

Universitat de Lleida

## Oncogenes y genes supresores de tumor en carcinoma de endometrio

Ana Velasco Sánchez

Dipòsit Legal: L.285-2013

<http://hdl.handle.net/10803/110545>

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

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

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



Institut de Recerca  
Biomèdica de Lleida



Universitat de Lleida  
Departament de Ciències  
Mèdiques Bàsiques

# ***Oncogenes y Genes Supresores de Tumor en Cáncer de Endometrio***

**ANA VELASCO SANCHEZ  
IRB-LLEIDA  
LLEIDA 2012**



Dedicado a mis amores: Carlos y Carlitos Mira



## CUANDO ERA MAS JOVEN

Siento una angustia, una tristeza, unos sobresaltos y unas congojas  
que no sé como vivo.

Tengo constantemente un ansia de no sé qué  
que me hace suspirar y llorar por los rincones como un chiguillo.  
A veces el aire se me antoja lleno de enemigos invisibles que me persiguen  
y me quieren matar....

Y yo huyo de ellos desalentado.

Huir del aire! ¿No cree usted que eso es estar loco?

Ni dormido ni despierto es mía mi voluntad,  
las lágrimas están siempre a flor de mis ojos  
y del llanto salto, sin pensar, a una risa sin alegría que a mí mismo me aterra.

El sol no tiene luz para mí  
y la vida, la vida ni encanto ni atractivo alguno.

Por ejemplo, cruza volando un pájaro  
y siento con tal fuerza que sea mío  
que me parece que la vida entera se me va tras él  
y, si lo tuviera en mis manos,

seguramente sin estimarlo en nada, yo lo volvería a echar a volar.

Y así vivo, mejor dicho, así muero en medio de las risas de cuantos me rodean.

Y todos viven y se ríen.

Y solo yo me muero llorando.

Francisco Velasco de los Reyes

# *Agradecimientos*

---



Después de tantos años (llegué a Lleida en el año 2000 para hacer la tesis...) por fin me encuentro escribiendo el apartado de agradecimientos, que se suele dejar para el final, justo antes de imprimir el manuscrito. Pero como mas vale tarde que nunca, sin haber pensado en ningún momento dejar el tema, aquí estoy y ahí queda eso.

Gracias a todos.

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia “el jefe”, gracias por darme la oportunidad de subir al tren de tu grupo, desde entonces he avanzado a toda máquina.

Dr. Xavier Dolçet “chavi”, es un privilegio tener tan cerca a personas como tú, de las que se puede aprender tanto, te aprecio como amigo y te admiro como investigador, lo sepas.

Paco y Ana Mari “papá y mamá”, ni que decir tiene que sin vosotros yo no sería nada de lo que soy pero un gran aplauso por una peculiar pareja que ha dado (y lo sigue dando) todo, todo por sus hijos, cueste lo que cueste.

Sera y Rouse, gracias por echar un vistazo objetivo y crítico a este trabajo.

Gracias a todos aquellos que colaboraron en la génesis de este trabajo y que han quedado plasmados en la autoría de los artículos publicados, en especial a María Santacana y Judit Pallarés.

Todos los amigos, tantos momentos compartidos, buenos, malos, anodinos... Gentes del CMB, del IRB y de la “T.I.A”. Sin nombres, así no me dejo a nadie.

Compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del HUAV, secretarias, técnicos, residentes, doctores... tantas horas juntos, mano a mano, pues se crean vínculos afectivos, también sin nombres, así no me dejo a nadie.



# *Resumen*

---



El objetivo principal de este trabajo ha sido la identificación de alteraciones moleculares que participen de manera significativa en el desarrollo y la progresión del cáncer de endometrio, con el propósito de añadir mas claves para el descubrimiento de nuevas dianas de diagnóstico y terapias individuales contra esta patología.

El trabajo se ha centrado en el estudio de modificaciones en el ADN de las células que forman el tejido tumoral en una serie de pacientes con carcinoma endometrial, en concreto, en el análisis mutacional de los genes PIK3CA y FGFR2 y el análisis de hipermetilación del promotor de los genes RASSF2A y SPRY2, elementos que forman parte de importantes vías de transducción de señales implicadas principalmente en procesos de crecimiento y diferenciación celular.

Por un lado, hemos advertido cierto grado de variabilidad en el patrón de expresión de los genes estudiados en los tejidos tumoral y no tumoral y esas diferencias de expresión son, por una parte, debidas a la existencia de hipermetilación en las regiones promotoras de los genes implicados y, por otra, a la presencia de mutaciones en regiones del gen que codifican dominios clave para la función de la proteína en la célula.

En concreto, tras el análisis de la expresión inmunohistoquímica de RASSF1A y la presencia o ausencia de metilación en la zona promotora del gen RASSF1A se detectaron tumores con niveles de expresión reducidos y presencia de hipermetilación en el promotor, ambos fenómenos asociados de manera estadísticamente significativa. Lo mismo ocurre, aunque en un grado distinto, con la expresión de SPRY2 en algunos tumores en asociación con la presencia de hipermetilación en el promotor del gen. A través de este análisis hemos descubierto que la expresión de SPRY2 presenta variabilidad en las glándulas endometriales de los tejidos no tumorales a lo largo del ciclo menstrual.

Por otro lado hemos visto como el gen PIK3CA se encuentra frecuentemente mutado en las células que forman los tumores de carcinoma de endometrio y que, además, es un suceso que coincide con la presencia de mutaciones en el gen PTEN. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones en el gen FGFR2 se ha mostrado baja aunque su



expresión a nivel inmunohistoquímico refleja diferencias entre carcinoma de tipo endometriode y no endometriode.

Por ultimo, añadir una revisión de uno de los fenómenos que ocurren de manera mas frecuente durante la formación y el progreso de los tumores en carcinoma de endometrio: el concepto de “pérdida de heterocigosidad”. En este trabajo hemos considerado primordial incluir un obra en la que se realiza una incursión a los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce la pérdida de heterocigosidad, asi como los métodos que se utilizan para su detección y el significado de algunos patrones de pérdida de heterocigosidad en determinadas regiones cromosómicas en carcinoma de endometrio.

The main point of this study was the identification of molecular alterations that participate in the development and progression of endometrial cancer, in order to add more keys to the discovery of new targets for diagnosis and therapies against this disease.

The work has been focused on the study of molecular alterations of DNA from tumour tissues in a series of endometrial carcinoma patients, above all, mutational analysis of PIK3CA and FGFR2 genes and analysis of promoter hyper methylation of SPRY2 and RASSF2A genes, together forming part of signal transduction pathways that are involved in processes of growth and cell differentiation.

To begin with, we noticed some variability in the gene expression pattern examined between tumour and normal tissue, and these differences are partly due to hyper methylation in promoter regions at the involved genes. Likewise, mutations in gene regions encoding key protein domains in the cell are also a factor that modifies the gene expression pattern between tumour and normal tissue.

In particular, after analysing the immunohistochemical expression of RASSF1A and the presence or absence of methylation in the RASSF1A gene promoter we detected tumours with low expression levels and promoter hyper methylation. The same applies, albeit in a different degree, with SPRY2 expression in some tumours in association with the presence of gene promoter hyper methylation. Through this analysis we found some SPRY2 expression variability in endometrial glands from non-tumour tissues throughout the menstrual cycle.

On the other hand we have seen that the PIK3CA gene is frequently mutated in tumour cells from endometrial carcinoma, and this is also a PTEN gene mutation coincident event. However, FGFR2 gene mutation ratio has shown to be low although immunohistochemical expression reflects differences between endometrioid endometrial carcinoma and no-endometrioid type.

Finally, we wanted to add a review of one of the phenomena, which occurs more frequently during the formation and progress of tumours in endometrial carcinoma: LOH "loss of heterozygosity". We have considered essential include a review work

## Resumen

about the molecular mechanisms through which loss of heterozygosity is produced, the methods used in their detection and significance of some patterns of loss of heterozygosity in specific chromosomal regions in endometrial carcinoma.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la identificació d'alteracions moleculars que participin de manera significativa al desenvolupament i la progressió del càncer d'endometri, amb el propòsit d'afegir més claus pel descobriment de noves dianes de diagnosi i teràpies individuals contra aquesta patologia.

El treball ha estat centrat en l'estudi de modificacions en l'ADN de les cèl·lules que formen el teixit tumoral en una sèrie de pacients amb carcinoma endometrial, en concret, en l'anàlisi mutacional del gens PIK3CA i FGFR2 i l'anàlisi de hipermetilació del promotor dels gens RASSF1A i SPRY2, elements que formen part d'importants vies de transducció de senyals implicades principalment en processos de creixement i diferenciació cel·lular.

En primer lloc hem advertit cert grau de variabilitat en el patró d'expressió dels gens estudiats entre els teixits tumoral i no tumoral i aquestes diferències d'expressió són, en part, degudes a l'existència de hipermetilació en les regions promotores dels gens implicats. Així mateix, la presència de mutacions en regions gèniques que codifiquen parts de la proteïna claus per la seva funció a la cèl·lula, és també un factor que modifica el patró d'expressió entre els teixits tumoral i no tumoral.

En concret, després de l'anàlisi immunohistoquímic de l'expressió de RASSF1A i la presència o absència de metilació a la zona promotora del gen RASSF1A, es van detectar tumors amb nivells d'expressió reduïts i presència de hipermetilació en el promotor, ambdós fenòmens associats de manera estadísticament significativa. El mateix passa, encara que amb diferent grau, amb l'expressió de SPRY2 en alguns tumors en associació amb la presència de hipermetilació en el promotor del gen. A través d'aquest anàlisi hem descobert que l'expressió de SPRY2 presenta variabilitat en les glàndules endometrials dels teixits no tumorals al llarg del cicle menstrual.

D'altra banda hem vist com el gen PIK3CA es troba freqüentment mutat en les cèl·lules que formen els tumors de carcinoma d'endometri i coincideix amb la presència de mutacions en el gen PTEN. No obstant això, la freqüència de mutacions en el gen FGFR2 s'ha mostrat baixa encara que la seva expressió a nivell immunohistoquímic reflecteix diferències entre carcinoma de tipus endometrioides i no endometrioides.

Finalment, afegir una revisió d'un dels fenòmens més freqüent en la formació i el

progrés dels tumors en carcinoma d'endometri: el concepte de "pèrdua de heterozigositat". En aquest treball hem considerat primordial incloure una obra en que es realitza una incursió als mecanismes moleculars a través dels quals es produeix la pèrdua de heterozigositat, així com els mètodes que s'utilitzen en la seva detecció i el significat d'alguns patrons de pèrdua de heterozigositat en determinades regions cromosòmiques en carcinoma d'endometri.

# *Índice*

---



<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<i>I UTERO</i>	7
<i>II ENDOMETRIO</i>	7
II.1 Endometrio proliferativo (días 6-14)	8
II.2 Endometrio secretor (días 15-18)	8
II.3 Endometrio descamativo (días 1-5)	8
II.4 Endometrio gestacional	9
II.5 Endometrio atrófico	9
<i>III Ciclo endometrial</i>	9
<i>IV CARCINOMA DE ENDOMETRIO</i>	10
<i>V ALTERACIONES MOLECULARES EN CANCER DE ENDOMETRIO</i>	12
<i>VI ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES</i>	14
VI.1 ONCOGENES	14
VI.1.1 ACTIVACIÓN DE LOS ONCOGENES	16
VI.1.1.a Activación oncogénica por mutación	17
VI.1.1.b Activación oncogénica por amplificación	17
VI.1.1.c Activación oncogénica por translocación	19
VI.1.2 ONCOGENES EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO	20
VI.1.2.a K-RAS	20
VI.1.2.b PIK3CA	22
VI.1.2.c B-RAF	26
VI.1.2.d HER2/NEU (ERBB2)	27
VI.1.2.e CTNNB1	28
VI.1.2.f AKT	28
VI.1.2.g FGFR2	30
VI.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES	32
VI.2.1 ALTERACIONES DE LOS GST	32
VI.2.2 TSG EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO	33
VI.2.2.a RASSF1A	33
VI.2.2.b SPRY2	34
VI.2.2.c TP53	36
VI.2.2.d PTEN	38
<i>VII INESTABILIDAD GENOMICA</i>	40
VII.1 ANEUPLOIDIA CROMOSOMICA	40
VII.2 INESTABILIDAD DE MICROSATELITES ( <i>Microsatellite Instability</i> )	42
VII.3 HIPERMETILACIÓN DE PROMOTORES	43



