marcada inhibición de la autofagia en células tumorales de endometrio. En las cuatro líneas estudiadas se produce un aumento en la expresión de las proteínas p62 y LC3B-II (Figuras 41 y 43). La CQ impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma y por tanto la posterior eliminación del contenido de estas vesículas [291], que provoca una acumulación de autofagosomas con LC3B-II en su membrana y de p62, que no es degradado en el autofagolisosoma al estar interrumpida la vía. Todas las células utilizadas en nuestro estudio muestran una interrupción de la ruta autofágica bajo el efecto de la CQ. Además del aumento en la expresión proteica observada en el western blot, mediante inmunofluorescencia hemos observado cómo LC3B está dispersa por la célula en las células sin tratamiento mientras que con CQ se produce un aumento en la expresión y se ven numerosos acúmulos de la proteína que corresponden a autofagosomas (Figura45). Aunque en menor medida, también se observan acúmulos de p62 bajo el efecto de la CQ (Figura 44), en este caso, p62 se habría unido a la membrana del autofagosoma a través de LC3B y al no poder progresar hacia la fusión con el lisosoma se estaría acumulando.

Cabe destacar que el aumento de p62 y LC3B en respuesta al tratamiento con CQ es mucho mayor en las líneas AN3CA y SKUT1 que en HEC1B y KLE. Las líneas AN3CA y SKUT1 contienen mutaciones de pérdida de función en el gen supresor tumoral PTEN, regulador positivo de la autofagia. La pérdida de función de PTEN, podría inducir otras vías de activación y, de esta forma, las células serían más susceptibles a la interrupción de la autofagia provocada por la cloroquina, produciéndose un aumento mayor en la acumulación de las proteínas LC3B-II y p62.

En las líneas AN3CA, KLE y SKUT1 la proteína Beclin1 muestra un incremento en su expresión en respuesta al tratamiento mientras que en HEC1B permanece

invariable (Figura 42). Beclin1 actúa en etapas previas a la formación del autofagolisosoma, es decir, en la formación del fagoporo (complejo ATG14- BECN1-PIK3C3-PIK3R4) y en la maduración del autofagosoma (complejo UVRAG-BECN1-PIK3C3-PIK3R4) [59, 69]. Dado que el proceso autofágico está interrumpido en la fusión de autofagosoma y el lisosoma a causa de la cloroquina, se acumularán proteínas que funcionen en etapas anteriores a este punto. Por ello, aunque Beclin1 se relaciona con una autofagia activada, en este caso su incremento de expresión podría ser motivado por la acumulación que supone el bloqueo de la formación del autofagolisosoma.

El tratamiento de líneas tumorales de carcinoma de endometrio con cloroquina provoca una inhibición de la autofagia a concentraciones muy reducidas, lo que resulta en una baja toxicidad para la célula. Estos resultados sugieren que la cloroquina podría ser una elección acertada en el tratamiento de tumores endometriales con una autofagia sobreactivada que resiste a las terapias antitumorales habituales.

## **5. Estudio del efecto de metformina en líneas tumorales de carcinoma de endometrio**

La metformina es una biguanida (comercializada como hipoclorito de 1,1-dimetilbiguanida) usada como una droga oral para el tratamiento de la diabetes. La metformina fue aprobada en 1995 por la FDA (Food and Drug Administration) como tratamiento de la diabetes, y posteriormente recomendada como tratamiento de primera línea en la diabetes de tipo II por la Asociación Americana de la Diabetes [292]. Además, aunque su uso no está aprobado por la FDA, también se utiliza en el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico [293].

En el año 2005, *Evans et al.* sugirieron por primera vez que la metformina podría tener un efecto antitumoral, al encontrar que los pacientes con diabetes de tipo II

tratados con metformina mostraban un menor riesgo a padecer cáncer [294]. Posteriormente, otros grupos obtuvieron resultados similares [295, 296]. En 2013, en un meta-análisis que incluyó 24.410 pacientes, se encontró que el uso de la metformina estaba asociado a un menor riesgo de muerte a causa del cáncer [297]. Se piensa que la actividad antitumoral de la metformina es consecuencia de los efectos sistémicos que causan la disminución tanto de la insulina como de la glucosa y a la activación de rutas de señalización importantes como la de la kinasa AMK-activada (AMPK) [298].

Recientemente se han evaluado los beneficios potenciales de la metformina en la prevención y tratamiento de tumores ginecológicos [299, 300]. El uso de la metformina podría tener una base biológica importante en el tratamiento del carcinoma de endometrio. La obesidad [301] y la hiperinsulinemia [302] incrementan el riesgo de desarrollar un tumor endometrial, y la metformina modifica ambos factores de riesgo.

En nuestro trabajo hemos utilizado concentraciones de metformina desde 0.5 a 8mM. Tras la incubación durante 72 horas hemos observado una reducción de la proliferación de las cuatro líneas celulares de carcinoma de endometrio (Figura 46). La disminución de la viabilidad parece dependiente de la dosis de fármaco utilizada así como del tiempo de exposición, produciéndose la máxima inhibición a las concentraciones más altas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por *Takahashi et al.* en una línea de carcinoma endometrial [303]. En otros tumores también se ha encontrado que la metformina ejerce un efecto antiproliferativo, como por ejemplo en cáncer de mama [304], próstata [305], páncreas [306], ovario [307] y pulmón [308].

En el estudio del ciclo celular hemos utilizado una concentración de 8mM de metformina y nuestros resultados mostraron que el fármaco no afectaba en gran medida a las fases del ciclo (Figura 47). De las líneas celulares utilizadas únicamente AN3CA y SKUT1 mostraron un porcentaje de células muertas superior a las células sin

tratamiento. En el trabajo anteriormente mencionado, en la línea de CE que utilizaron se encontró un porcentaje de células muertas superior al encontrado en nuestro laboratorio; además, encontraron que la muerte se producía por una inducción de la apoptosis [303]. El mismo grupo, observó un bloqueo en G2/M al someter a las células al tratamiento con metformina 10mM durante 48 horas. En otros tumores, como en cáncer gástrico y cáncer de pulmón, hay evidencias de que la metformina causa un bloqueo en G0/G1 [308, 309]. Nuestros resultados no muestran un bloqueo tan significativo en esta fase, aunque las líneas HEC1B y KLE muestran un porcentaje ligeramente superior de células en G2/M tras el tratamiento con metformina. Estas diferencias podrían deberse a que la concentración utilizada en nuestro laboratorio es menor a la usada en ese trabajo y, además, las líneas celulares también difieren ya que *Takahashi et al.* utilizaron la línea de CE Ishikawa, no incluida en nuestro trabajo y con diferentes características que AN3CA, HEC1B, KLE y SKUT1.

Nuestros resultados sugieren que la metformina produce una disminución en la proliferación celular de líneas de carcinoma de endometrio. Aunque las diferencias encontradas respecto a otros grupos, ponen de manifiesto que el efecto de este fármaco puede causar un bloqueo de las células y esto difiere no solo por tipo tumoral, sino que incluso por las propias características de las células dentro de un mismo tipo de tumor.

Hemos estudiado el efecto de la metformina sobre la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en las cuatro líneas de CE, observando que las líneas celulares AN3CA y SKUT1 responden de manera a las líneas HEC1B y SKUT1.

Las líneas HEC1B y KLE muestran una disminución progresiva de la expresión de la proteína p62 acompañada por un aumento en la expresión de LC3B-II (Figuras 48 y 50). En las células KLE, la expresión de LC3B-II no aumenta pero, sin embargo, la isoforma citosólica LC3B-I disminuye, lo que concuerda con la conversión de la

isoforma I en la forma lipidada LC3B-II, que sugiere que se están formando los autofagosomas. Estos resultados en conjunto indican que la metformina induce la autofagia en estas dos líneas celulares, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros grupos en tumores endometriales [303], de colon [310] y melanoma [311], entre otros.

En contraposición, las líneas celulares AN3CA y SKUT1 muestran un aumento gradual de la expresión de p62 y de LC3B-II (Figuras 48 y 50), lo que puede ser consecuencia de una autofagia activada que ha sido interrumpida en etapas tardías del proceso. Esto demuestra que el efecto de la metformina podría ser diferente dependiendo de las características de cada tumor. Las líneas AN3CA y SKUT1 deben compartir alguna alteración que interfiere con el efecto que la metformina causa generalmente sobre la autofagia, por ejemplo, las mutaciones en el gen PTEN que ambas poseen.