<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>47</b>
<b>Resultados</b>	<b>51</b>
1. <i>LA HIPERMETILACION DEL PROMOTOR DE RASSF1A Y LA DISMINUCION DE SU EXPRESION SON ALTERACIONES FRECUENTES EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO</i>	53
2. <i>LA HIPERMETILACION DEL PROMOTOR Y LA EXPRESION DEL GEN SPROUTY2 EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO</i>	65
3. <i>LAS MUTACIONES DE LOS GENES PIK3CA Y PTEN COEXISTEN CON FRECUENCIA EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO</i>	77
4. <i>ALTERACIONES DEL GEN FGFR2 EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO</i>	87
<b>Discusión</b>	<b>89</b>
1. <i>La expresión de RASSF1A aparece disminuida en carcinoma de endometrio</i>	103
2. <i>RASSF1A podría ser un indicador de la agresividad de los tumores en pacientes de carcinoma de endometrio</i>	104
3. <i>La expresión de SPRY2 aparece disminuida en carcinoma de endometrio</i>	106
4. <i>SPRY2 como gen supresor de tumores</i>	107
5. <i>La metilación en promotor de SPRY2 es un hecho frecuente en carcinoma de endometrio</i>	108
6. <i>Las alteraciones en la vía de señalización PI3K son un hecho frecuente en carcinoma de endometrio</i>	109
7. <i>Las mutaciones en el gen PIK3CA pueden tener un efecto aditivo a la inactivación monoalélica de PTEN en carcinoma de endometrio</i>	111
8. <i>PIK3CA y KRAS ejercen funciones mutuamente excluyentes en carcinoma de endometrio</i>	112
9. <i>FGFR2 tiene una función inhibitoria del crecimiento en endometrio normal</i>	113
10. <i>Rol oncogénico de FGFR2 en Carcinoma de Endometrio</i>	116
11. <i>FGFR2 como candidato a diana terapéutica contra el cáncer</i>	117
<b>Conclusiones</b>	<b>119</b>
<b>Anexo</b>	<b>123</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>139</b>

# *Introducción*

---



## I ÚTERO

La matriz o útero es un órgano intra-pélvico accesorio de la reproducción sexual, impar, vacío, periforme, de pared muscular, de unos 8 cm de longitud, 5 cm de amplitud en el extremo superior y de unos 2,5 cm de grueso. En condiciones normales tiene un peso de aproximadamente 50 gramos pero puede sufrir cambios importantes a lo largo de las gestaciones. La principal función del útero es albergar al feto, protegerlo durante el embarazo y liberar al recién nacido en el momento del parto. El útero esta organizado en tres capas celulares: el perimetrio o capa serosa externa, el miometrio o capa muscular y la capa mucosa interna o endometrio (figura 1).

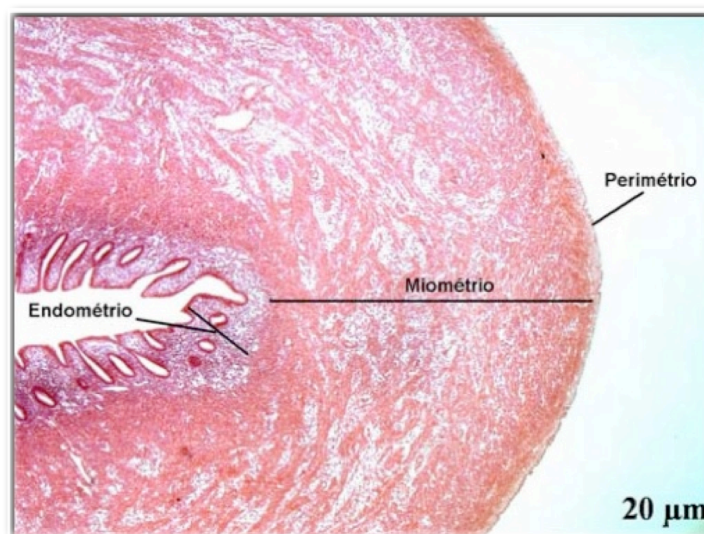


Fig 1. Histología del útero

## II ENDOMETRIO

El endometrio es la mucosa que cubre el interior del útero y consiste en: a) un epitelio simple, prismático con o sin cilios (dependiendo de la fase del ciclo menstrual); b) una lámina basal en la que se ubican las glándulas tubulares uterinas, éstas son simples y ligeramente ramificadas pero llegan a adquirir una complejidad remarcable en determinadas fases del ciclo menstrual y c) un estroma rico en tejido conjuntivo y altamente vascularizado aunque pobre en fibras nerviosas.

La función del endometrio es la de alojar al cigoto o blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación. Presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual en preparación para la implantación del embrión humano y es el lugar donde se desarrolla la placenta.

Dado el carácter dinámico de este tejido, como consecuencia de las variaciones de los niveles hormonales hipofisarios ováricos, se diferencian diversos tipos de endometrio según el estado del ciclo menstrual: endometrio proliferativo (días 6-14), endometrio secretor (días 15-28), endometrio en fase descamativa (días 1-5), endometrio gestacional, y endometrio atrófico.

### **II.1 Endometrio proliferativo (días 6-14)**

Tejido endometrial que tiene la capacidad de crecer y aumentar de grosor a consecuencia de la estimulación hormonal por estrógenos, ya que paralelamente a esta fase se desarrollan en el ovario los folículos ováricos que secretaran e incrementaran la concentración de estrógenos en el torrente sanguíneo. El endometrio proliferativo está constituido por glándulas endometriales rectilíneas delimitadas por células que presentan una marcada pseudo-estratificación nuclear y alta actividad mitótica. El estroma es predominantemente denso, compuesto por células con escaso citoplasma.

### **II.2 Endometrio secretor (días 15-28)**

Tejido endometrial presente durante la fase de secreción del ciclo menstrual, que corresponde a la fase del ciclo posterior a la ovulación.

Constituido por glándulas endometriales muy serradas con secreción luminal y estroma con transformación pre-decidual que puede llegar a un grosor de unos 8 mm. El tejido endometrial en esta fase presenta un fenómeno peculiar que consiste en la aparición de vacuolas de glicógeno y mucopolisacáridos en el polo basal de las células. Durante esta fase las vacuolas se dirigen a la luz de la glándula donde son secretadas, hecho provocado por el aumento en la concentración de progesterona secretada por el cuerpo lúteo. En este tipo de endometrio se da la fase llamada ‘ventana de implantación del blastocisto’, que se extiende del día 20 al 24 del ciclo y donde ocurre la máxima receptividad endometrial. El denso estroma al principio se vuelve adenomatoso y aparecen las llamadas arteriolas espirales. Las células del estroma aumentan su citoplasma y adoptan forma cúbica.

### **II.3 Endometrio descamativo (días 1-5)**

Las modificaciones endometriales anteriormente descritas tienen como objetivo final obtener un buen sustrato para la nidificación del blastocisto. Si el oocito no ha sido fecundado se da la descamación menstrual del endometrio. Histológicamente, la descamación no es uniforme. En su inicio se observa una cierta disociación estructural y una marcada infiltración leucocitaria, conjuntamente con hemorragia y signos de necrosis. La fase descamativa es la fase en la cual se inicia el ciclo menstrual y comprende desde día 1 al día 5. Como consecuencia de

los estímulos hormonales, el endometrio se regenera a partir de un fragmento, llamado basal, que no presenta descamación.

#### **II.4 Endometrio gestacional**

En el caso en que el blastocisto se implante en el endometrio y prolifere, el cuadro hipertrófico y secretor, tanto glandular como del estroma, se hace destacar. En el endometrio gestacional las glándulas se encuentran formadas por un epitelio bajo y rico en glicógeno. Las células del estroma se vuelven grandes y poligonales con un citoplasma amplio.

#### **II.5 Endometrio atrófico**

La transición de la etapa reproductiva de la mujer a la no reproductiva se llama climaterio. A lo largo de esta transición el tejido endometrial padece importantes modificaciones histológicas. Además, en esta etapa el endometrio pierde la capacidad de proliferación. La principal causa de estas modificaciones es la disminución de la secreción de estrógenos y progesterona, hormonas responsables de la evolución del endometrio durante el ciclo menstrual. El endometrio atrófico tiene un grosor de 1 a 3 mm y se llama atrófico por la poca actividad mitótica que presenta.

### **III CICLO ENDOMETRIAL**

El ciclo endometrial se caracteriza por una respuesta a los estímulos hormonales ováricos por parte del endometrio. Esta respuesta se traduce en importantes cambios morfológicos que conducen a su descamación al cabo de 28 días.

El ciclo comprende tres partes: 1) proliferativa o pre-ovulatoria, 2) secretora o post-ovulatoria y 3) descamativa, menstrual o hemorrágica. Las tres fases del ciclo endometrial se encuentran intensamente ligadas a las tres fases del ciclo ovárico: 1) la fase folicular, 2) la ovulación y 3) la fase luteínica, manteniendo una estrecha coordinación, cuyo objetivo final sería alojar el producto de la concepción, es decir favorecer el proceso de gestación.

La regulación del ciclo endometrial esta gobernada por la acción directa de los esteroides sexuales: los estrógenos inducen crecimiento y proliferación de las glándulas, el epitelio y el estroma en la primera fase del ciclo, la fase proliferativa (del día 6 al 14). Este fenómeno se debe a que, paralelamente a esta fase, se desarrollan en el ovario los folículos ováricos que secretarán e incrementarán la concentración de estrógenos en el torrente sanguíneo y que finalmente estimularán la proliferación endometrial. El pico de liberación de estrógenos se da alrededor del día 14, momento en que se produce la ovulación y que coincide con el pico de

concentración de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Tras la ovulación, los restos del folículo maduro o folículo de Graaft en el ovario formarán lo que se conoce como ‘cuerpo lúteo’ que empieza a secretar progesterona. La progesterona determina los cambios secretores de la segunda fase del ciclo, la fase secretora (del día 15 al 28), en la que el endometrio se prepara para ser un tejido altamente nutritivo y confortable para que se pueda llevar a cabo la implantación del oocito fecundado. Si no se da la fecundación y no se implanta el oocito maduro (días 21 al 24 ‘ventana de implantación’) se produce una disminución de los niveles de progesterona, hecho que activa la fase descamativa del endometrio (días 1 a 5). Esta fase comienza con la vasoconstricción e isquemia provocadas por un aumento de la actividad de las prostaglandinas y la descamación del tejido a causa de la activación de diferentes proteasas y citoquinas (figura 2).

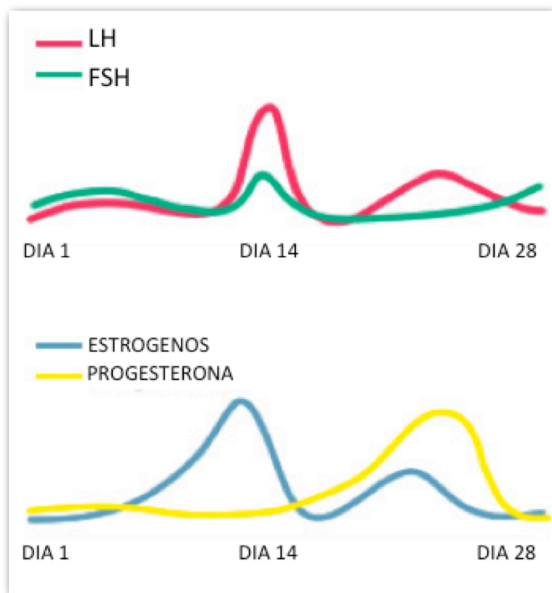


Fig 2. Variación en los niveles de gonadotropinas (LH y FSH) y hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) a lo largo del ciclo menstrual

#### IV CARCINOMA DE ENDOMETRIO

El carcinoma de endometrio (EC, *Endometrial Carcinoma*) es el carcinoma maligno más frecuente del tracto genital femenino en países desarrollados. Aproximadamente el 80% está confinado en el útero y se asocia a buen pronóstico. Así mismo, en un porcentaje significativo de pacientes, el tumor se presenta de forma diseminada o recidiva después del tratamiento. En estos casos el pronóstico es malo.

Según la clasificación de Bockhman[1], existen dos manifestaciones clínico-patológicas del carcinoma de endometrio (tabla I):

Tabla I. Tipos de carcinoma de endometrio [2]

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>Incidencia</b>	80%	≤ 20%
<b>Edad</b>	Pre/peri-menopausia	> 60 años
<b>Histología</b>	Endometriode	Seroso, Células Claras
<b>Diferenciación celular</b>	Bajo Grado	Alto Grado
<b>Lesión precursora</b>	Hiperplasia Endometrial	Atrofia Endometrial
<b>Estimulación estrogénica</b>	Relacionado	No relacionado
<b>Desarrollo clínico</b>	Benigno	Agresivo

Los EC de ‘Tipo I’ son tumores de bajo grado, estrógeno-dependientes y de morfología endometriode (EEC, *Endometrioid Endometrial Carcinoma*), que generalmente se manifiestan en mujeres peri-menopáusicas y coexisten o son precedidos por hiperplasia endometrial.

Los EC de ‘Tipo II’ son carcinomas de tipo no-endometriode (NEEC, *Non-Endometrioid Endometrial Carcinoma*). Estos se comportan de forma agresiva, son independientes de estrógenos y se desarrollan en mujeres post-menopáusicas a partir de pólipos endometriales o endometrio atrófico (figura 3).

Los tumores de Tipo I (EEC) son mas frecuentes (80%) que los de tipo II (NEEC) (20%).

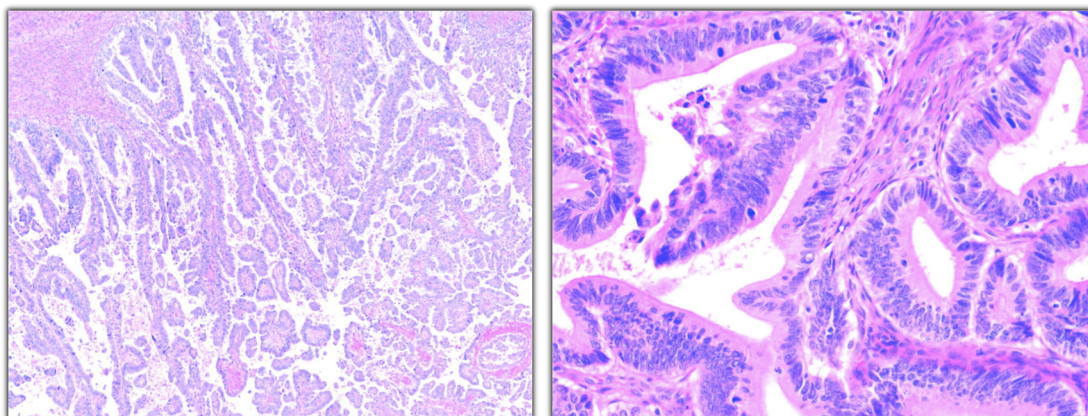


Fig 3. Corte histológico de un EC no endometriode (A) y de un EC endometriode (B) (Llobet D et al. J Clin Pathol 2009; 62:777-785)[3]

El pronóstico y el tratamiento de estos tumores dependerán de la etapa (o estadio) en la que se encuentra el cáncer (si sólo se localiza en el endometrio o si se ha diseminado a otras partes del útero u otras partes del cuerpo). En estos factores se ha basado el sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO)[4]:



Tabla II. Estadios en el Carcinoma de Endometrio

<b>Estadio IA</b>	el tumor está limitado al endometrio y/o invade menos de la mitad del miometrio
<b>Estadio IB</b>	implica la invasión de más de la mitad del miometrio
<b>Estadio II</b>	involucrados el endocervix hasta la capa glandular y el estroma cervical
<b>Estadio IIIA</b>	invasión de la membrana serosa o anejos, o citología peritoneal maligna
<b>Estadio IIIB</b>	metástasis vaginal
<b>Estadio IIIC</b>	metástasis hacia la pelvis o los ganglios linfáticos para-aórticos
<b>Estadio IVA</b>	invasión de la vejiga o el aparato digestivo
<b>Estadio IVB</b>	metástasis distante, incluye ganglios linfáticos intra-abdominales o inguinales

La tasa de supervivencia en 5 años después del diagnóstico de cáncer de endometrio seguido de tratamiento es del 75-95% para el estadio I, 50% para el estadio II, 30% para el estadio III y menos del 5% para el estadio IV.

## V ALTERACIONES MOLECULARES EN CANCER DE ENDOMETRIO

El carcinoma endometriode (EEC Tipo I) y el carcinoma de tipo no endometriode (NEEC Tipo II) se caracterizan por albergar distintos tipos de alteraciones moleculares que, principalmente, suelen involucrar proteínas unidas a la membrana celular, responsables de la adhesión y la transducción de señales entre las células. Los genes mas implicados en estas alteraciones son PTEN, KRAS, PIK3CA, CTNNB1, CDKN2A, TP53, HER2/NEU, CDH1, ERBB2 y CCND1/E1. La inestabilidad genómica (aneuploidía cromosómica e inestabilidad de microsatélites), la pérdida de heterocigosidad de una determinada región genómica (LOH, *Loss of Heterozygosity*) y los cambios epigenéticos (alteración de los patrones de metilación del ADN) juegan papeles igualmente importantes en el desarrollo del carcinoma de endometrio alterando el funcionamiento normal de las células.

Las alteraciones mas frecuentes en EEC son las mutaciones en los genes PTEN, PIK3CA, K-RAS y CTNNB1 y la Inestabilidad de Microsatélites (MI, *Microsatellite*

*Instability*). En cambio, en NEEC son más frecuentes la pérdida de heterocigosidad (LOH) y las mutaciones en el gen TP53 (tabla III).

Tabla III: Alteraciones moleculares en cáncer de endometrio (Modificado de Llobet et al., 2009 J Clin Pathol 62:777-785)[3].

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>MSI</b>	20-40%	0-5%
<b>PTEN</b>	35-50%	10%
<b>KRAS</b>	15-30%	0-5%
<b>PIK3CA</b>	30%	5%
<b>CTNNB1</b>	25-40%	0-5%
<b>TP53</b>	10-20%	90%
<b>CDKN2A</b>	10%	40%
<b>CDH1</b>	10-20%	80-90%
<b>ERBB2</b>	2.5%	26%
<b>CCND1/E1</b>	2-5%	26-42%

Las alteraciones de los genes involucrados en el desarrollo del cáncer de endometrio pueden presentarse de modos muy diferentes y, debido al hecho de que las alteraciones carcinogénicas afectan habitualmente a genes que controlan el ciclo celular o la apoptosis, casi todos los tipos de alteración son resultado de un proceso múltiple de activación de oncogenes y de inactivación de genes supresores de tumores [5]. Las diferencias histológicas entre los tipos I y II de EC van asociadas a diferentes alteraciones moleculares que permiten cierta clasificación atendiendo a si se ha producido una pérdida de función de los genes implicados o, por el contrario, ha ocurrido una ganancia en la función normal como se muestra en la tabla IV [6].

Tabla IV: Clasificación molecular del cáncer de endometrio (Modificado de Okuda et al., 2010 Obstet Gynecol Int)[6]

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>Pérdida de Función</b>		
PTEN	35-50%	10%
TP53	10-20%	90%
MSI	20-40%	0-5%
<b>Ganancia de Función</b>		
ERBB2	10-20%	9-30%
KRAS	15-30%	0-5%
CTNNB1	31-47%	0-3%

## VI ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

El análisis de tumores procedentes de estadios diferentes sugiere que la agresividad en cualquier tipo de cáncer incrementa a raíz de la acumulación de los cambios genéticos que se producen.

La mayoría de los cambios genéticos encontrados pertenecen a dos categorías: a) mutaciones en oncogenes que producen una ganancia de su función estimulando el crecimiento, la división y la supervivencia de las células; y b) mutaciones en genes supresores tumorales que provocan la pérdida de función de dichos genes desregulando el crecimiento de la célula y los sistemas de reparación de errores en el ADN.

El estudio de oncogenes y genes supresores de tumores en el carcinoma de endometrio, al igual que ocurre en otras neoplasias malignas, es considerado desde diferentes aspectos informativos (figura 4). Por un lado el valor predictivo de la transformación de las lesiones pre-neoplásicas a neoplásicas, el valor predictivo del comportamiento en relación con el pronóstico (progresión y proliferación) y por último, el valor predictivo respecto a la respuesta al tratamiento [7, 8].

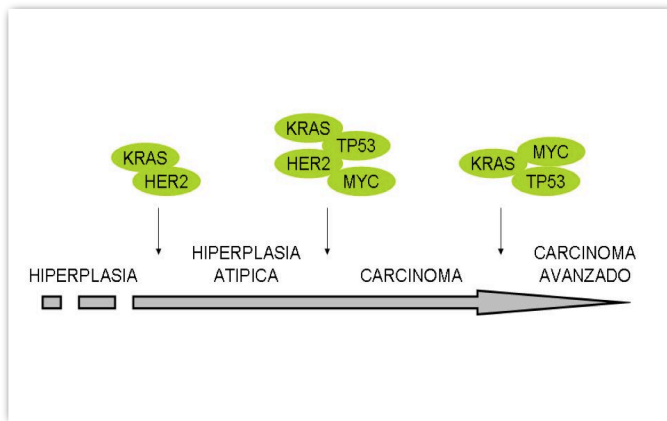


Fig 4. Genes de progresión tumoral en carcinoma de endometrio (Hironobu Sasano. Pathol Annu, 1994:31-49)

### VI.1 ONCOGENES

Los oncogenes son formas alteradas de genes celulares normales conocidos como proto-oncogenes, genes que participan en el ciclo proliferativo fisiológico de la célula y cuya alteración puede producir la sobre-expresión de los mismos, provocando el crecimiento inapropiado de dicha célula.

Fueron identificados mediante el estudio de retrovirus transformantes [9]. Los retrovirus son virus que se caracterizan porque su genoma está formado por ARN y poseen actividad transcriptasa inversa de la que se sirven para transformar ese ARN en ADN. El ADN del

retrovirus es integrado en el ADN de la célula que infecta para poder seguir el ciclo de replicación de ésta (figura 5).

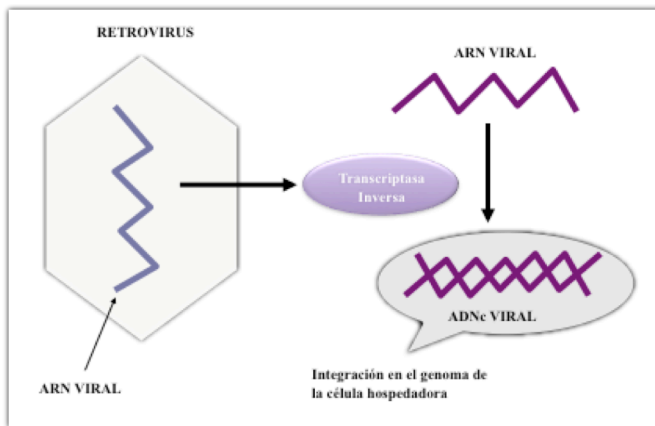


Fig 5. Retrovirus con actividad Transcriptasa Inversa. El virus utiliza la maquinaria de la célula hospedadora para transcribir y replicar su ARN.

La asociación entre este tipo de virus y algunos tipos de cáncer fue descubierta a principios del S.XX cuando, algunos autores como Rous en 1911[10], encontraron virus capaces de inducir sarcomas, tumores hematopoyéticos y carcinomas en primates, pollos, vacas y otros animales. El estudio posterior de este tipo de virus llevó al descubrimiento de que los oncogenes virales (v-onc) en realidad eran genes derivados de proto-oncogenes celulares (c-onc) que habían sido incorporados al genoma viral por recombinaciones ilegítimas durante las infecciones víricas [11]. Algunos retrovirus oncogénicos no contienen oncogenes virales (v-onc) pero se integran en el genoma de la célula huésped muy cerca de oncogenes celulares (c-onc) alterando el nivel de expresión de éstos últimos.

Por medio de estudios de transfección *in vitro* de células de ratón con ADN genómico extraído de tumores sólidos humanos, se identificó un gran número de proto-oncogenes que habían sufrido la transformación a la forma oncogénica en diversos tipos celulares. Se identificaron distintas familias de genes que codifican proteínas que funcionan como factores de crecimiento, receptores para esos factores, segundos mensajeros o como factores de transcripción, todos ellos implicados en el complejo entramado de señalización que conduce en cascadas sucesivas, al crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (figura 6) [12].

Se han descrito diversos mecanismos por los que se puede producir la activación de proto-oncogenes a las formas oncogénicas responsables de la transformación: amplificación génica (aumento del número de copias del gen) con aumento de la dosis del producto codificado, alteraciones por mutación, deleciones, inserciones y translocaciones cromosómicas que pueden producir una expresión aberrante, reordenamientos etc.

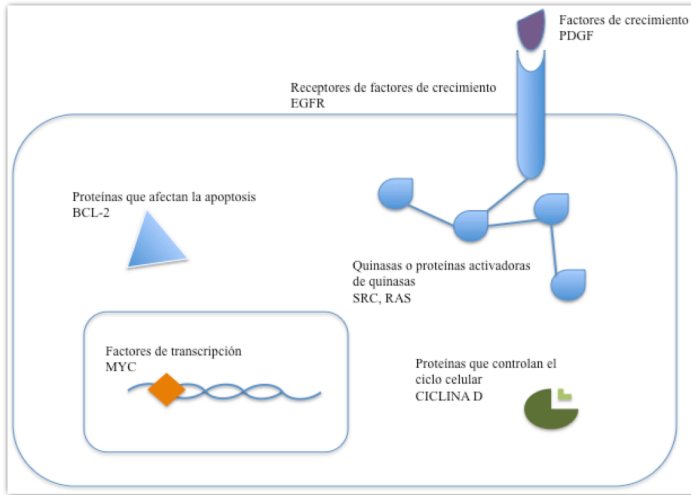


Fig 6. Proto-oncogenes que participan en el crecimiento, división y supervivencia de la célula.

### VI.1.1 ACTIVACIÓN DE LOS ONCOGENES

La activación de los oncogenes implica un incremento en la función de proto-oncogenes que participan en la estimulación del crecimiento, la división y la supervivencia celular. La ganancia de función puede ser a nivel cuantitativo (incremento en la generación del producto inalterado) o a nivel cualitativo (generación de un producto modificado a consecuencia de una mutación o producción de un producto distinto a partir de un gen quimérico creado por reordenamiento cromosómico). En todos los casos los cambios sufridos por los proto-oncogenes son dominantes y normalmente afectan a uno de los dos alelos de un gen (figura 7).