La metformina es una molécula con carga positiva que se acumula en la matriz mitocondrial e inhibe el transporte de electrones en este orgánulo, provocando una reducción en la oxidación de NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) y en la síntesis de ATP [312]. La disminución en la síntesis de ATP activa a AMPK (AMP-activated protein kinase), que es un sensor celular de energía. La activación de AMPK suprime a mTOR, lo que provoca una disminución en la síntesis proteica y la proliferación celular [313], además mTOR no podría inhibir la autofagia. Las líneas celulares podrían tener alguna alteración en la vía de activación de AMPK y por tanto activar la autofagia de una forma aberrante, por lo que en un futuro nos planteamos analizar las posibles alteraciones en esta vía.

La proteína Beclin1 aumenta en AN3CA y SKUT1, lo que podría significar que se acumula debido a la interrupción de la autofagia. En la línea KLE la expresión de la

proteína Beclin1 permanece prácticamente invariable, mientras que en HEC1B aumenta inicialmente de forma muy ligera y disminuye tras 72 horas de tratamiento (Figura 49).

El tratamiento con metformina provoca una inducción de la autofagia en determinadas líneas celulares de carcinoma de endometrio como las líneas HEC1B y KLE incluidas en este trabajo, que deben presentar características comunes a las líneas Ishikawa y ECC-1 utilizadas en otros trabajos [303, 313]. El efecto de la metformina sin embargo, no es el mismo en otras líneas celulares de CE, por lo que el uso de la metformina debe plantearse en función de las características de cada tumor. Es necesaria una investigación más profunda para determinar qué mecanismos podrían influir en el efecto de la metformina en tumores endometriales. No obstante, otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que el efecto de metformina sobre líneas celulares tumorales se incrementa con el tiempo, por lo que no podemos descartar un efecto diferente ante un tratamiento más prolongado.



## **CONCLUSIONES**

---

---



1. En nuestro trabajo mostramos una asociación entre polimorfismos en genes de autofagia y carcinoma de endometrio ya que, el genotipo TT de ATG10 (rs1864183) confiere un mayor riesgo a desarrollar tumor endometrial; el genotipo AA de ATG16L1 (rs2241880) se asocia a carcinomas de tipo no endometriode; y el genotipo GG de ATG5 (rs2245214) se asocia a tumores de alto grado y de tipo no endometriode. Estos resultados ponen de manifiesto que polimorfismos en los genes implicados en la autofagia modifican el riesgo a desarrollar carcinoma de endometrio
2. Nuestros resultados muestran una autofagia activa en los tumores de endometrio de bajo grado, mientras que parece estar disminuida en los de alto grado
3. La expresión elevada de la proteína p62, detectada mediante western blot, se relaciona con fenotipos más agresivos de la enfermedad debido probablemente a que es un reflejo de una autofagia aberrante, lo que nos permite sugerir que p62 podría servir como un biomarcador en carcinoma de endometrio.
4. En este trabajo, hemos detectado una isoforma de la proteína mTOR que se expresa de forma mayoritaria en las muestras analizadas y que parece ser específica de este tipo tumoral pudiendo ser considerada un nuevo marcador en carcinomas de endometrio. Son necesarios más estudios para confirmar esta observación y definir su papel en la patogenia y evolución de estos tumores.
5. La alta expresión encontrada en las proteínas PKC $\zeta$  y TRAF6 en las muestras de carcinoma de endometrio, nos permite sugerir que la terapia de inhibición de estas proteínas podría servir para disminuir la proliferación celular en estos tumores.
6. El Panobinostat® podría emplearse como terapia en combinación con otros fármacos en carcinoma de endometrio, ya que es capaz de inhibir la

proliferación celular a muy bajas concentraciones, producir muerte celular en determinados tipos tumorales y provocar una inducción de la autofagia.

7. La cloroquina provoca una disminución de la viabilidad celular a dosis reducidas y no presenta una toxicidad elevada, por lo que podemos sugerir que sería un fármaco adyuvante acertado en tumores endometriales con una autofagia sobreactivada que provoque resistencia a otras aproximaciones terapéuticas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---



1. Choi E: **Medical Dictionary**. In.; 2011.
2. Galiano A: **Diccionario Ilustrado de Términos Médicos**. In.; 2010.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008**. *Int J Cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
4. Bray F, Loos AH, Oostindier M, Weiderpass E: **Geographic and temporal variations in cancer of the corpus uteri: incidence and mortality in pre- and postmenopausal women in Europe**. *Int J Cancer* 2005, **117**(1):123-131.
5. Sorosky JI: **Endometrial cancer**. *Obstet Gynecol* 2008, **111**(2 Pt 1):436-447.
6. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I: **Endometrial cancer**. *Lancet* 2005, **366**(9484):491-505.
7. Clarke BA, Gilks CB: **Endometrial carcinoma: controversies in histopathological assessment of grade and tumour cell type**. *J Clin Pathol* 2010, **63**(5):410-415.
8. Bocker W: **[WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]**. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002, **86**:116-119.
9. Silverberg SG: **Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma**. *Mod Pathol* 2000, **13**(3):309-327.
10. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, Advani H: **The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study**. *Cancer* 1991, **68**(10):2293-2302.
11. Christopherson WM, Alberhasky RC, Connelly PJ: **Carcinoma of the endometrium: I. A clinicopathologic study of clear-cell carcinoma and secretory carcinoma**. *Cancer* 1982, **49**(8):1511-1523.
12. Haibach H, Oxenhandler RW, Luger AM: **Ciliated adenocarcinoma of the endometrium**. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985, **64**(5):457-462.
13. Brown L: **Pathology of uterine malignancies**. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008, **20**(6):433-447.
14. Fadare O, Zheng W: **Insights into endometrial serous carcinogenesis and progression**. *Int J Clin Exp Pathol* 2009, **2**(5):411-432.
15. Abeler VM, Kjorstad KE: **Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 97 cases**. *Gynecol Oncol* 1991, **40**(3):207-217.
16. Goodman A, Zukerberg LR, Rice LW, Fuller AF, Young RH, Scully RE: **Squamous cell carcinoma of the endometrium: a report of eight cases and a review of the literature**. *Gynecol Oncol* 1996, **61**(1):54-60.
17. Huntsman DG, Clement PB, Gilks CB, Scully RE: **Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases**. *Am J Surg Pathol* 1994, **18**(4):364-375.
18. Melhem MF, Tobon H: **Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathological review of 18 cases**. *Int J Gynecol Pathol* 1987, **6**(4):347-355.
19. Seidman JD, Chauhan S: **Evaluation of the relationship between adenosarcoma and carcinosarcoma and a hypothesis of the histogenesis of uterine sarcomas**. *Int J Gynecol Pathol* 2003, **22**(1):75-82.
20. Bokhman JV: **Two pathogenetic types of endometrial carcinoma**. *Gynecol Oncol* 1983, **15**(1):10-17.
21. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C: **Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers**. *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**(11):924-930.
22. Sansal I, Sellers WR: **The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway**. *J Clin Oncol* 2004, **22**(14):2954-2963.
23. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ: **Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression**. *Hum Pathol* 1998, **29**(6):551-558.

24. Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potischman N, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD: **Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas.** *Mod Pathol* 1997, **10**(10):963-968.
25. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA, Powell MA, Hendrickson MR, Kapp DS, Chan JK: **Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers.** *Br J Cancer* 2006, **94**(5):642-646.
26. Oehler MK, Brand A, Wain GV: **Molecular genetics and endometrial cancer.** *J Br Menopause Soc* 2003, **9**(1):27-31.
27. Society AC: **Cancer facts and figures 2010.** *American Cancer Society* 2010.
28. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK: **Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma.** *Cancer Res* 1994, **54**(6):1604-1607.
29. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C, Nicoletti R, Winckler W, Grewal R, Hanna M *et al*: **Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(25):8713-8717.
30. Machin P, Catusus L, Pons C, Munoz J, Matias-Guiu X, Prat J: **CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas.** *Hum Pathol* 2002, **33**(2):206-212.
31. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F: **High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma.** *Cancer Res* 2005, **65**(23):10669-10673.
32. Guan B, Mao TL, Panuganti PK, Kuhn E, Kurman RJ, Maeda D, Chen E, Jeng YM, Wang TL, Shih le M: **Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2011, **35**(5):625-632.
33. Wiegand KC, Lee AF, Al-Agha OM, Chow C, Kalloger SE, Scott DW, Steidl C, Wiseman SM, Gascoyne RD, Gilks B *et al*: **Loss of BAF250a (ARID1A) is frequent in high-grade endometrial carcinomas.** *J Pathol* 2011, **224**(3):328-333.
34. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, Lu Y, Stemke-Hale K, Dyer MD, Zhang F *et al*: **High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability.** *Cancer Discov* 2011, **1**(2):170-185.
35. Urick ME, Rudd ML, Godwin AK, Sgroi D, Merino M, Bell DW: **PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer.** *Cancer Res* 2011, **71**(12):4061-4067.
36. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG: **hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis.** *Am J Pathol* 1999, **155**(5):1767-1772.
37. Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Saito H, Koi S, Nakamura Y: **Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type.** *Genes Chromosomes Cancer* 1995, **14**(2):128-132.
38. Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Herrmann K, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R: **P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2008, **111**(2):365-371.
39. Yalta T, Atay L, Atalay F, Caydere M, Gonultas M, Ustun H: **E-cadherin expression in endometrial malignancies: comparison between endometrioid and non-endometrioid carcinomas.** *J Int Med Res* 2009, **37**(1):163-168.
40. Lax SF: **Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification.** *Virchows Arch* 2004, **444**(3):213-223.
41. Grushko TA, Filiaci VL, Mundt AJ, Ridderstrale K, Olopade OI, Fleming GF: **An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study.** *Gynecol Oncol* 2008, **108**(1):3-9.