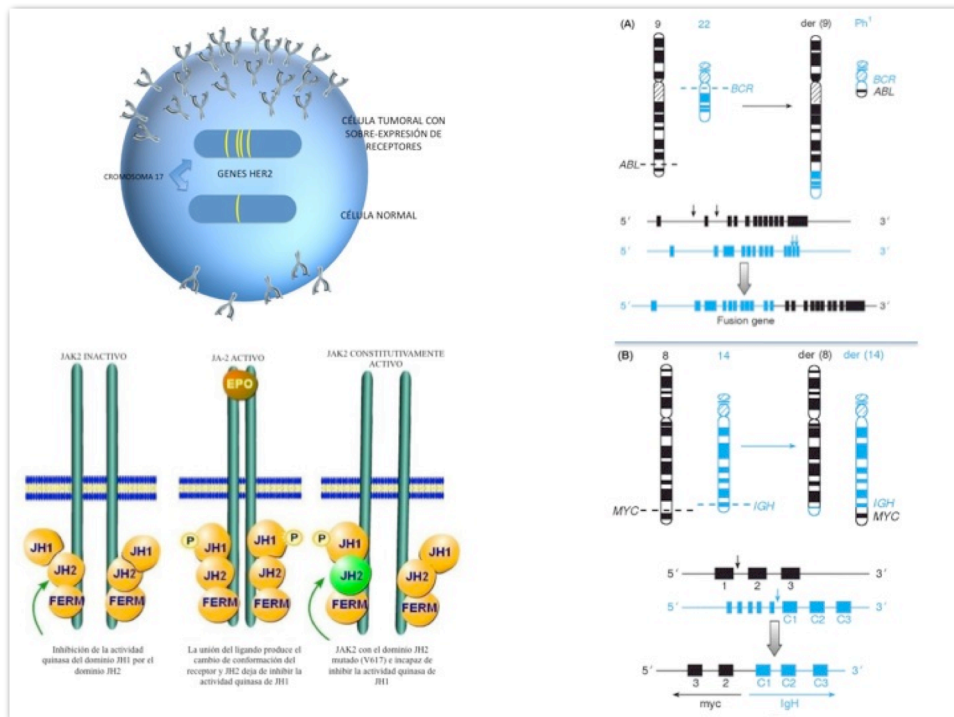


Fig 7. Mecanismos de activación de los oncogenes

### **VI.1.1.a Activación oncogénica por mutación**

Algunos oncogenes son activados mediante mutaciones puntuales como el gen H-RAS1. Este gen forma parte de la familia de genes que codifican proteínas implicadas en la transducción de señal a través de receptores de proteína G (*G-protein-coupled receptors*). La activación del receptor permite la unión de GTP a la proteína RAS, que a su vez transmite señales de activación a través de diferentes cascadas intracelulares. Las proteínas RAS tienen actividad GTPasa y GTP-RAS es convertida inmediatamente a la forma inactiva GDP-RAS. Dichas mutaciones consisten en sustituciones aminoacídicas que disminuyen la actividad GTPasa de la proteína RAS. Como resultado, la señal GTP-RAS se inactiva más lentamente produciendo una respuesta celular excesiva a la activación por el receptor. Mutaciones puntuales en los genes RAS se encuentran frecuentemente en células tumorales de cáncer de colon, pulmón, mama y vejiga.

Otro ejemplo de oncogén activado por mutaciones lo encontramos en el gen que codifica para la tirosina quinasa JAK2, en el que la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1849 del exón 14 resulta en el reemplazo de una valina por una fenilalanina en la posición 617 de la proteína (V617F). Esta mutación ocurre en una región altamente conservada en un dominio autoinhibitorio que regula negativamente la señalización del gen JAK2. Esta mutación se observó en el 90% de los pacientes con PV (Policitemia Vera) cuando se usan ensayos de alta sensibilidad para detectarla. También se encontró en aproximadamente el 50% de los casos con MI (Mielofibrosis Idiopática) y TE (Trombocitemia Esencial), síndromes mieloproliferativos crónicos BCR/ABL negativos. Diversos trabajos han demostrado que esta mutación participa en la patogenia de estas condiciones, especialmente debido a una ganancia de función del gen JAK2 y mediante una pérdida de control que se asocian con la excesiva mielo-proliferación que caracteriza estos desórdenes.

Las mutaciones que activan los oncogenes se producen a nivel somático. Las mutaciones en células germinales suelen ser letales. Existen algunas excepciones a esta norma como es la mutación activadora del gen RET que causa neoplasia endocrina múltiple (MEN) o cáncer familiar de tiroides que en la mayoría de las ocasiones es de carácter hereditario.

Las mutaciones no activantes de los oncogenes pueden ser hereditarias si sus efectos no están implicados en el desarrollo de cáncer. Por ejemplo, las mutaciones hereditarias que inactivan el gen KIT producen piebaldismo y las mutaciones que causan pérdida de función en el gen RET producen la enfermedad de Hirschsprung.

### **VI.1.1.b Activación oncogénica por amplificación**

La amplificación génica es un fenómeno biológico frecuente que ha sido detectado en vertebrados, plantas, ciliados, hongos y bacterias. La presión selectiva a favor ha permitido en

determinadas circunstancias el establecimiento fisiológico en la célula, como es el caso de la amplificación de los genes del ADN ribosomal de *Xenopus*, los genes del corion en *Drosophila* o los genes de actina en la formación de tejido muscular en humanos. Las amplificaciones no tienen por qué ser deletéreas si no, como una fuente de nuevo material genético, pueden ser la base para nuevos cambios evolutivos. Muchas de las familias génicas con un origen evolutivo común o las familias multigénicas pueden tener su origen en las amplificaciones.

Pero la amplificación de ciertos genes también se presenta frecuentemente en asociación con resistencia a insecticidas, cáncer y resistencia a fármacos. ERBB2 y MYC son genes que se encuentran frecuentemente amplificados en cáncer de mama. Pueden existir cientos de copias extra en una sola célula. El resultado es un gran aumento en el nivel de concentración de la proteína.

ERBB2 (HER-2/neu; HER2), un proto-oncogén localizado en el cromosoma 17q21 y miembro del conjunto de proteínas que forman la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGFR), codifica una proteína que funciona como receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa. A través de la dimerización con otros miembros de su familia regula la transducción de señales de proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula. Un estudio del año 1987 [13] demuestra como la sobre expresión por amplificación puede convertir el gen del receptor HER2 en un oncogén cuya acción exagerará los efectos biológicos de diferentes vías de señalización como la vía MAPK (*Ras/Raf Mitogen Activated Protein Kinases*), PI3K/Akt/mTOR (*mamalian Target Of Rapamycin*), PI3K/Akt/GSK (*Glycogen Synthase Kinase*) y JAK/STATs (*Janus-Associated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription protein*), además de la síntesis y secreción de multitud de factores angiogénicos diferentes que incluyen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), IL-8 (*Interleukin-8*) y bFGF (*basic Fibroblastic Growth Factor*) (figura 8).

Los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce la amplificación de un gen son diversos. Los errores en la reparación del ADN [14] son el suceso base implicado en la amplificación de secuencias a gran escala. Las translocaciones relacionadas con los procesos de reorganización cromosómica de tipo estructural también son fuente de variaciones numéricas en las dosis génicas de ciertas células. Recombinaciones homólogas y no homólogas relacionadas a su vez con los mecanismos de reparación del ADN [15, 16], etc.

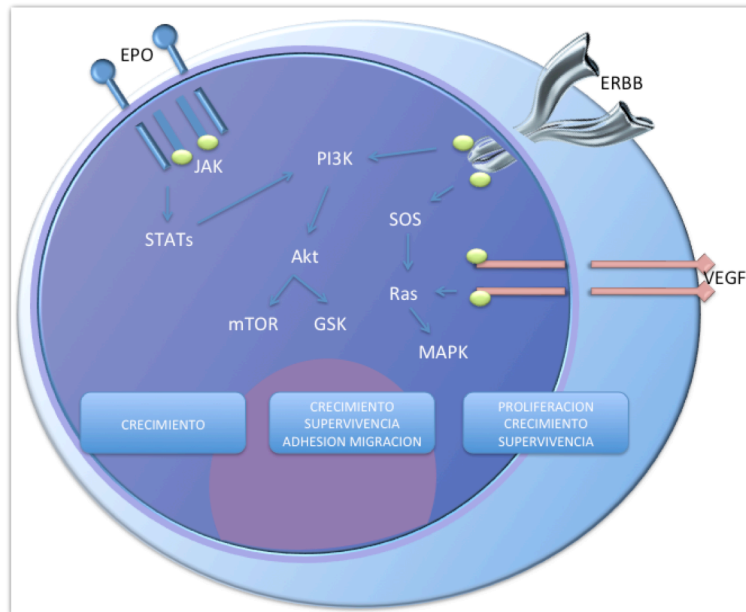


Fig 8. Efectos biológicos de HER2.

### VI.1.1.c Activación oncogénica por translocación

Las células tumorales suelen tener cariotipos anormales con multitud de cromosomas extra o desaparecidos, cromosomas translocados, etc. La mayoría de esos cambios se producen al azar y reflejan el estado general de inestabilidad genética, proceso normal en la carcinogénesis. Las translocaciones cromosómicas pueden crear genes quiméricos que no existen en condiciones fisiológicas. El cromosoma *Philadelphia* (Ph1) es la translocación mas conocida y consiste en un pequeño cromosoma acrocéntrico presente en el 90% de los pacientes con leucemia mieloide crónica. Es el resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22. El punto de ruptura en el cromosoma 9 se localiza en un intrón del oncogén ABL y en el cromosoma 22 implica la localización del gen BCR. El gen quimérico BCR/ABL produce una proteína con actividad tirosina quinasa relacionada con la proteína ABL pero con propiedades transformantes.

El linfoma de *Burkitt* es un tumor común entre la población infantil de África Central y Papúa Nueva Guinea. Los mosquitos y el virus *Epstein-Barr* juegan un papel importante en su etiología pero la activación del oncogén MYC es un factor central. La translocación t(8;14) se encuentra en el 75-85% de los pacientes. El resto de pacientes contienen las translocaciones t(2;8) o t(8;22). Cada una de ellas tiene como resultado la unión del oncogén MYC a la inmunoglobulina IGH, IGK o IGL respectivamente. En este caso, la translocación que produce el linfoma de *Burkitt* no crea un gen quimérico si no que localiza al oncogén MYC en un entorno cromatinico de alta actividad transcripcional en células B productoras de anticuerpos. Debido a esto, MYC se sobre expresa a niveles inapropiados.



## VI.1.2 ONCOGENES EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO

Las alteraciones de los oncogenes son pasos críticos en el desarrollo del cáncer de endometrio. Se han encontrado alteraciones específicas de oncogenes como K-RAS, PIK3CA, CTNNB1 en EEC (Tipo I) o HER2, CICLINAS D1 y E en NEEC (Tipo II) cuyo valor clínico está siendo estudiado en la actualidad con el propósito de que puedan ayudar a refinar el diagnóstico y establecer un pronóstico adecuado. Además, muchos de estos marcadores tumorales constituyen las dianas de terapias moleculares emergentes (Transtuzumab contra HER2).

### VI.1.2.a K-RAS

Las proteínas RAS son pequeñas proteínas G monoméricas, también llamadas pequeñas GTPasas. Pertenecen a la superfamilia RAS en la que se han identificado más de 100 proteínas diferentes subdivididas en 5 subfamilias: RAS, RHO, RAB, ARF y RAN, con masas moleculares entre 20 y 40 kDa. Estas pequeñas proteínas, ejercen gran variedad de funciones como son la regulación de la expresión génica, la proliferación celular, la migración, la organización del citoesqueleto, el tráfico intracelular de vesículas y el transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma [11, 17].

La subfamilia Ras está formada por proteínas Ras clásicas o p21 (H-RAS, K-RASA, K-RASB, N-RAS), proteínas Rap (RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B), proteínas similares a R-Ras (R-RAS, TC21, R-RAS23), proteínas RAL (RALA, RALB) y proteínas RHEB y M-RAS.

La función de RAS está regulada por varias proteínas que controlan las fluctuaciones entre las formas activas e inactivas de esta, dependiendo de la unión al nucleótido de guanina (GTP activa y GDP inactiva) [18, 19].

La proteína RAS presenta dos regiones importantes para su activación y su función llamadas: switch I y switch II, con residuos hidrofílicos localizados en la cara externa de la molécula [20]. La región switch I, aminoácidos 32-40, es el principal sitio de unión del efector y también es el responsable, en parte, de la interacción con GAPs. El efector mayoritario es la MAP quinasa RAF-1 que, una vez activada por GTP-RAS, activa la cascada de regulación génica MEK/ERK, vía primaria anti-apoptótica y de crecimiento celular (figura 9). Las proteínas GAP (proteínas activadoras de GTPasas) son las encargadas de inactivar las GTPasas RAS. La región switch II, aminoácidos 60-72, se encarga en parte de la interacción con GEFs. Las proteínas GEF (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) son las encargadas de intercambiar GTP por GDP en las proteínas RAS y por tanto, de activarlas. Las regiones switch están cercanas al fosfato  $\gamma$  del GTP y exhiben distintas conformaciones según estén unidas a GTP o GDP. De este modo, los cambios conformacionales de estas regiones están implicados

en la unión a las proteínas reguladoras y en la transmisión de la señal a los efectores de RAS [21].

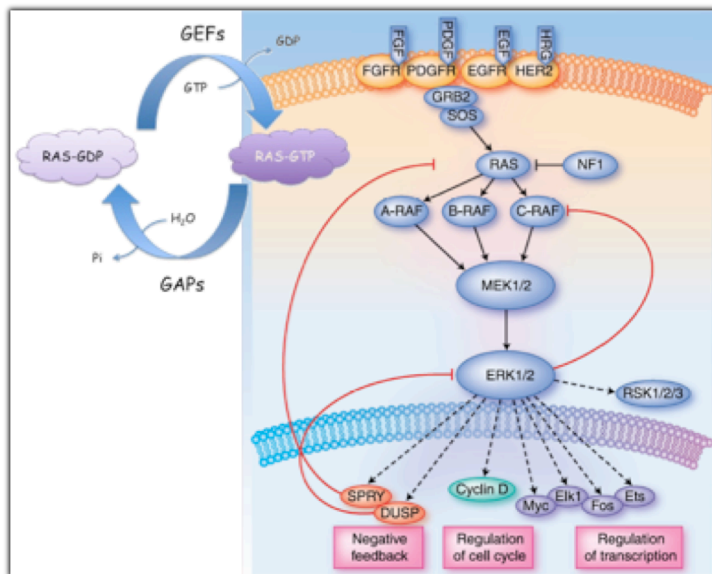


Fig 9. Vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK.

Activación de la vía MAPK y regulación de la transcripción de genes que promueven la progresión celular y la supervivencia tumoral. Regulación de la vía a través de SPRY (Sprouty) y DUSP (Dual Specificity Phosphatases)

Los genes RAS se descubrieron en los años 60 como elementos del virus de la cepa Harvey y Kirsten que producía sarcomas en roedores recién nacidos [22, 23]. A principios de los 80 se identificaron distintos alelos mutados de genes RAS como oncogenes dominantes presentes en un gran porcentaje de tumores sólidos [24]. Mas tarde los oncogenes RAS se aislaron en humanos [25].

Los genes codificantes de los distintos miembros de la familia RAS están muy conservados evolutivamente, lo que indica la importancia de estas proteínas en los procesos celulares. En mamíferos hay tres genes cuya estructura y función es muy parecida: H-RAS, K-RAS y N-RAS. Están compuestos por cinco exones codificantes y un exón 5' no codificante, y difieren estrechamente en el tamaño y en la secuencia de los intrones. Los genes K-RAS tienen dos alternativas para el cuarto exón codificante: 4A y 4B, dando lugar a dos proteínas que difieren en 25 aminoácidos del extremo carboxilo terminal [11, 26].

Los genes RAS se expresan en todos los tipos celulares y órganos, aunque existen diferencias en cuanto a expresión pre- y postnatal, y en ciertos tejidos adultos se expresan preferentemente uno u otro miembro de la familia. H-RAS se expresa mayoritariamente en cerebro, músculo y piel. K-RAS se expresa mayoritariamente en estómago, pulmón y timo, mientras que N-RAS se expresa mayoritariamente en testículos y timo.

En el genoma humano se encuentran dos copias del gen K-RAS: K-RAS1 y K-RAS2. K-RAS1 es un pseudogen derivado del splicing alternativo del ARN mensajero de K-RAS2. K-RAS2 (12p11.1-12.1) está formado por seis exones. De ellos, el exón 5 puede ser eliminado durante el splicing alternativo dando lugar a las isoformas K-RASA y K-RASB. El exón 6

codifica la región C-terminal en K-RASB siendo ésta la variante de splicing predominante de K-RAS2, generalmente llamada K-RAS [27].

K-RAS ha sido descrito como uno de los oncogenes más activos. Entre el 17 y el 25% de los tumores llevan una mutación activadora en K-RAS [28]. Se han encontrado formas oncogénicas de K-RAS en más del 80% de los carcinomas de páncreas, entre el 40 y el 50 % de los carcinomas de colon y el 30-50% de los carcinomas de pulmón, pero también se han visto presentes en tumores del tracto biliar, en cáncer endometrial, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, leucemia mieloide y cáncer de mama [29-31]. Las regiones más críticas del gen para sufrir mutaciones son los codones 12, 13, 59, 61 y 63 [32]. Estas mutaciones activadoras alteran la afinidad de interacción con sus moduladores positivos y negativos y causan la acumulación de Ras-GTP [33].

En el caso del Carcinoma de Endometrio, se han detectado mutaciones de K-RAS en aproximadamente el 10-30% de los EEC [6]; en algunas series se encontraron mutaciones de K-RAS con mayor frecuencia en aquellos EEC que presentaban inestabilidad de microsatélites [34, 35]. También se han detectado en hiperplasias endometriales aunque en menor frecuencia que en los carcinomas [36].

Durante el desarrollo tumoral la activación de RAS está asociada al aumento de la proliferación, de la transformación y de la supervivencia celular. Las mutaciones de K-RAS ocurren con la misma frecuencia en tumores precedidos o no de hiperplasia y los resultados epidemiológicos sugieren que la activación de K-RAS se encuentra asociada a la progresión maligna de los tumores endometriales sin la necesidad de transición vía hiperplasia [37]. Al contrario que en los carcinomas de tipo endometriode, las mutaciones en K-RAS son muy raras entre los carcinomas de tipo seroso y de célula clara [38].

#### **VI.1.2.b PIK3CA**

El gen PIK3CA (*PI3K, Catalytic, Alpha polypeptide*) se localiza en el cromosoma 3q26 y codifica la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinases*).

Las PI3Ks son quinasas lipídicas que funcionan tanto de traductoras de señales bajo receptores situados en la superficie celular como en vías de tráfico de proteínas dentro de la célula. Es decir son capaces de fosforilar fosfatidil-inositoles con su actividad quinasa lipídica y de fosforilar proteínas con su actividad proteína quinasa.

PI3K es una enzima heterodimérica consistente en una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). La reguladora, de 85 kD no tiene actividad quinasa pero funciona como un adaptador estabilizando la subunidad catalítica, de 110 kD con la que las proteínas PI3K ejercen su actividad. La subunidad p110 consiste en un dominio de unión a p85 (ABD, *Adaptor Binding Domain*), un dominio de unión a RAS (RBD, *Ras Binding Domain*), un

domino que interviene en la unión de fosfolípidos de membrana (C2), un dominio helicoidal (HR2) y un dominio quinasa (figura 10).

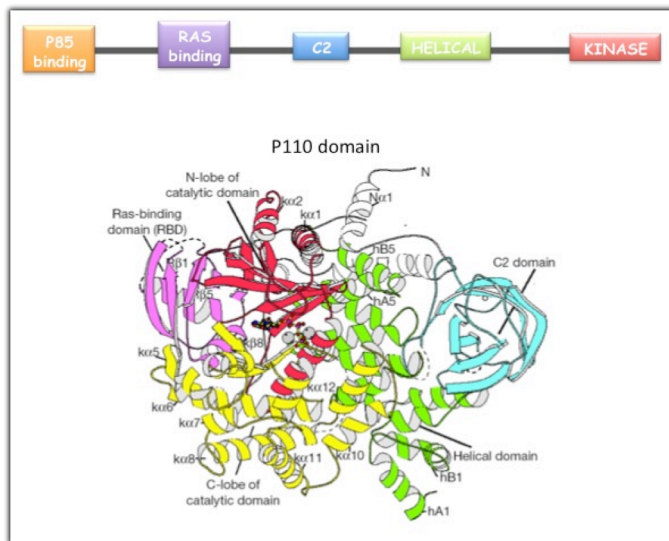


Fig 10. Dominios funcionales de PIK3CA. P85 binding: dominio de unión a p85; RAS binding: dominio de unión a RAS; C2: dominio que interviene en la unión de fosfolípidos de membrana; HELICAL: dominio helicoidal o HR2; KINASE: dominio quinasa

La familia PI3K comprende ocho miembros que a su vez se dividen en otras muchas clases dependiendo de su homología y preferencia de sustrato. En 1997 el *Ludwig Institute for Cancer Research* (<http://www.licr.org>) clasificó las diferentes formas de PI3K basándose en la estructura y función de cada una de ellas. Esta es:

Clase IA: encimas que consisten en una de las subunidades catalíticas (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  o p110 $\delta$ ) y una de las subunidades reguladoras (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  o p55 $\gamma$ ). Se activan mediante receptores tirosina quinasa, receptores antigénicos y receptores de citoquinas. Su función esta asociada al tamaño celular, la motilidad, la supervivencia y la proliferación

Clase IB: consiste en la unión de p110 $\gamma$  como subunidad catalítica y p101 como subunidad reguladora. Se activan mediante receptores de proteínas G “*G Protein Coupled Receptors*” (GPCRs). Sus funciones están asociadas a la modulación de inflamaciones.

Existen también de Clase II con las subclases CII $\alpha$ , CII $\beta$  y CII $\gamma$  y una de Clase III.

Las de Clase II se supone que se activan mediante receptores tirosina quinasa, GPCRs, integrinas y quimiocinas. No existe una definición clara y consensuada de la función de esta clase, pero basándose en la estructura y estudios funcionales de su interacción con otras proteínas, podrían estar mediando la unión a lípidos de membrana o mediando interacciones entre proteínas.

Las de Clase III parece que están activadas constitutivamente. Estudios realizados en levaduras sugieren que esta clase esta asociada a multitud de eventos de tráfico celular como la autofagia y la formación de fagosomas [39, 40], formación de vesículas, transporte al aparato de Golgi y a la membrana nuclear.

La vía PI3K/AKT juega un papel clave en la regulación de la homeostasis de la célula [41, 42]. La activación de receptores de la superficie celular que captan PI3K producen la fosforilación del fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) generando fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) el cual es reconocido por la proteína AKT y su regulador PDK1. En la membrana celular AKT es fosforilado en los residuos serina y treonina. La activación de AKT modula la expresión de genes relacionados con la supresión de la apoptosis y la progresión del ciclo celular (figura 11).

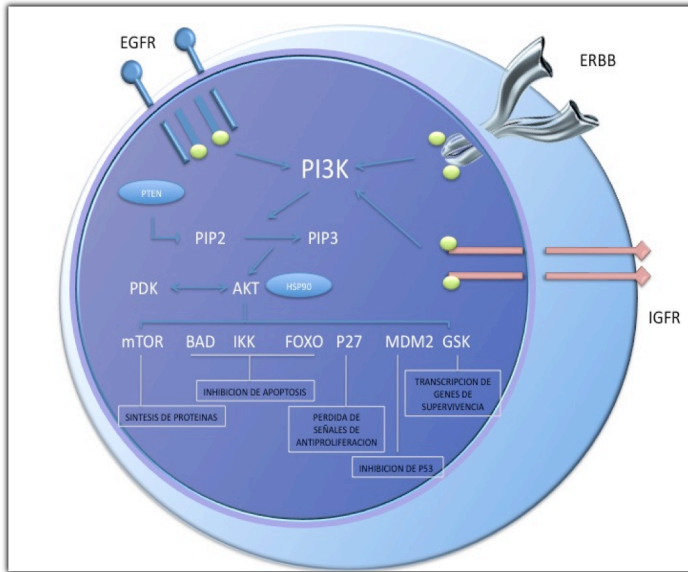


Fig 11. PI3K/Akt pathway. PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate; EGFR: EGF receptor; HSP90: Heat shock protein 90; IGF1R: IGF receptor; PDK: Phosphoinositide-dependent kinase.

A finales del siglo XX y principios del XXI se encontraron una serie de evidencias que asociaban el aumento de la actividad quinasa de PI3K con la génesis o progresión de los tumores de ovario y de cérvix. Una de esas evidencias fue el incremento en el número de copias de una región en el cromosoma 3q26 donde se localiza el gen PIK3CA, hecho que le convertía en un oncogén candidato [43, 44]. Se estudió la presencia de mutaciones en el gen PIK3CA en diversos tipos de tumores. Se encontraron mutaciones en tumores de colon con una frecuencia del 32%. Además se identificaron mutaciones en PIK3CA en el 27% de glioblastomas, el 25% de cáncer gástrico, el 8% de cáncer de mama y el 4% de cáncer de pulmón [45-49].

Las mutaciones encontradas se localizan en regiones del gen PIK3CA que codifican para todos los dominios excepto en el dominio de unión a RAS. Las mutaciones mas frecuentes encontradas han sido las que afectan al dominio quinasa (exón 20) y al dominio helicoidal (exón 9) (figura 12).