42. Konecny GE, Santos L, Winterhoff B, Hatmal M, Keeney GL, Mariani A, Jones M, Neuper C, Thomas B, Muderspach L *et al*: **HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer.** *Br J Cancer* 2009, **100**(1):89-95.
43. Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, Sorolla A, Llecha N, Matias-Guiu X: **Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma.** *Int J Gynecol Pathol* 2008, **27**(3):305-317.
44. McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Senz J, Chow C, Heravi-Moussavi A, Morin GB, Mes-Masson AM, Carey MS *et al*: **Subtype-specific mutation of PPP2R1A in endometrial and ovarian carcinomas.** *J Pathol* 2011, **223**(5):567-573.
45. Le Gallo M, O'Hara AJ, Rudd ML, Urick ME, Hansen NF, O'Neil NJ, Price JC, Zhang S, England BM, Godwin AK *et al*: **Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes.** *Nat Genet* 2012, **44**(12):1310-1315.
46. Hussein YR, Broaddus R, Weigelt B, Levine DA, Soslow RA: **The Genomic Heterogeneity of FIGO Grade 3 Endometrioid Carcinoma Impacts Diagnostic Accuracy and Reproducibility.** *Int J Gynecol Pathol* 2015.
47. Hussein YR, Weigelt B, Levine DA, Schoolmeester JK, Dao LN, Balzer BL, Liles G, Karlan B, Kobel M, Lee CH *et al*: **Clinicopathological analysis of endometrial carcinomas harboring somatic POLE exonuclease domain mutations.** *Mod Pathol* 2015, **28**(4):505-514.
48. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC *et al*: **Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma.** *Nature* 2013, **497**(7447):67-73.
49. McConechy MK, Ding J, Cheang MC, Wiegand KC, Senz J, Tone AA, Yang W, Prentice LM, Tse K, Zeng T *et al*: **Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas.** *J Pathol* 2012, **228**(1):20-30.
50. Cuervo AM: **Autophagy: in sickness and in health.** *Trends Cell Biol* 2004, **14**(2):70-77.
51. Levine B, Klionsky DJ: **Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.** *Dev Cell* 2004, **6**(4):463-477.
52. Huang J, Klionsky DJ: **Autophagy and human disease.** *Cell Cycle* 2007, **6**(15):1837-1849.
53. Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, Lee ST, Kim M, Ryu H, Jung YK: **IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux.** *Hum Mol Genet* 2012, **21**(1):101-114.
54. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: **Autophagy fights disease through cellular self-digestion.** *Nature* 2008, **451**(7182):1069-1075.
55. Klionsky DJ, Emr SD: **Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.** *Science* 2000, **290**(5497):1717-1721.
56. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y: **The role of Atg proteins in autophagosome formation.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011, **27**:107-132.
57. Pyo JO, Nah J, Jung YK: **Molecules and their functions in autophagy.** *Exp Mol Med* 2012, **44**(2):73-80.
58. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU: **Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**(7):688-699.
59. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T *et al*: **Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(4):385-396.
60. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuauling HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mule JJ *et al*: **Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(10):1142-1151.

61. Mizushima N: **Autophagy in protein and organelle turnover.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011, **76**:397-402.
62. Xie Z, Klionsky DJ: **Autophagosome formation: core machinery and adaptations.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(10):1102-1109.
63. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N: **FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells.** *J Cell Biol* 2008, **181**(3):497-510.
64. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL *et al*: **Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(40):14238-14243.
65. Mizushima N: **The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation.** *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(2):132-139.
66. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, Zhang SM, Lian G, Ruan K, Wang Z *et al*: **Protein phosphorylation-acetylation cascade connects growth factor deprivation to autophagy.** *Autophagy* 2012, **8**(9):1385-1386.
67. Mariño G, López-Otín C: **Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**(12):1439-1454.
68. Yang Z, Klionsky DJ: **An overview of the molecular mechanism of autophagy.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, **335**:1-32.
69. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N: **Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**(12):5360-5372.
70. Yan Y, Flinn RJ, Wu H, Schnur RS, Backer JM: **hVps15, but not Ca<sup>2+</sup>/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells.** *Biochem J* 2009, **417**(3):747-755.
71. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B: **Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein.** *J Virol* 1998, **72**(11):8586-8596.
72. Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, Shen Y, Rameh L, Yankner B, Tsai LH *et al*: **Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation.** *Mol Cell* 2010, **38**(4):500-511.
73. Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA: **Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 2):259-270.
74. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z: **Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(4):468-476.
75. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P *et al*: **Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system.** *Nature* 2007, **447**(7148):1121-1125.
76. Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q: **Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(49):19211-19216.
77. Fan W, Nassiri A, Zhong Q: **Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(19):7769-7774.
78. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y: **A protein conjugation system essential for autophagy.** *Nature* 1998, **395**(6700):395-398.
79. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E: **The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(3):1701-1706.

80. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T: **Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 9):1679-1688.
81. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M *et al*: **A ubiquitin-like system mediates protein lipidation.** *Nature* 2000, **408**(6811):488-492.
82. Burman C, Ktistakis NT: **Autophagosome formation in mammalian cells.** *Semin Immunopathol* 2010, **32**(4):397-413.
83. Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E: **Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(16):13739-13744.
84. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y: **The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway.** *J Cell Biol* 2000, **151**(2):263-276.
85. Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL: **Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 20):4837-4848.
86. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P: **Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice.** *Nature* 2000, **406**(6798):902-906.
87. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G *et al*: **Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations.** *Cell* 2010, **141**(7):1146-1158.
88. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C *et al*: **Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(7):776-787.
89. Renna M, Schaffner C, Winslow AR, Menzies FM, Peden AA, Floto RA, Rubinsztein DC: **Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex.** *J Cell Sci* 2011, **124**(Pt 3):469-482.
90. Tresse E, Salomons FA, Vesa J, Bott LC, Kimonis V, Yao TP, Dantuma NP, Taylor JP: **VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD.** *Autophagy* 2010, **6**(2):217-227.
91. Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D *et al*: **ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy.** *Curr Biol* 2007, **17**(20):1817-1825.
92. Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB: **ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration.** *Curr Biol* 2007, **17**(18):1561-1567.
93. Raiborg C, Malerod L, Pedersen NM, Stenmark H: **Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking.** *Exp Cell Res* 2008, **314**(4):801-813.
94. Raiborg C, Stenmark H: **The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.** *Nature* 2009, **458**(7237):445-452.
95. Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ, Reggiori F: **An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis.** *J Cell Biol* 2010, **190**(6):1005-1022.
96. Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA: **Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 18):3888-3900.

97. Tooze SA, Yoshimori T: **The origin of the autophagosomal membrane.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**(9):831-835.
98. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A: **A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(12):1433-1437.
99. Mizushima N, Komatsu M: **Autophagy: renovation of cells and tissues.** *Cell* 2011, **147**(4):728-741.
100. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T: **p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death.** *J Cell Biol* 2005, **171**(4):603-614.
101. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T: **p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(33):24131-24145.
102. Duran A, Serrano M, Leitges M, Flores JM, Picard S, Brown JP, Moscat J, Diaz-Meco MT: **The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis.** *Dev Cell* 2004, **6**(2):303-309.
103. Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S: **Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions.** *Mol Cell* 2006, **23**(5):631-640.
104. Rodriguez A, Duran A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT, Moscat J: **Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62.** *Cell Metab* 2006, **3**(3):211-222.
105. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis.** *Cancer Cell* 2008, **13**(4):343-354.
106. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI *et al*: **The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**(3):213-223.
107. Moscat J, Diaz-Meco MT: **p62: a versatile multitasker takes on cancer.** *Trends Biochem Sci* 2012, **37**(6):230-236.
108. Moscat J, Diaz-Meco MT: **p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer.** *Cell* 2009, **137**(6):1001-1004.
109. Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM, Seglen PO: **Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells.** *Carcinogenesis* 1993, **14**(12):2501-2505.
110. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B: **Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1.** *Nature* 1999, **402**(6762):672-676.
111. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y *et al*: **Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis.** *Cancer Cell* 2006, **10**(1):51-64.
112. Rusten TE, Lindmo K, Juhasz G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H: **Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway.** *Dev Cell* 2004, **7**(2):179-192.
113. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL *et al*: **The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(2):218-224.
114. Ciechomska IA, Goemans GC, Skepper JN, Tolkovsky AM: **Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function.** *Oncogene* 2009, **28**(21):2128-2141.
115. Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H: **Autophagy in tumour suppression and promotion.** *Mol Oncol* 2009, **3**(4):366-375.

116. Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S, Wang HG: **Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(23):20559-20565.
117. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F *et al*: **Regulation of autophagy by cytoplasmic p53.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(6):676-687.
118. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S: **The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(23):8204-8209.
119. Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM: **DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis.** *Cell* 2006, **126**(1):121-134.
120. Borrella CC: **Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico.** Universidad de Salamanca; 2013.
121. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**(1):76-85.
122. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
123. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
124. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**(1-2):55-63.
125. Liu JL, Chen FF, Lung J, Lo CH, Lee FH, Lu YC, Hung CH: **Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma.** *Br J Cancer* 2014, **111**(5):944-954.
126. Songane M, Kleinnijenhuis J, Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Parwati I, Oosting M, Plantinga TS, Joosten LA, Netea MG, Ottenhoff TH *et al*: **Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis.** *PLoS One* 2012, **7**(8):e41618.
127. Folkman J: **Angiogenesis.** In: *Harrison's Textbook of Internal Medicine.* edn. Edited by Braunwald Eea. New York: McGraw-Hill; 2001.
128. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G *et al*: **A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus.** *Nat Genet* 2009, **41**(11):1228-1233.
129. Plantinga TS, van de Vosse E, Huijbers A, Netea MG, Joosten LA, Smit JW, Netea-Maier RT: **Role of genetic variants of autophagy genes in susceptibility for non-medullary thyroid cancer and patients outcome.** *PLoS One* 2014, **9**(4):e94086.
130. Usategui-Martin R, Garcia-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, Gonzalez Sarmiento R: **Polymorphisms in autophagy genes are associated with paget disease of bone.** *PLoS One* 2015, **10**(6):e0128984.
131. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T: **The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**(5):2092-2100.
132. Cheng JF, Ning YJ, Zhang W, Lu ZH, Lin L: **T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**(10):1258-1266.
133. Lacher M, Schroepf S, Ballauff A, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R, Koletzko S: **Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children.** *Acta Paediatr* 2009, **98**(11):1835-1840.

134. Burada F, Ciurea ME, Nicoli R, Streata I, Vilcea ID, Rogoveanu I, Ioana M: **ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility.** *Pathol Oncol Res* 2015.
135. Grimm WA, Messer JS, Murphy SF, Nero T, Lodolce JP, Weber CR, Logsdon MF, Bartulis S, Sylvester BE, Springer A *et al*: **The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon.** *Gut* 2015.
136. Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N: **Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**(5):896-909.
137. Kimmelman AC: **The dynamic nature of autophagy in cancer.** *Genes Dev* 2011, **25**(19):1999-2010.
138. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H: **p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases.** *Am J Pathol* 2002, **160**(1):255-263.
139. Li L, Shen C, Nakamura E, Ando K, Signoretti S, Beroukhi R, Cowley GS, Lizotte P, Liberzon E, Bair S *et al*: **SQSTM1 is a pathogenic target of 5q copy number gains in kidney cancer.** *Cancer Cell* 2013, **24**(6):738-750.
140. Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R: **SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD.** *Exp Cell Res* 2014, **325**(1):27-37.
141. Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J: **High Expression of p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis and Aggressive Phenotypes in Endometrial Cancer.** *Am J Pathol* 2015, **185**(9):2523-2533.
142. Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO: **Methods for monitoring autophagy from yeast to human.** *Autophagy* 2007, **3**(3):181-206.
143. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B: **Methods in mammalian autophagy research.** *Cell* 2010, **140**(3):313-326.
144. Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chu PY, Chai CY: **High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma.** *Hum Pathol* 2013, **44**(11):2558-2562.
145. Yoshihara N, Takagi A, Ueno T, Ikeda S: **Inverse correlation between microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 and p62/sequestosome-1 expression in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma.** *J Dermatol* 2014, **41**(4):311-315.
146. Li X, Lin X, Ma H: **Overexpression of LC3 in Papillary Thyroid Carcinomas and Lymph Node Metastases.** *Acta Chir Belg* 2015, **115**(5):356-363.
147. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S, Li T: **Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**(4):3882-3891.
148. Shen Y, Liang LZ, Hong MH, Xiong Y, Wei M, Zhu XF: **[Expression and clinical significance of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin1 in epithelial ovarian cancer].** *Ai Zheng* 2008, **27**(6):595-599.
149. Zhu W, Pan X, Li F, Zhang Y, Lu X: **Expression of Beclin 1 and LC3 in FIGO stage I-II cervical squamous cell carcinoma and relationship to survival.** *Tumour Biol* 2012, **33**(5):1653-1659.
150. Sakurai T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Omoto I, Owaki T, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S: **The expression of LC-3 is related to tumor suppression through angiogenesis in esophageal cancer.** *Med Oncol* 2013, **30**(4):701.
151. Sivridis E, Giatromanolaki A, Liberis V, Koukourakis MI: **Autophagy in endometrial carcinomas and prognostic relevance of 'stone-like' structures (SLS): what is destined for the atypical endometrial hyperplasia?** *Autophagy* 2011, **7**(1):74-82.
152. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A *et al*: **Guidelines for the use and interpretation of**

- assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008, **4**(2):151-175.
153. Orfanelli T, Jeong JM, Doulaveris G, Holcomb K, Witkin SS: **Involvement of autophagy in cervical, endometrial and ovarian cancer.** *Int J Cancer* 2014, **135**(3):519-528.
154. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E: **Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability.** *Genes Dev* 2007, **21**(11):1367-1381.
155. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinis C *et al*: **Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62.** *Cell* 2009, **137**(6):1062-1075.
156. Cao Y, Klionsky DJ: **Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein.** *Cell Res* 2007, **17**(10):839-849.
157. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B *et al*: **Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2008, **68**(22):9167-9175.
158. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V *et al*: **Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours.** *Int J Oncol* 2007, **30**(2):429-436.
159. Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G, Miracco C: **The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas.** *Autophagy* 2009, **5**(7):930-936.
160. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter KC, Harris AL: **Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia.** *Br J Cancer* 2010, **103**(8):1209-1214.
161. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Koutsopoulos A, Chloropoulou P, Liberis V, Sivridis E: **High Beclin 1 expression defines a poor prognosis in endometrial adenocarcinomas.** *Gynecol Oncol* 2011, **123**(1):147-151.
162. Dong M, Wan XB, Yuan ZY, Wei L, Fan XJ, Wang TT, Lv YC, Li X, Chen ZH, Chen J *et al*: **Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1alpha refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer.** *Med Oncol* 2013, **30**(1):355.
163. Lin HX, Qiu HJ, Zeng F, Rao HL, Yang GF, Kung HF, Zhu XF, Zeng YX, Cai MY, Xie D: **Decreased expression of Beclin 1 correlates closely with Bcl-xL expression and poor prognosis of ovarian carcinoma.** *PLoS One* 2013, **8**(4):e60516.
164. Dong LW, Hou YJ, Tan YX, Tang L, Pan YF, Wang M, Wang HY: **Prognostic significance of Beclin 1 in intrahepatic cholangiocellular carcinoma.** *Autophagy* 2011, **7**(10):1222-1229.
165. Chen Y, Lu Y, Lu C, Zhang L: **Beclin-1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression.** *Pathol Oncol Res* 2009, **15**(3):487-493.
166. Won KY, Kim GY, Lim SJ, Kim YW: **Decreased Beclin-1 expression is correlated with the growth of the primary tumor in patients with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.** *Hum Pathol* 2012, **43**(1):62-68.
167. Huang L, Wang S, Li SS, Yang XM: **Prognostic significance of Beclin-1 expression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Pathol Oncol Res* 2013, **19**(4):771-777.
168. Wang J, Pan XL, Ding LJ, Liu DY, Da-Peng L, Jin T: **Aberrant expression of Beclin-1 and LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** *PLoS One* 2013, **8**(7):e69038.
169. Huang JJ, Li HR, Huang Y, Jiang WQ, Xu RH, Huang HQ, Lv Y, Xia ZJ, Zhu XF, Lin TY *et al*: **Beclin 1 expression: a predictor of prognosis in patients with extranodal natural killer T-cell lymphoma, nasal type.** *Autophagy* 2010, **6**(6):777-783.