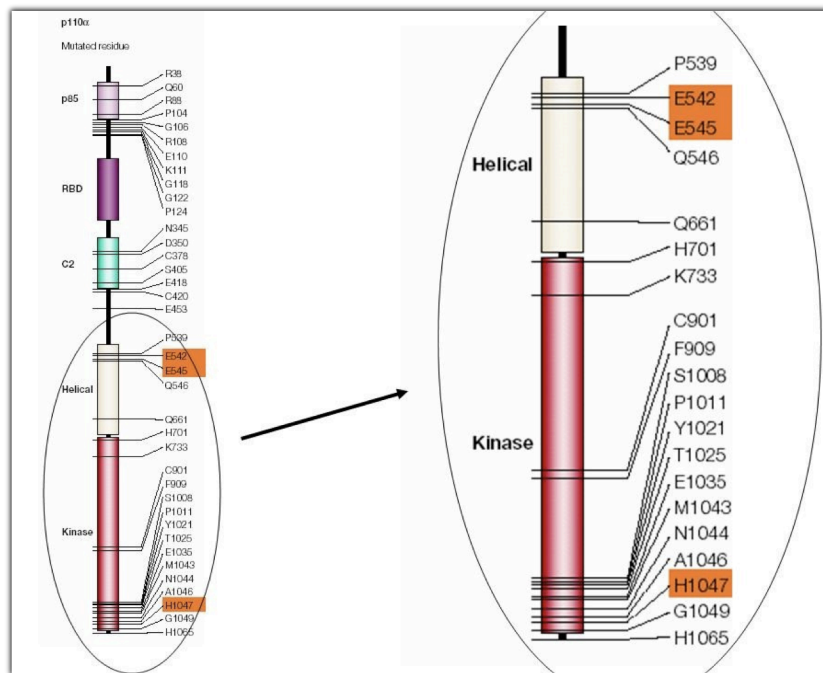


Fig 12. Mutaciones en las subunidades p85 y p110 $\alpha$  (PIK3CA) de PI3K

La existencia de mutaciones en el gen PIK3CA en carcinoma de endometrio se describió por primera vez en el año 2005 [50] con una frecuencia del 36%, aunque el hecho de que la vía PI3K/AKT se encuentra frecuentemente activada en carcinoma de endometrio se conocía de unos años atrás [51, 52] pero se asociaba mayoritariamente a la ocurrencia de mutaciones en el gen supresor de tumores PTEN. PTEN es un antagonista de la vía PI3K/AKT porque defosforila PIP3, haciendo que la localización de AKT en la membrana celular sea menos frecuente, frenando por tanto su activación [52, 53].

Un estudio del año 2008 reportó una frecuencia de mutaciones en el gen PIK3CA del 29% en una serie de EC entre los cuales, el 91% correspondían a EEC. En este mismo estudio se asociaba la presencia de mutaciones en el exón 20 del gen PIK3CA con un factor de mal pronóstico en EC [54, 55]. Un estudio posterior asocia el mismo parámetro de mal pronóstico con la activación de la vía PI3K en general [55]. Tumores asociados a un fenotipo agresivo presentan pérdida de expresión del gen PTEN o sobre expresión del gen PIK3CA, aunque en este último caso pueda ser debido al fenómeno de amplificación génica. Sin embargo en este trabajo no se halló asociación entre la presencia de mutaciones en PTEN o PIK3CA con el mismo perfil de expresión de la vía PI3K de los fenotipos tumorales agresivos. Es decir, han observado un alto nivel de expresión del PIK3CA en tumores con fenotipos agresivos con ausencia de mutaciones en el gen. Concluyendo, los autores postulan que el hecho de que el gen PIK3CA esté mutado o sobre expresado parece tener diferentes implicaciones en la malignidad de los tumores de EC [55].

Trabajos recientes han revelado que las mutaciones del gen PI3K en carcinoma de endometrio no se limitan a los exones 9 y 20 de PIK3CA, como sucede en otros tipos de tumores, si no que el análisis de todos los exones del gen establece el hecho de que los tumores de endometrio poseen un espectro de mutaciones único y específico con una frecuencia tan alta de mutaciones en los exones 1-7 del gen PIK3CA y en el gen PIK3R1 (subunidad reguladora p85) como aquella encontrada en los exones 9 y 20 de PIK3CA [56, 57]. Los exones 1-7 del gen PIK3CA codifican para los dominios ABD, RBD y C2 de la subunidad catalítica p110 $\alpha$ , mientras que los exones 9-20 codifican los dominios helicoidal y quinasa. Las mutaciones en la subunidad reguladora de PI3K, p85 $\alpha$ , codificada por el gen PIK3R1 promueven el incremento de fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> por lo que constituyen otro mecanismo de activación de la vía PI3K en carcinoma de endometrio.

#### **VI.1.2.c B-RAF**

RAF es una familia de genes que codifica tres isoformas: A-RAF, B-RAF y C-RAF. El gen B-RAF se encuentra localizado en el cromosoma 7q34 y se compone de 18 exones. La expresión del gen es activa en todos los tipos de tejidos aunque mayoritaria en tejido neuronal. La proteína B-RAF es una serina treonina quinasa que forma parte de la vía RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK, implicada en la transducción de señales mitogénicas desde la membrana celular hacia el núcleo. La forma inactiva de B-RAF se localiza en el citoplasma de la célula pero es translocada a la membrana mediante la acción de RAS-GTP. Allí, B-RAF sufre una serie de cambios conformacionales que favorecen la fosforilación de residuos en su dominio catalítico. Se conocen muchos genes cuya transcripción es activada a través de esta vía, entre ellos los genes BCL-1 y C-MYC (crecimiento celular) y el gen VEGF (angiogénesis).

Las mutaciones del gen B-RAF pueden ser hereditarias y causan el síndrome cardiofasciocutáneo, una enfermedad caracterizada por defectos cardiovasculares, retardo mental y apariencia facial característica [58].

Las mutaciones adquiridas aparecen en diferentes tipos de tumores, predominantemente en melanoma maligno, tumores colo-rectales con defectos en genes reparadores del ADN e inestabilidad de microsátélites, carcinoma seroso de ovario y carcinoma papilar de tiroides [59-61]. El 80% de las veces, la mutación se da en el aminoácido V600 en el exón 15 del gen. El otro 20% suele localizarse en la región G-loop en el exón 11 o en el segmento de activación de la proteína, cerca del V600. La mutación V600E confiere a B-RAF un estado constitutivamente activo independiente de RAS.

A día de hoy no se ha desarrollado aún un consenso sobre el papel que juega BRAF en el carcinoma de endometrio. En el año 2005 se publicó un estudio mutacional en el cual se había encontrado una frecuencia de mutaciones del gen B-RAF del 21% en una serie de 97 ECs, 2

mutaciones entre 19 NEEC (11%) y 18 casos mutados entre 78 EEC (23%) [62]. Sin embargo, después de esta publicación muchos otros trabajos han reportado frecuencias muy bajas de mutaciones en el gen B-RAF en carcinoma de endometrio [6, 63, 64]. Una de las posibles explicaciones a esta controversia puede estar en la diferencia étnica de las poblaciones estudiadas pudiendo atribuirse una mayor importancia en el papel de B-RAF entre pacientes de origen chino, aunque esta razón carece de peso ya que la frecuencia de otras alteraciones como las de RAS y la inestabilidad de microsatélites resulta muy similar en todos los estudios.

#### **VI.1.2.d HER2/NEU (ERBB2)**

HER-2, también conocida como c-erbB-2, es una proteína receptora de membrana de 185 kD codificada por el gen HER-2/NEU localizado en el cromosoma 17q11 y compuesto por 27 exones. HER-2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal con actividad tirosina quinasa relacionada con el crecimiento, la adhesión, la motilidad y la diferenciación de la célula y de la que también forman parte HER-1 (EGFR), HER-3 y HER-4 [65, 66]. En 1987, Di Fiore comprueba que NEU y HER-2 son los mismos genes que ERBB2 [13].

HER-2 es un proto-oncogen que ejerce una potente actividad oncogénica cuando se sobre expresa. La proteína está compuesta por tres dominios: uno de ellos extracelular, encargado de la unión a ligando, otro transmembrana y otro intracelular con actividad quinasa. Se encuentra presente en multitud de órganos y tejidos: epitelio normal, epitelio ovárico y endometrial, próstata, páncreas, pulmón, hígado, riñón, corazón, etc. La vía intracelular más importante que es activada por HER-2 es MAPK/PI3K por lo que su expresión en cáncer promueve y prolonga las señales de supervivencia, angiogénesis y proliferación celular.

Es poco probable encontrar mutaciones que sobre activen ERBB2 en cáncer (*Cáncer Genome Project and Collaborative Group*). Sin embargo, la sobre expresión o la amplificación del gen se ha visto en frecuencias variables: 25-40% en cáncer de vejiga, 25-30% en cáncer de mama, cerca del 20% en cáncer de pulmón (NSCLC). Otros tumores como el adenocarcinoma gástrico, el cáncer de cervix, el cáncer colo-rectal y otros contienen, con cierta frecuencia, sobre expresión del gen HER-2 [67].

Se ha observado la existencia de sobre expresión del oncogén HER-2 en EC con frecuencias de entre el 10 y el 40% y ha sido asociado a factores pronósticos adversos que incluyen estadios avanzados, altos grados y menores periodos de supervivencia para los pacientes [68, 69].



#### **VI.1.2.e CTNNB1**

El gen CTNNB1 (*Cadherin-associated protein, beta*), localizado en el cromosoma 3p22 y compuesto por 16 exones ejerce funciones importantes en el sistema de adhesión célula a célula mediada por E-cadherina así como en la vía de señalización activada por WNT (*Wingless*). Las proteínas WNT forman una familia de moléculas que regulan las interacciones célula a célula durante la embriogénesis. A través de multitud de componentes citoplasmáticos, la señal es transducida a través de CTNNB1, la cual forma un complejo con TCF (*T Cell Factor*) en el núcleo para activar la transcripción de los genes diana que estimularán la proliferación celular o inhibirán la apoptosis. El nivel de CTNNB1 en la célula está regulado por su asociación con el producto del gen supresor de tumores APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y otras proteínas formando un complejo que provoca la fosforilación de CTNNB1 y conduce a su degradación por el proteasoma [70].

Se conocen dos mecanismos diferentes que llevan al incremento de los niveles de CTNNB1 en la célula. Uno lo causa la ocurrencia de mutaciones inactivantes en el gen APC y el otro son las mutaciones activantes en el exón 3 del gen CTNNB1. Este último mecanismo produce proteínas resistentes a la degradación por lo que se acumulan en el citoplasma y el núcleo y causan la transcripción constitutiva de los genes diana [71-73]. Se han encontrado mutaciones en el gen CTNNB1 en cáncer colo-rectal [72, 74-77], meduloblastoma (MDB) [78], próstata [79, 80], cáncer de ovario [80] y cáncer de endometrio [81-85].

Las mutaciones en el exón 3 del gen CTNNB1 que producen la acumulación nuclear de la proteína se han observado en el 14-44% de EC [81, 85]. Este hecho parece ser independiente de la presencia de inestabilidad de microsatélites y del estatus mutacional de los genes PTEN Y K-RAS. Se ha sugerido la relación entre las mutaciones de CTNNB1 y el desarrollo temprano de los tumores al encontrar niveles altos de proteína acumulada en hiperplasias endometriales [86]. Aunque hay una gran correlación entre las mutaciones de CTNNB1 y la acumulación de la proteína en el núcleo, en algunos ECs la presencia nuclear y citoplásmica de la proteína no se corresponde con la presencia de mutaciones en el gen. Este hecho sugiere que la alteración de los genes APC u otros implicados en la vía puedan resultar ser los responsables de dicha acumulación. Aunque existen datos contradictorios en cuanto al significado pronóstico de las mutaciones de CTNNB1 en EC, probablemente se relacionan con tumores con pronóstico favorable [87].

#### **VI.1.2.f AKT**

AKT, también llamada proteína quinasa B (PKB) es una serina treonina quinasa englobada dentro de la familia de las quinasas AGC (*cAMP-dependent protein kinases A, cGMP-dependent protein kinases G and phospholipid-dependent protein kinases C*). Se han

descrito tres isoformas de la proteína AKT (AKT1, AKT2 y AKT3) que, a pesar de derivar de genes diferentes, presentan más de un 80% de homología entre ellas [88, 89].

AKT1 o simplemente AKT es un gen localizado en el cromosoma 14q32 que contiene 14 exones. La proteína AKT está formada por un dominio PH (unión a fosfoinositoles necesario para su activación), una pequeña región helicoidal, un dominio catalítico y un motivo regulador. El mecanismo de activación de AKT sigue a la activación de la quinasa PI3K en respuesta a diferentes estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento u hormonas. PI3K media la fosforilación de moléculas PIP2 en membrana, dando lugar a la formación de PIP3. Estas últimas sirven de sustrato para reclutar y activar proteínas efectoras de la vía como son AKT y PDK (*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase*). Para la completa activación de AKT, ésta debe ser fosforilada en dos residuos: la treonina 308 (Thr308) y la serina 473 (Ser473) [88, 90, 91]. La fosforilación del residuo Thr308 está mediada por la quinasa PDK, sustrato directo de la PI3K [92-94]. La fosforilación de la Ser473 está mediada por una segunda quinasa, mTor (*mammalian Target Of Rapamycin*), asociada al complejo rictor-mTor [95] y la propia AKT mediante un proceso de autofosforilación [96].

AKT media muchos de los procesos de la vía de transducción de señal de PI3K mediante su actividad serina treonina quinasa. AKT ejerce un fuerte control sobre la viabilidad celular y la proliferación jugando un papel principal en la inhibición de la apoptosis y la progresión del ciclo celular. También está relacionada con procesos de diferenciación, es un mediador crítico en la supervivencia neuronal inducida por factores de crecimiento en el desarrollo del sistema nervioso y participa activamente en el metabolismo de la glucosa, la angiogénesis, procesos transcripcionales, *splicing* del RNA y otras funciones a nivel nuclear como la condensación cromatínica y la transactivación de genes (figura 11).

Aunque la ocurrencia de mutaciones en el gen AKT1 es relativamente poco frecuente, otros tipos de alteraciones en AKT que implican la activación del gen se encuentran de manera mas común en muchos tipos de enfermedades y especialmente en cáncer. La mutación E17K se localiza en el dominio PH de la proteína AKT1, altera las interacciones electrostáticas en esa zona y forma nuevas uniones de hidrógeno con el ligando (fosfoinositoles). Esta mutación provoca la localización anómala de la proteína en la membrana plasmática induciendo su activación y sobre estimulando la cascada de señalización en la que está implicada.

La mutación E17K del gen AKT1 se encuentra en un pequeño porcentaje de cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer colo-rectal [97]. Aunque las mutaciones de este gen son raras en cáncer de pulmón, las propiedades oncogénicas de la mutación E17K podrían contribuir al desarrollo de una fracción de carcinoma de pulmón con histotipo escamoso [98]. También se ha identificado el fenómeno de amplificación génica en carcinoma gástrico.

Diversos autores han encontrado la mutación E17K del gen AKT1 en células tumorales de carcinoma de endometrio con frecuencias del 2% [99], 4% [100] y en un trabajo en el que se

detectaron mutaciones en los tres componentes de la familia AKT (AKT1, AKT2 y AKT3) que en conjunto suponían el 12% [101]. Se ha comprobado la presencia de dobles mutantes AKT1/PTEN acorde con la hipótesis de que en EC se requiere mas de un suceso o alteración para activar completamente la vía PI3K y que las mutaciones en AKT1 se encontraron en tumores de alto grado y estadios avanzados, lo que sugiere que esta mutación confiere un comportamiento agresivo por parte del tumor [100].

### VI.1.2.g FGFR2

La proteína codificada por el gen FGFR2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4) cuya secuencia de aminoácidos ha permanecido fuertemente conservada entre ellos y a través de la evolución. Los miembros de la familia FGFR se diferencian entre sí en sus afinidades por los ligandos y en la distribución en los diferentes tejidos. En general, las proteínas de la familia FGFR se componen de una región extracelular constituida por tres dominios *Ig-like*, un segmento hidrofóbico intra membranoso y un dominio citoplásmico con actividad tirosina quinasa. Las señales inducidas por FGF (*Fibroblast Growth Factor*) regulan gran variedad de procesos celulares durante la embriogénesis, la homeostasis del tejido adulto y la carcinogénesis [102, 103]. En concreto, FGF transduce señales hacia las cascadas de señalización de las vías ERK (*Ras-Extracellular signal Regulated Kinase*), PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-Kinase*) y DAG (Diacilglycerol) (figura 13).

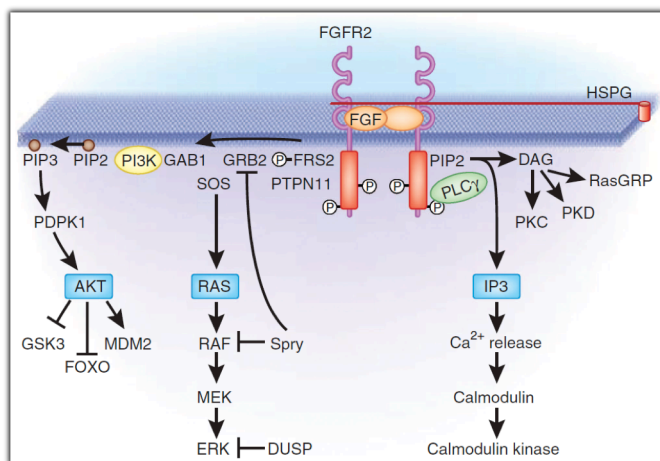


Fig 13. Vías de señalización FGFR2-ERK, FGFR2-PI3K y DAG. SPRY: Sprouty; DUSP: Dualspecificity phosphatase; HSPG: Heparan-sulphate proteoglycan (Kato, 2009 JID 129:1861-1867)

La cascada de señalización FGF-ERK está implicada en proliferación celular. La cascada de señalización FGF-PI3K está asociada al control de la polaridad y a la supervivencia de la célula. La regulación del FGFR2 está controlada en base al balance de los ligandos (FGFs), de la proteína HSPG (*Heparan-Sulfate Proteoglycan*), de las isoformas del FGFR2 y de los inhibidores endógenos como Sprouty y DUSP (*Dualspecificity Phosphatase*). HSPG es una

proteína que media la interacción entre FGFR2 y sus ligandos FGFs de manera específica en cada tejido [104, 105]. Sprouty inhibe la señal FGF a nivel de GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) y RAF. DUSP lo hace a nivel de ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*).

El gen FGFR2, localizado en el cromosoma 10q26 y compuesto por 21 exones, codifica dos isoformas casi idénticas excepto en la última parte del dominio *Ig-like* [106, 107]. La isoforma FGFR2b (exones 1-6, 8, 9, 11-19 y 21) en células epiteliales y la isoforma FGFR2c (exones 1-6, 8, 10-19 y 21) en células mesenquimales (figura 14).

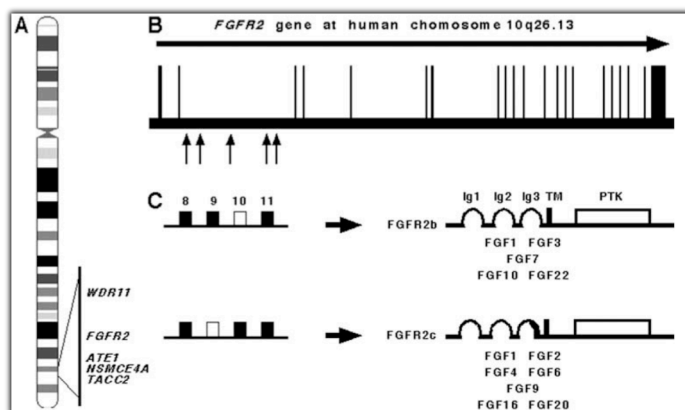


Fig 14. A: localización del gen FGFR2 en el cromosoma 10. B: estructura genética y SNPs asociados a cáncer de mama (flechas) en el exón 2. C: splicing alternativo del gen. (Kato, 2008 Int J Oncol 33:233-237)

Alteraciones genéticas en el gen FGFR2 a nivel germinal o somático dan lugar a desórdenes congénitos y enfermedades producidas a raíz de la desregulación de las cascadas de señalización derivadas de FGFs [108-110]. FGFR2 está asociado a la formación de tejido óseo por lo que es un gen causante de diversos desórdenes del esqueleto como la displasia ósea de extremidades cortas o craneosinostosis [109, 111, 112]. Las mutaciones asociadas suelen localizarse en el dominio *Ig-like* y en el dominio quinasa [113-115]. Las alteraciones de FGFR2 en el dominio *Ig-like* llevan a la activación aberrante de la señal debido a la pérdida de auto inhibición, mientras que aquellas que afectan al dominio quinasa inducen activación oncogénica de FGFR2 independiente de ligando.

Se ha descrito la existencia de amplificación del gen FGFR2 en cáncer de mama [116], así como la presencia de mutaciones [117] y la ocurrencia de ciertos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) en el exón 2 del gen (figura 14 B) [118]. En carcinoma gástrico, el gen FGFR2 se encuentra frecuentemente amplificado en el tipo difuso asociado a diseminación peritoneal [115, 119]. Se han descubierto mutaciones del gen FGFR2 en la isoforma FGFR2c localizadas en el dominio tirosina quinasa en melanoma [120].

Se han hallado mutaciones en el gen FGFR2 en muestras de tumor primario de útero con una frecuencia del 10% [121]. En carcinoma de endometrio se han encontrado mutaciones en el gen FGFR2 con una frecuencia del 10-12%, particularmente en EEC con una frecuencia

del 16%. Las mutaciones fueron localizadas alrededor del tercer dominio *Ig-like*, afectando a los aminoácidos S252W, K310R, S373C, Y376C, C383R, M392R y en el dominio tirosina quinasa en los aminoácidos I547V, N549K, K659E [114]. Se ha demostrado que líneas celulares con mutaciones activadoras en FGFR2 son sensibles al inhibidor pan-FGFR PD173074 [122].

## **VI.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES**

Los genes supresores de tumores (GST) son genes que inhiben el crecimiento de la célula participando en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Las mutaciones que provocan la pérdida de expresión de estos genes suelen producir alteraciones en el comportamiento de la célula. El descubrimiento de estos genes se basó en la detección de pérdidas cromosómicas, fragmentos de los mismos y deleciones de ADN en células neoplásicas sugiriendo la existencia de genes cuyo papel podría inhibir la aparición de tumores y cuya ausencia, por lo tanto, estaría implicada en el proceso de oncogénesis.

### **VI.2.1 ALTERACIONES DE LOS GST**

La alteración de los GST se manifiesta con carácter recesivo, es decir, se necesita la alteración de los dos alelos del gen en cuestión para producir una alteración fenotípica que comprometa la fisiología de la célula. En 1971, el Dr. Alfred Knudson propuso la hipótesis de los dos sucesos para explicar una forma heredable de cáncer llamado Retinoblastoma Hereditario. Según dicha hipótesis, no es suficiente con heredar una copia del gen dañado para desarrollar cáncer. Es necesario un segundo suceso, la pérdida del gen intacto en el cromosoma homólogo.

El Retinoblastoma es un tumor de retina que se desarrolla en la infancia y es el ejemplo perfecto de la teoría de Knudson. De hecho, el Retinoblastoma ha sido la alteración que más se ha utilizado para definir los conceptos y los métodos relativos a los GSTs.

Entre las distintas alteraciones de los GSTs implicados en oncogénesis, la pérdida de uno de los alelos y la conservación del otro es el rasgo más frecuentemente visto. Tanto en la forma esporádica como en la hereditaria, el alelo que permanece sufre una mutación puntual mientras que el otro alelo está ausente por la pérdida de una parte o de todo el cromosoma, aunque también puede estar presente pero silenciado por mecanismos como la metilación de su promotor.

Mediante el análisis de muestras tumorales y no tumorales del mismo individuo se puede identificar la localización de un GST. Para el análisis se utiliza el método de pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss Of Heterozygosity*) que permite la identificación de uno de los dos

sucesos de Knudson. Aunque los microsatélites son la técnica mas frecuentemente empleada para el análisis de LOH, se pueden utilizar otros métodos. Una completa revisión de los mecanismos a través de los cuales puede producirse una pérdida de heterocigosidad, así como los diferentes métodos de análisis utilizados para la detección de LOH y los perfiles encontrados en carcinoma de endometrio tipos I y II con patrones de LOH asociados a diversas características clínico-patológicas de los tumores es mostrada en el ANEXO I [123].

El análisis comparativo de hipermetilación entre muestras tumorales y no tumorales también permite identificar localizaciones de posibles GSTs [124, 125]. La metilación de las citosinas que forman parte de las llamadas islas CpG está frecuentemente asociada a la pérdida de expresión del gen de cuyo promotor forman parte.

## VI.2.2 GST EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO

### VI.2.2.a RASSF1A

RASSF1A es miembro de una familia de proteínas, RASSF, cada una de las cuales contiene multitud de variantes de *splicing*. Con excepción de alguna de estas variantes, cada proteína está formada por un dominio RA (*RAS Association*) y una región C-terminal con un motivo de interacción proteína-proteína (SARAH). Todos los miembros de la familia, a excepción de RASSF3, han sido identificados como genes supresores de tumores. RASSF5 fue el primer miembro de la familia clonado y designado originalmente como Nore1a (*Novel RAS effector 1*) [126]. RASSF5 es una proteína pro-apoptótica que induce la destrucción de las células tras su unión a la forma activa de RAS. Este gen se encuentra frecuentemente inactivado por la metilación de su promotor en diversos tipos de tumores.

El gen RASSF1 está localizado en el cromosoma 3p21 y contiene 8 exones. Mediante *splicing* alternativo y el uso de dos promotores diferentes da lugar a ocho transcritos distintos: RASSF1A-RASSF1H.

RASSF1A carece de actividad enzimática pero sirve como estructura principal para la formación de ciertos complejos de señalización participando en diversas funciones celulares a través de diferentes vías (figura 15). En respuesta a estímulos apoptóticos o mitogénicos, RASSF1A funciona como una proteína asociada a microtúbulos ejerciendo una acción estabilizadora en la dinámica de éstos, deteniendo por consiguiente el proceso de mitosis. La represión de la acción de las ciclinas A y D1 por parte de RASSF1A provoca el cese del ciclo celular y la interacción con CNK1 (*Connector enhancer of Kinase Suppressor of RAS*), MST1 (*Macrophage Stimulating 1*), SAV (*Salvador*) y MOAP1 (*MOdulator of APoptosis 1*) permite a RASSF1A la regulación de la apoptosis [127-129].