170. Huang JJ, Zhu YJ, Lin TY, Jiang WQ, Huang HQ, Li ZM: **Beclin 1 expression predicts favorable clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP.** *Hum Pathol* 2011, **42**(10):1459-1466.
171. Nicotra G, Mercalli F, Peracchio C, Castino R, Follo C, Valente G, Isidoro C: **Autophagy-active beclin-1 correlates with favourable clinical outcome in non-Hodgkin lymphomas.** *Mod Pathol* 2010, **23**(7):937-950.
172. Yu M, Gou WF, Zhao S, Xiao LJ, Mao XY, Xing YN, Takahashi H, Takano Y, Zheng HC: **Beclin 1 expression is an independent prognostic factor for gastric carcinomas.** *Tumour Biol* 2013, **34**(2):1071-1083.
173. Wu XY, Chen J, Cao QH, Dong M, Lin Q, Fan XJ, Xia Q, Chen ZH, Liu Q, Wan XB: **Beclin 1 activation enhances chemosensitivity and predicts a favorable outcome for primary duodenal adenocarcinoma.** *Tumour Biol* 2013, **34**(2):713-722.
174. Cheng HY, Zhang YN, Wu QL, Sun XM, Sun JR, Huang X: **Expression of beclin 1, an autophagy-related protein, in human cervical carcinoma and its clinical significance.** *Eur J Gynaecol Oncol* 2012, **33**(1):15-20.
175. Han Y, Xue XF, Shen HG, Guo XB, Wang X, Yuan B, Guo XP, Kuang YT, Zhi QM, Zhao H: **Prognostic significance of Beclin-1 expression in colorectal cancer: a meta-analysis.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, **15**(11):4583-4587.
176. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K: **Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma.** *Cancer Sci* 2015, **106**(1):1-8.
177. Wan XB, Fan XJ, Chen MY, Xiang J, Huang PY, Guo L, Wu XY, Xu J, Long ZJ, Zhao Y *et al*: **Elevated Beclin 1 expression is correlated with HIF-1alpha in predicting poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma.** *Autophagy* 2010, **6**(3):395-404.
178. Duan ZL, Peng ZL, Wang ZH: **[Expression and involved signal transduction pathway of autophagy gene Beclin 1 in epithelial ovarian cancer].** *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007, **38**(2):239-242.
179. Engelman JA, Luo J, Cantley LC: **The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**(8):606-619.
180. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB: **Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**(12):988-1004.
181. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(7):489-501.
182. Liang M, Shi B, Liu J, He L, Yi G, Zhou L, Yu G, Zhou X: **Downregulation of miR203 induces overexpression of PIK3CA and predicts poor prognosis of gastric cancer patients.** *Drug Des Devel Ther* 2015, **9**:3607-3616.
183. Liu JF, Zhou XK, Chen JH, Yi G, Chen HG, Ba MC, Lin SQ, Qi YC: **Up-regulation of PIK3CA promotes metastasis in gastric carcinoma.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**(39):4986-4991.
184. Yip WK, He PY, Abdullah MA, Yusoff S, Seow HF: **Increased Expression of Phosphatidylinositol 3-Kinase p110alpha and Gene Amplification of PIK3CA in Nasopharyngeal Carcinoma.** *Pathol Oncol Res* 2015.
185. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, Ellenson LH: **PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(20 Pt 1):5932-5935.
186. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Llecha N, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X: **PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations.** *Hum Pathol* 2006, **37**(11):1465-1472.
187. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, Iwata KK, Gibson NW, Griffin G: **Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(11):2676-2684.



188. Shaw RJ, Cantley LC: **Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.** *Nature* 2006, **441**(7092):424-430.
189. Foster DA: **Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1791**(9):949-955.
190. Jiang BH, Liu LZ: **Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment.** *Drug Resist Updat* 2008, **11**(3):63-76.
191. Chung JY, Hong SM, Choi BY, Cho H, Yu E, Hewitt SM: **The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(2):660-667.
192. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M: **mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(24):8421-8425.
193. Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, Browne W, Samadzedeh LK, Vanpatten K, Highstrom L, Pestano GA, Nagle RB: **Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression.** *Prostate* 2006, **66**(11):1203-1212.
194. Wang D, Chen J, Guo F, Chen H, Duan Z, Wei MY, Xu QM, Wang LH, Zhong MZ: **Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2011, **12**(10):2581-2584.
195. Feng W, Duan X, Liu J, Xiao J, Brown RE: **Morphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical squamous carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions.** *Int J Clin Exp Pathol* 2009, **2**(3):249-260.
196. Sun ZJ, Zhang L, Hall B, Bian Y, Gutkind JS, Kulkarni AB: **Chemopreventive and chemotherapeutic actions of mTOR inhibitor in genetically defined head and neck squamous cell carcinoma mouse model.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(19):5304-5313.
197. Kourea HP, Nikolaou M, Tzelepi V, Adonakis G, Kardamakis D, Tsapanos V, Scopa CD, Kalofonos C, Decavalas G: **Expression of phosphorylated Akt, mTOR and MAPK in type I endometrial carcinoma: clinical significance.** *Anticancer Res* 2015, **35**(4):2321-2331.
198. Choi CH, Lee JS, Kim SR, Kim TJ, Lee JW, Kim BG, Bae DS: **Clinical significance of pmTOR expression in endometrioid endometrial carcinoma.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010, **153**(2):207-210.
199. No JH, Jeon YT, Park IA, Kang D, Kim JW, Park NH, Kang SB, Song YS: **Expression of mTOR protein and its clinical significance in endometrial cancer.** *Med Sci Monit* 2009, **15**(10):BR301-305.
200. Panasyuk G, Nemazanyy I, Zhyvoloup A, Filonenko V, Davies D, Robson M, Pedley RB, Waterfield M, Gout I: **mTORbeta splicing isoform promotes cell proliferation and tumorigenesis.** *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(45):30807-30814.
201. Perry J, Kleckner N: **The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins.** *Cell* 2003, **112**(2):151-155.
202. Groves MR, Barford D: **Topological characteristics of helical repeat proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 1999, **9**(3):383-389.
203. Knutson BA: **Insights into the domain and repeat architecture of target of rapamycin.** *J Struct Biol* 2010, **170**(2):354-363.
204. De Cicco M, Rahim MS, Dames SA: **Regulation of the Target of Rapamycin and Other Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases by Membrane Targeting.** *Membranes (Basel)* 2015, **5**(4):553-575.
205. Drenan RM, Liu X, Bertram PG, Zheng XF: **FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(1):772-778.
206. Liu X, Zheng XF: **Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(3):1073-1082.
207. Watanabe R, Wei L, Huang J: **mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets.** *J Nucl Med* 2011, **52**(4):497-500.

208. Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H, de Lange T: **Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases.** *Cell* 2007, **131**(7):1248-1259.
209. Mao JH, Kim IJ, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, Balmain A: **FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression.** *Science* 2008, **321**(5895):1499-1502.
210. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: **Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**(3):L429-438.
211. Sabri A, Steinberg SF: **Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure.** *Mol Cell Biochem* 2003, **251**(1-2):97-101.
212. Steinberg SF: **Structural basis of protein kinase C isoform function.** *Physiol Rev* 2008, **88**(4):1341-1378.
213. Hirai T, Chida K: **Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions.** *J Biochem* 2003, **133**(1):1-7.
214. Moscat J, Diaz-Meco MT: **The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters.** *EMBO Rep* 2000, **1**(5):399-403.
215. Ren J, Wang J, Wang Z, Wu J: **Structural and biochemical insights into the homotypic PB1-PB1 complex between PKCzeta and p62.** *Sci China Life Sci* 2014, **57**(1):69-80.
216. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, Barrette TR, Anstet MJ, Kincead-Beal C, Kulkarni P *et al*: **Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles.** *Neoplasia* 2007, **9**(2):166-180.
217. Donson AM, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Fleitz JM, Foreman NK: **Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines.** *J Neurooncol* 2000, **47**(2):109-115.
218. Seto KK, Andrulis IL: **Atypical protein kinase C zeta: potential player in cell survival and cell migration of ovarian cancer.** *PLoS One* 2015, **10**(4):e0123528.
219. Bamberger AM, Bamberger CM, Wald M, Kratzmeier M, Schulte HM: **Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells.** *Mol Cell Endocrinol* 1996, **123**(1):81-88.
220. Inoue J, Gohda J, Akiyama T: **Characteristics and biological functions of TRAF6.** *Adv Exp Med Biol* 2007, **597**:72-79.
221. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE: **TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta.** *Mol Cell* 2008, **31**(6):918-924.
222. Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, Hur L, Grabiner BC, Lin X, Darnay BG *et al*: **The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation.** *Science* 2009, **325**(5944):1134-1138.
223. Han F, Zhang L, Qiu W, Yi X: **TRAF6 promotes the invasion and metastasis and predicts a poor prognosis in gastric cancer.** *Pathol Res Pract* 2015.
224. Starczynowski DT, Lockwood WW, Delehouzee S, Chari R, Wegrzyn J, Fuller M, Tsao MS, Lam S, Gazdar AF, Lam WL *et al*: **TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF-kappaB pathways in human lung cancer.** *J Clin Invest* 2011, **121**(10):4095-4105.
225. Liu H, Tamashiro S, Baritaki S, Penichet M, Yu Y, Chen H, Berenson J, Bonavida B: **TRAF6 activation in multiple myeloma: a potential therapeutic target.** *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012, **12**(3):155-163.
226. Meng Q, Zheng M, Liu H, Song C, Zhang W, Yan J, Qin L, Liu X: **TRAF6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell.** *Mol Cell Biochem* 2012, **371**(1-2):177-186.
227. Peng Z, Shuangzhu Y, Yongjie J, Xinjun Z, Ying L: **TNF receptor-associated factor 6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of glioma cells.** *Mol Cell Biochem* 2013, **377**(1-2):87-96.

228. Sun H, Li X, Fan L, Wu G, Li M, Fang J: **TRAF6 is upregulated in colon cancer and promotes proliferation of colon cancer cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **53**:195-201.
229. Yao F, Han Q, Zhong C, Zhao H: **TRAF6 promoted the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma.** *Tumour Biol* 2013, **34**(5):3201-3207.
230. Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT: **p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway.** *Mol Cell* 2011, **44**(1):134-146.
231. Linares JF, Duran A, Yajima T, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco MT: **K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells.** *Mol Cell* 2013, **51**(3):283-296.
232. Garnock-Jones KP: **Panobinostat: first global approval.** *Drugs* 2015, **75**(6):695-704.
233. Khan O, La Thangue NB: **HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications.** *Immunol Cell Biol* 2012, **90**(1):85-94.
234. Ropero S, Esteller M: **The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer.** *Mol Oncol* 2007, **1**(1):19-25.
235. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K *et al*: **Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.** *Nat Genet* 2005, **37**(4):391-400.
236. Andreu-Vieyra CV, Berenson JR: **The potential of panobinostat as a treatment option in patients with relapsed and refractory multiple myeloma.** *Ther Adv Hematol* 2014, **5**(6):197-210.
237. Atadja P: **Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges.** *Cancer Lett* 2009, **280**(2):233-241.
238. Ocio EM, Vilanova D, Atadja P, Maiso P, Crusoe E, Fernandez-Lazaro D, Garayoa M, San-Segundo L, Hernandez-Iglesias T, de Alava E *et al*: **In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma.** *Haematologica* 2010, **95**(5):794-803.
239. Xiao W, Graham PH, Hao J, Chang L, Ni J, Power CA, Dong Q, Kearsley JH, Li Y: **Combination therapy with the histone deacetylase inhibitor LBH589 and radiation is an effective regimen for prostate cancer cells.** *PLoS One* 2013, **8**(8):e74253.
240. Xu M, Hong M, Xie H: **Histone deacetylase inhibitors induce human renal cell carcinoma cell apoptosis through p-JNK activation.** *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2013, **33**(10):1409-1415.
241. Baylin SB, Ohm JE: **Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(2):107-116.
242. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P *et al*: **Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(29):26729-26734.
243. Nome RV, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH: **Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death.** *Mol Cancer Ther* 2005, **4**(8):1231-1238.
244. Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G: **Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(2):114-120.
245. Robbins AR, Jablonski SA, Yen TJ, Yoda K, Robey R, Bates SE, Sackett DL: **Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin.** *Cell Cycle* 2005, **4**(5):717-726.
246. Pawlik TM, Keyomarsi K: **Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, **59**(4):928-942.

247. Lau KS, Haigis KM: **Non-redundancy within the RAS oncogene family: insights into mutational disparities in cancer.** *Mol Cells* 2009, **28**(4):315-320.
248. Karnoub AE, Weinberg RA: **Ras oncogenes: split personalities.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(7):517-531.
249. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratilas CA, Taylor BS, Chitale D, Halilovic E, Wilson M, Huberman K, Ricarte Filho JC *et al*: **Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer.** *Cancer Res* 2010, **70**(14):5901-5911.
250. Trahey M, McCormick F: **A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants.** *Science* 1987, **238**(4826):542-545.
251. Yang MH, Nickerson S, Kim ET, Liot C, Laurent G, Spang R, Philips MR, Shan Y, Shaw DE, Bar-Sagi D *et al*: **Regulation of RAS oncogenicity by acetylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(27):10843-10848.
252. Yang MH, Laurent G, Bause AS, Spang R, German N, Haigis MC, Haigis KM: **HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS.** *Mol Cancer Res* 2013, **11**(9):1072-1077.
253. You L, Nie J, Sun WJ, Zheng ZQ, Yang XJ: **Lysine acetylation: enzymes, bromodomains and links to different diseases.** *Essays Biochem* 2012, **52**:1-12.
254. Ciavarrà G, Zacksenhaus E: **Multiple pathways counteract cell death induced by RB1 loss: implications for cancer.** *Cell Cycle* 2011, **10**(10):1533-1539.
255. DeGregori J, Johnson DG: **Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis.** *Curr Mol Med* 2006, **6**(7):739-748.
256. Sherr CJ: **Cancer cell cycles.** *Science* 1996, **274**(5293):1672-1677.
257. Polager S, Ofir M, Ginsberg D: **E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes.** *Oncogene* 2008, **27**(35):4860-4864.
258. Yang Y, Fiskus W, Yong B, Atadja P, Takahashi Y, Pandita TK, Wang HG, Bhalla KN: **Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(17):6841-6846.
259. Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, Smith JE, Hembruff SL, Ha K, Atadja P *et al*: **Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(4):973-983.
260. Gandesiri M, Chakilam S, Ivanovska J, Benderska N, Ocker M, Di Fazio P, Feoktistova M, Gali-Muhtasib H, Rave-Frank M, Prante O *et al*: **DAPK plays an important role in panobinostat-induced autophagy and commits cells to apoptosis under autophagy deficient conditions.** *Apoptosis* 2012, **17**(12):1300-1315.
261. Oh M, Choi IK, Kwon HJ: **Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **369**(4):1179-1183.
262. Chen MY, Liao WS, Lu Z, Bornmann WG, Hennessey V, Washington MN, Rosner GL, Yu Y, Ahmed AA, Bast RC, Jr.: **Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy.** *Cancer* 2011, **117**(19):4424-4438.
263. Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y: **Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines.** *Anticancer Res* 2008, **28**(3A):1585-1591.
264. He G, Wang Y, Pang X, Zhang B: **Inhibition of autophagy induced by TSA sensitizes colon cancer cell to radiation.** *Tumour Biol* 2014, **35**(2):1003-1011.
265. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X: **Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(52):18030-18035.
266. Kroemer G, Jaattela M: **Lysosomes and autophagy in cell death control.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(11):886-897.

267. Al-Bari MA: **Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases.** *J Antimicrob Chemother* 2015, **70**(6):1608-1621.
268. van der Heijden JW, Dijkmans BA, Scheper RJ, Jansen G: **Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs--from bench to bedside.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007, **3**(1):26-34.
269. Lee SJ, Silverman E, Bargman JM: **The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis.** *Nat Rev Nephrol* 2011, **7**(12):718-729.
270. Brito-Zeron P, Siso-Almirall A, Bove A, Kostov BA, Ramos-Casals M: **Primary Sjogren syndrome: an update on current pharmacotherapy options and future directions.** *Expert Opin Pharmacother* 2013, **14**(3):279-289.
271. Hui B, Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Gu CY, Peng YF, Yang H, Liu WR, Shi GM, Fan J: **Proteasome inhibitor interacts synergistically with autophagy inhibitor to suppress proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 2012, **118**(22):5560-5571.
272. Ding ZB, Hui B, Shi YH, Zhou J, Peng YF, Gu CY, Yang H, Shi GM, Ke AW, Wang XY *et al*: **Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(19):6229-6238.
273. Gao L, Song JR, Zhang JW, Zhao X, Zhao QD, Sun K, Deng WJ, Li R, Lv G, Cheng HY *et al*: **Chloroquine promotes the anticancer effect of TACE in a rabbit VX2 liver tumor model.** *Int J Biol Sci* 2013, **9**(4):322-330.
274. Liang X, Tang J, Liang Y, Jin R, Cai X: **Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells.** *Cell Biosci* 2014, **4**(1):10.
275. Ratikan JA, Sayre JW, Schae D: **Chloroquine engages the immune system to eradicate irradiated breast tumors in mice.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013, **87**(4):761-768.
276. Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, Naidu SR: **Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation.** *J Invest Dermatol* 2013, **133**(9):2247-2254.
277. Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA: **Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent.** *Neuro Oncol* 2010, **12**(5):473-481.
278. Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J: **Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells.** *Bioorg Med Chem* 2006, **14**(9):3218-3222.
279. Jiang PD, Zhao YL, Deng XQ, Mao YQ, Shi W, Tang QQ, Li ZG, Zheng YZ, Yang SY, Wei YQ: **Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer.** *Biomed Pharmacother* 2010, **64**(9):609-614.
280. Rahim R, Strobl JS: **Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells.** *Anticancer Drugs* 2009, **20**(8):736-745.
281. Boya P, Kroemer G: **Lysosomal membrane permeabilization in cell death.** *Oncogene* 2008, **27**(50):6434-6451.
282. Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK: **Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy.** *Cancer Res* 2012, **72**(17):4294-4299.
283. Zou Z, Yuan Z, Zhang Q, Long Z, Chen J, Tang Z, Zhu Y, Chen S, Xu J, Yan M *et al*: **Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells.** *Autophagy* 2012, **8**(12):1798-1810.
284. Sotelo J, Briceno E, Lopez-Gonzalez MA: **Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Ann Intern Med* 2006, **144**(5):337-343.

285. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, Houghton JA, Huang P, Giles FJ, Cleveland JL: **Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance.** *Blood* 2007, **110**(1):313-322.
286. Xu CX, Zhao L, Yue P, Fang G, Tao H, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Khuri FR, Sun SY: **Augmentation of NVP-BEZ235's anticancer activity against human lung cancer cells by blockage of autophagy.** *Cancer Biol Ther* 2011, **12**(6):549-555.
287. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, Sone K, Inaba K, Ikeda Y, Miyasaka A, Kashiyama T, Tanikawa M, Arimoto T *et al*: **The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition.** *Gynecol Oncol* 2015, **137**(3):538-545.
288. Hu T, Li P, Luo Z, Chen X, Zhang J, Wang C, Chen P, Dong Z: **Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo.** *Oncol Rep* 2016, **35**(1):43-49.
289. Park D, Lee Y: **Biphasic activity of chloroquine in human colorectal cancer cells.** *Dev Reprod* 2014, **18**(4):225-231.
290. Wang J, Wu GS: **Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells.** *The Journal of biological chemistry* 2014, **289**(24):17163-17173.
291. Tietze C, Schlesinger P, Stahl P: **Chloroquine and ammonium ion inhibit receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent inhibition of receptor recycling.** *Biochem Biophys Res Commun* 1980, **93**(1):1-8.
292. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR: **Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD).** *Diabetes Care* 2012, **35**(6):1364-1379.
293. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK: **Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline.** *J Clin Endocrinol Metab* 2013, **98**(12):4565-4592.
294. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD: **Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients.** *BMJ* 2005, **330**(7503):1304-1305.
295. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM: **New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2009, **32**(9):1620-1625.
296. Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ: **Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16.** *Diabetes Care* 2010, **33**(2):322-326.
297. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F, Nicolucci A: **Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review.** *PLoS One* 2013, **8**(8):e71583.
298. Pollak MN: **Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning.** *Cancer Discov* 2012, **2**(9):778-790.
299. Febbraro T, Lengyel E, Romero IL: **Old drug, new trick: repurposing metformin for gynecologic cancers?** *Gynecol Oncol* 2014, **135**(3):614-621.
300. Stine JE, Bae-Jump V: **Metformin and gynecologic cancers.** *Obstet Gynecol Surv* 2014, **69**(8):477-489.
301. Zhang Y, Liu H, Yang S, Zhang J, Qian L, Chen X: **Overweight, obesity and endometrial cancer risk: results from a systematic review and meta-analysis.** *Int J Biol Markers* 2014, **29**(1):e21-29.
302. Rutanen EM: **Insulin-like growth factors in endometrial function.** *Gynecol Endocrinol* 1998, **12**(6):399-406.

303. Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K, Murakami T: **Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis.** *Cancer Cell Int* 2014, **14**:53.
304. Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD: **Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro.** *Cell Cycle* 2009, **8**(6):909-915.
305. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F: **The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level.** *Oncogene* 2008, **27**(25):3576-3586.
306. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM: **Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**(47):7192-7198.
307. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, Bruchim I: **In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer.** *Gynecol Oncol* 2008, **110**(2):246-250.
308. Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, Kitazono-Saitoh M, Kitamura A, Chiba T, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I *et al*: **Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines.** *Oncol Rep* 2012, **28**(1):8-14.
309. Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y *et al*: **The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(3):549-560.
310. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB: **Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth.** *Cancer Res* 2007, **67**(14):6745-6752.
311. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, Gounon P, Allegra M, Bertolotto C, Bereder JM *et al*: **Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms.** *Cell Death Dis* 2011, **2**:e199.
312. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X: **Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(1):223-228.
313. Hanna RK, Zhou C, Malloy KM, Sun L, Zhong Y, Gehrig PA, Bae-Jump VL: **Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway.** *Gynecol Oncol* 2012, **125**(2):458-469.





**ANEXO**

---

---



**ANEXO:** Valores obtenidos de la cuantificación de la expresión de proteínas de la ruta de autofagia en muestras tumorales de pacientes con carcinoma de endometrio. Orden decreciente y por tipo tumoral. EGI, II III: carcinoma endometriode de grados I, II y III; S: carcinoma seroso; Cs: carcinosarcoma; Mx: carcinoma mixto; CC: carcinoma de células claras. Los valores se muestran como el ratio proteína/ $\beta$ -actina y normalizado respecto al control.

Tabla I. Expresión cuantificada de la proteína p62.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	56	EGI	352,00
	58	EGI	325,11
	45	EGI	235,01
	40	EGI	158,23
	54	EGI	39,55
	23	EGI	23,02
	48	EGI	18,08
	60	EGI	17,50
	35	EGI	9,27
	55	EGI	7,95
	3	EGI	4,28
	15	EGI	4,13
	22	EGI	2,93
	5	EGI	2,76
	2	EGI	2,73
	7	EGI	2,48
	38	EGI	2,40
	21	EGI	1,98
	20	EGI	1,94
	17	EGI	1,72
	53	EGI	1,21
	16	EGI	0,63
	41	EGI	0,09
	36	EGI	0,05
	27	EGII	96,86
	57	EGII	88,20
	34	EGII	78,33
	10	EGII	32,93
	18	EGII	25,92
	33	EGII	17,22
	12	EGII	16,33
	42	EGII	11,35
	6	EGII	6,48
9	EGII	1,44	
29	EGII	1,19	
51	EGII	1,15	
47	EGII	0,86	
26	EGII	0,66	
32	EGII	0,65	
19	EGII	0,34	
28	EGII	0,05	
Tumores de alto grado	39	EGIII	126,59
	44	EGIII	134,49
	52	EGIII	12,98
	24	EGIII	6,59
	13	EGIII	1,93
	50	S	88,24
	8	S	9,43
	37	S	7,67
	31	S	0,83
	11	S	0,39
	46	CS	381,90
	30	Cs	70,28
	4	Cs	69,05
	1	Cs	39,11
	25	Cs	1,99
	14	CS	0,62
	43	Cs	0,44
49	MX	124,06	
59	CC	95,92	
Control	-	-	100

Tabla II. Expresión cuantificada de la proteína LC3B-II.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
	56	EGI	304,53
	58	EGI	202,74
	17	EGI	170,50
	3	EGI	163,10
	60	EGI	131,87
	20	EGI	125,84
	22	EGI	125,56
	23	EGI	124,87
	21	EGI	122,47
	35	EGI	121,07
	7	EGI	100,06
	41	EGI	68,89
	53	EGI	65,87
	40	EGI	64,21
	16	EGI	56,13
	36	EGI	38,59
	5	EGI	21,37
	2	EGI	20,74
	15	EGI	14,20
	45	EGI	10,78
	48	EGI	9,67
	38	EGI	6,98
	55	EGI	5,77
	54	EGI	3,90
	47	EGII	342,57
	57	EGII	331,80
	27	EGII	188,31
	6	EGII	172,94
	18	EGII	154,53
	19	EGII	150,37
	26	EGII	148,43
	51	EGII	124,67
	29	EGII	106,65
	28	EGII	105,13
	34	EGII	98,29
	9	EGII	73,48
	32	EGII	67,74
	12	EGII	67,21
	42	EGII	52,15
	10	EGII	10,63
	33	EGII	0,49
	13	EGIII	221,65
	24	EGIII	143,79
	39	EGIII	73,11
	44	EGIII	51,95
	52	EGIII	1,68
	31	S	113,53
	37	S	102,86
	50	S	49,12
	11	S	44,88
	8	S	23,74
	14	Cs	295,76
	30	Cs	158,52
	25	Cs	148,49
	4	Cs	81,39
	1	Cs	69,03
	46	Cs	41,72
	43	Cs	2,66
	49	MX	236,33
	59	CC	52,93
Control	-	-	100

Tumores de bajo grado

Tumores de alto grado

Tabla III. Expresión cuantificada de la proteína Beclin1.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	45	EGI	308,94
	58	EGI	140,89
	40	EGI	127,20
	22	EGI	126,95
	53	EGI	114,68
	35	EGI	112,88
	17	EGI	106,49
	23	EGI	85,35
	41	EGI	83,01
	36	EGI	69,78
	38	EGI	63,44
	7	EGI	49,20
	15	EGI	48,51
	60	EGI	42,10
	56	EGI	35,88
	54	EGI	31,30
	48	EGI	27,57
	21	EGI	19,88
	3	EGI	19,54
	55	EGI	16,77
	2	EGI	13,66
	16	EGI	6,09
	20	EGI	5,03
	5	EGI	3,34
	10	EGII	245,32
	47	EGII	236,89
	34	EGII	172,39
	9	EGII	159,92
	51	EGII	154,23
	12	EGII	112,26
	27	EGII	101,77
	32	EGII	99,12
29	EGII	98,33	
19	EGII	79,96	
33	EGII	74,73	
42	EGII	71,28	
28	EGII	70,05	
18	EGII	61,41	
57	EGII	44,93	
6	EGII	42,50	
26	EGII	0,67	
Tumores de alto grado	44	EGIII	155,00
	39	EGIII	82,64
	24	EGIII	64,10
	52	EGIII	21,58
	13	EGIII	14,40
	37	S	131,36
	8	S	111,46
	31	S	103,22
	50	S	96,70
	11	S	93,05
	30	CS	152,97
	1	CS	127,76
	4	CS	113,21
	46	CS	112,52
	43	CS	52,26
14	CS	46,84	
25	CS	2,60	
49	MX	100,53	
59	CC	124,82	
Control	-	-	100

Tabla IV. Expresión cuantificada de la proteína PIK3CA.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	23	EGI	110,82
	2	EGI	105,17
	15	EGI	87,62
	22	EGI	78,71
	56	EGI	66,64
	17	EGI	57,82
	20	EGI	53,07
	21	EGI	51,09
	5	EGI	43,94
	54	EGI	41,36
	55	EGI	29,64
	58	EGI	16,91
	48	EGI	13,58
	16	EGI	11,72
	53	EGI	10,49
	35	EGI	10,47
	45	EGI	6,86
	41	EGI	5,33
	60	EGI	4,90
	36	EGI	3,74
	7	EGI	3,05
	3	EGI	1,90
	38	EGI	1,65
	40	EGI	1,58
	33	EGII	122,83
	9	EGII	118,41
	26	EGII	115,31
	34	EGII	102,09
	12	EGII	100,21
	10	EGII	74,87
	29	EGII	63,04
	19	EGII	59,77
	32	EGII	48,51
18	EGII	40,68	
28	EGII	33,59	
57	EGII	17,87	
27	EGII	7,17	
47	EGII	6,03	
51	EGII	1,23	
6	EGII	1,08	
Tumores de alto grado	42	EGII	0,55
	24	EGIII	68,58
	44	EGIII	61,70
	52	EGIII	25,51
	39	EGIII	10,66
	13	EGIII	8,60
	50	S	298,30
	8	S	49,73
	11	S	41,45
	31	S	6,83
	37	S	1,09
	25	Cs	307,99
	4	Cs	44,70
	1	Cs	30,05
	14	Cs	15,58
46	Cs	4,97	
43	Cs	1,34	
30	Cs	1,03	
49	MX	100,49	
59	CC	43,13	
Control	-	-	100

Tabla V. Expresión cuantificada de la proteína mTOR-001.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	45	EGI	156,85
	48	EGI	154,41
	56	EGI	74,81
	54	EGI	50,28
	15	EGI	47,01
	58	EGI	42,35
	17	EGI	32,20
	7	EGI	27,48
	53	EGI	24,65
	35	EGI	18,38
	40	EGI	15,40
	41	EGI	12,38
	55	EGI	9,56
	16	EGI	9,02
	5	EGI	6,01
	3	EGI	5,04
	2	EGI	4,74
	36	EGI	4,11
	60	EGI	3,33
	23	EGI	3,05
	38	EGI	2,04
	22	EGI	1,72
	20	EGI	1,53
	21	EGI	1,47
	19	EGII	116,42
	51	EGII	77,79
	28	EGII	67,56
	10	EGII	63,71
	9	EGII	47,47
	42	EGII	35,57
	27	EGII	30,65
	34	EGII	30,06
	12	EGII	29,00
33	EGII	13,45	
29	EGII	7,69	
47	EGII	5,51	
32	EGII	4,58	
18	EGII	3,82	
57	EGII	0,88	
26	EGII	0,38	
Tumores de alto grado	6	EGII	0,38
	44	EGIII	25,12
	52	EGIII	23,81
	39	EGIII	9,66
	13	EGIII	3,69
	24	EGIII	1,46
	50	S	187,93
	31	S	40,32
	37	S	20,46
	11	S	5,86
	8	S	0,23
	4	Cs	102,58
	46	Cs	63,37
	14	Cs	17,87
	25	Cs	2,23
30	Cs	1,21	
43	Cs	0,31	
1	Cs	0,41	
49	MX	207,44	
59	CC	17,97	
Control	-	-	100

Tabla VI. Expresión cuantificada de la proteína PKCz.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	5	EGI	157,38
	60	EGI	148,51
	36	EGI	136,66
	58	EGI	131,18
	22	EGI	112,08
	2	EGI	110,86
	23	EGI	109,64
	15	EGI	96,49
	38	EGI	91,96
	35	EGI	89,68
	3	EGI	88,24
	53	EGI	84,30
	54	EGI	81,61
	7	EGI	77,62
	56	EGI	70,86
	48	EGI	58,56
	20	EGI	52,83
	16	EGI	52,26
	17	EGI	48,12
	40	EGI	47,19
	55	EGI	45,34
	41	EGI	29,88
	45	EGI	16,21
	21	EGI	7,30
	57	EGII	189,94
	26	EGII	119,75
	33	EGII	111,72
	34	EGII	107,45
	10	EGII	94,23
	28	EGII	94,05
	32	EGII	93,52
	6	EGII	86,52
42	EGII	76,40	
12	EGII	69,85	
47	EGII	60,89	
9	EGII	58,64	
18	EGII	55,51	
19	EGII	50,61	
29	EGII	28,83	
51	EGII	21,75	
27	EGII	1,03	
Tumores de alto grado	24	EGIII	107,66
	52	EGIII	90,57
	44	EGIII	73,84
	13	EGIII	47,22
	39	EGIII	10,38
	31	S	108,65
	50	S	90,78
	11	S	85,75
	37	S	82,48
	8	S	81,87
	1	Cs	107,28
	46	Cs	100,50
	4	Cs	99,21
	14	Cs	93,44
	30	Cs	86,94
25	Cs	3,02	
43	Cs	1,58	
49	MX	87,89	
59	CC	145,75	
Control	-	-	100



Tabla VII. Expresión cuantificada de la proteína TRAF6.

GRADO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN
Tumores de bajo grado	40	EGI	317,13
	56	EGI	201,58
	53	EGI	189,86
	2	EGI	182,36
	7	EGI	169,50
	41	EGI	154,18
	54	EGI	152,00
	36	EGI	141,68
	23	EGI	137,31
	45	EGI	129,87
	3	EGI	129,33
	17	EGI	111,12
	20	EGI	100,00
	35	EGI	100,00
	38	EGI	100,00
	58	EGI	99,45
	22	EGI	93,31
	48	EGI	78,58
	55	EGI	74,36
	21	EGI	60,76
	5	EGI	58,07
	15	EGI	43,05
	16	EGI	20,93
	60	EGI	14,08
	47	EGII	334,69
	28	EGII	193,68
	27	EGII	188,53
	57	EGII	137,88
	10	EGII	133,37
	34	EGII	128,60
	12	EGII	100,00
	9	EGII	93,45
6	EGII	89,75	
42	EGII	56,17	
33	EGII	54,58	
18	EGII	42,27	
19	EGII	21,81	
26	EGII	20,50	
29	EGII	19,80	
51	EGII	9,87	
32	EGII	0,89	
Tumores de alto grado	39	EGIII	260,78
	52	EGIII	126,62
	44	EGIII	91,73
	24	EGIII	22,75
	13	EGIII	3,74
	50	S	163,15
	11	S	100,00
	37	S	100,00
	31	S	89,90
	8	S	5,89
	1	Cs	131,11
	4	Cs	100,03
	25	Cs	100,01
	46	Cs	100,00
	43	Cs	37,03
	30	Cs	6,98
	14	Cs	1,91
49	MX	143,34	
59	CC	89,81	
Control	-	-	100