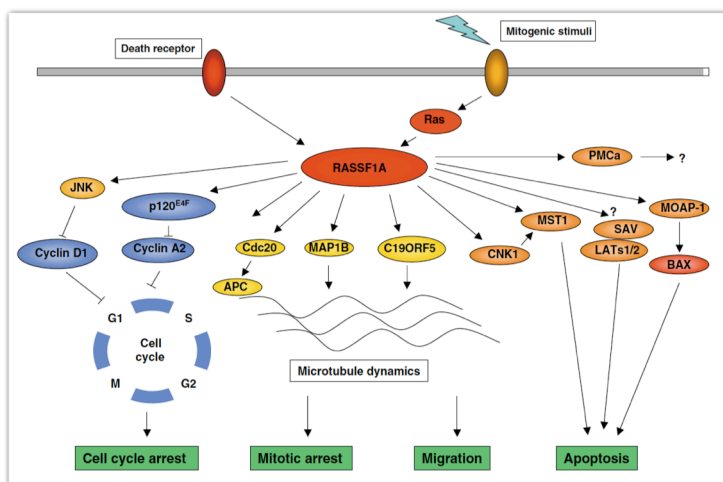


Fig 15. Regulación de mitosis, ciclo celular y apoptosis por RASSF1A en respuesta a estímulos mitógenos o apoptóticos. (Donninger, JCS 120, 3163-3172)

Ha quedado demostrado en numerosas ocasiones que RASSF1A es un gen supresor tumoral silenciado en la mayoría de tumores mediante la metilación específica de su promotor, resultando en la pérdida de expresión de la proteína RASSF1A y, aunque dicha pérdida de expresión de RASSF1A por metilación es un hecho muy frecuente en cáncer, los cambios nucleotídicos ocurridos de manera somática han sido, del mismo modo, hallados con cierta frecuencia en tumores de diferentes etiologías.

En cualquier caso, la pérdida de uno de los alelos de RASSF1A es un fenómeno frecuente en cáncer, y el alelo que permanece puede quedar inactivado mediante la combinación de mecanismos genéticos y epigenéticos, siguiendo el modelo de Knudson. También ha sido visto el caso de la hipermetilación en ambos alelos [130] y se han detectado mutaciones puntuales en el gen asociadas a diversos tipos de tumores [131], la mas común es la que afecta al aminoácido 133 localizado dentro de un dominio de fosforilación de la proteína RASSF1A.

Las mayores frecuencias de hipermetilación del promotor de RASSF1A encontradas han sido en cáncer de pulmón (SCLC) en un 88%, mama en un 95% y próstata en un 99% aunque muchos otros tipos de tumores también exhiben hipermetilación en frecuencias nada despreciables [132-134].

En tumores de EC se han encontrado frecuencias de hipermetilación del promotor de RASSF1A de entre el 30 y el 85% mediante MS-PCR (*Metilation Specific PCR*). Además se detectó la presencia de hipermetilación en dos de cuatro líneas celulares de EC (*AN3-CA*, *HEC-1-B*, *KLE* y *RL95-2*) que tratadas con el agente demetilante 5-aza-2-deoxycytidine, una droga que inhibe la metilación del ADN, restauraban la expresión de RASSF1A [135-137].

### VI.2.2.b SPRY2

La proteína SPROUTY (SPRY) fue descrita por primera vez en 1998 como un inhibidor de FGF (*Fibroblast Growth Factor*), factor de crecimiento estimulador de la ramificación

traqueal durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* [138]. Mas tarde, la función de SPRY en *Drosophila* (dSpry) se estableció como inhibidor general de RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) durante la organogénesis [139].

En humanos se conocen cuatro genes SPRY homólogos (SPRY1: 4q28; SPRY2: 13q31; SPRY3: Xq28/Yq12 y SPRY4: 5q31) que poseen en común un dominio C-terminal rico en cisteína, el cual ha permanecido fuertemente conservado a lo largo de la evolución. En el ejercicio de su función, las proteínas SPRY se translocan a la membrana de la célula activadas por factores de crecimiento (EGF). Uno de los mecanismos que permiten la translocación a la membrana celular es la unión del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a la región C-terminal rica en Cys. La porción NH2-terminal de las proteínas SPRY se encuentra menos conservada y podría ser responsable de las diferencias funcionales entre ellas y la expresión específica de tejido.

Las interacciones de SPRY con diversas moléculas intermediarias, dirigen las diferentes tareas en las que SPRY2 se ve involucrada, pero en general, las proteínas SPRY funcionan como inhibidoras de la proliferación y la migración de la célula aunque también son esenciales impulsando la supervivencia de la misma.

Por un lado, el secuestro de GRB-2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) impide la unión de ésta a SOS-1 (*Son of Sevenless homolog 1*), lo que bloquea la activación de la vía RAS/MAPK a través de EGF [140]. Por el contrario, SPRY también secuestra CBL, proteína encargada de la degradación del receptor EGFR por el proteasoma, lo que implica que la degradación de EGFR por esta vía se vea reducida, de ahí que el verdadero papel de las proteínas SPRY sea el de reguladoras de RTKs en lugar de inhibidoras [141][142] (figura 16).

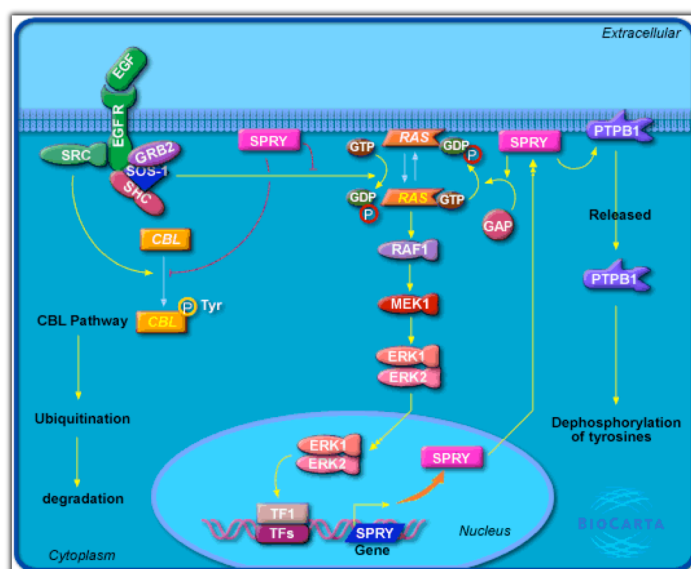


Fig 16. Interacciones de SPRY implicadas en la inhibición de la proliferación, la diferenciación celular y la migración.

Imagen Biocarta, San Diego, California. Biocarta.com



Otra tarea de SPRY2 es incrementar la cantidad de proteína soluble PTPB1 lo que reduce la fosforilación de proteínas tirosina quinasa involucradas en migración y formación de focos de adhesión.

La regulación de las proteínas SPRY viene determinada, en parte, por el balance entre su degradación y su síntesis. En cuanto a SPRY2, su degradación requiere la participación de las proteínas CBL y SIAH2 (*Seven in Absentia Homolog 2*) y su síntesis responde a la estimulación de factores de crecimiento a través de la vía de señalización MAPK [143] (figura 16).

Los últimos años de investigación han revelado una presencia evidente de genes SPRY alterados en un gran número de tumores [140]. Consistente con la acción inhibitoria de SPRY2 sobre las señales de proliferación celular, se han encontrado niveles de proteína reducidos en carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón (NSCLC) y cáncer de mama y próstata [144-146].

Por otro lado, en líneas celulares de melanoma, las cuales contienen mutaciones en los genes B-RAF y N-RAS, los niveles de proteína SPRY2 son mas elevados de lo normal [147]. Un posible mecanismo de sobreexpresión del gen SPRY2 en este último caso se explica en el hecho de que, en ausencia de factores de transcripción, la protección sobre la degradación de EGFR por parte de SPRY2 estimularía el crecimiento de la célula tumoral portadora de mutaciones en la vía de señalización RAS/MAPK [148].

Dado el conocimiento de cómo SPRY2 puede regular positiva o negativamente las acciones biológicas de los receptores de factores de crecimiento, el contexto celular y el contenido de elementos de señalización alterados en un tipo dado de tumor puede determinar si SPRY2 está actuando como supresor tumoral o como promotor de tumores [149].

### **VI.2.2.c TP53**

El gen TP53 se localiza en el cromosoma 17p13 contiene 11 exones y codifica para un factor de transcripción (p53) compuesto de un dominio de trans-activación NH2 terminal, un dominio central de unión a ADN y un dominio de oligomerización COOH terminal. Además de estos dominios, p53 contiene tres zonas de localización nuclear pues, es en el núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción. La forma activa de p53 en el núcleo funciona como tetrámero y reconoce y se une a secuencias específicas (secuencias consenso) dentro de las regiones promotoras de los genes diana.

La función de p53 como factor de transcripción responde a diferentes estados de la célula (daño en el ADN, activación oncogénica, hipoxia, daño oxidativo, etc.) regulando la transcripción de genes que inducen parada del ciclo celular, apoptosis, envejecimiento, reparación del ADN o cambios en el metabolismo (figura 17).

Fisiológicamente, el nivel de expresión del gen TP53 se mantiene bajo, dado que p53 es una proteína bastante dañina para la célula en su estado activo. El nivel de expresión es dependiente del balance entre la producción y la degradación de la proteína. Ya se ha dicho que la producción de p53 obedece a ciertos estímulos celulares como el daño en el ADN. La degradación proteolítica de p53 está mediada por la interacción física entre p53 y algunas proteínas como MDM2, proteína ligasa que conduce a la degradación de p53 en el proteasoma [150].

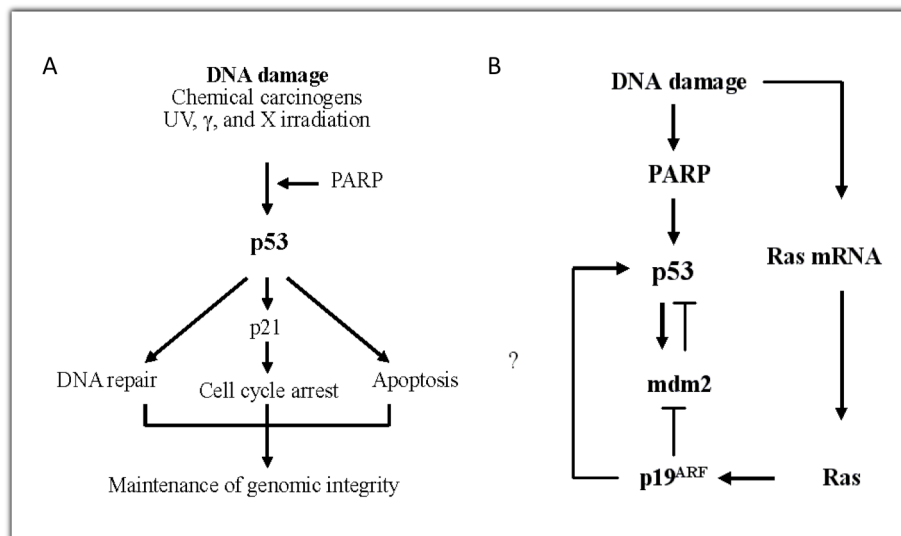


Fig 17. A: Vía de señalización de TP53. B: Regulación de TP53; PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*), MDM2 (*Murine Double Minute 2*), P19ARF (ARF, *Alternative Reading Frame*).

Se ha visto que aproximadamente el 50% de los tumores en humanos llevan mutaciones en el gen TP53 [151-155]. Debido a que en p53 el dominio de unión a ADN se encuentra ligado a su actividad proapoptótica, la integridad genómica de la secuencia que codifica para ese dominio (exones 5-8) es particularmente importante. De todas las mutaciones que sufre TP53, el 95% de ellas ocurren dentro de la región genómica que codifica para el dominio de unión al ADN [156]. La mayoría de las mutaciones producen la síntesis de una proteína estable que ha perdido su capacidad de unión al ADN y por lo tanto la función de trans-activación.

La presencia del gen TP53 mutado en tumores puede ocurrir tanto a nivel de la línea germinal, es el caso del síndrome de Li-Fraumeni en el que los individuos afectados poseen una alta predisposición al desarrollo de sarcomas, leucemias y cáncer de mama a edades tempranas, como a nivel somático. En cualquier caso, la pérdida del otro alelo es un hecho frecuente y acorde con el modelo de Knudson. Hay muy pocos estudios en los que se describa la inactivación del gen por hipermetilación del promotor.

Las mayores frecuencias de mutación en el gen TP53 asociadas a neoplasias corresponden a cáncer de pulmón con frecuencias desde el 33% en adenocarcinoma hasta el 70% en SCLC [157], carcinoma de ovario (desde el 20% en estadios tempranos hasta el 80% en estadios tardíos), glioblastoma secundario (60%), carcinomas de piel de células basales y escamosas (40%), cáncer de mama (25%), HNSCC (40-60%), entre otros muchos tipos de tumores con diferentes frecuencias.

En carcinoma de endometrio se ha visto que la frecuencia de mutaciones del gen es dos veces más frecuente en tumores sin hiperplasia (independientes de estrógenos) que en los que presentan hiperplasia (dependientes de estrógenos) [37, 158]. Se han encontrado mutaciones en TP53 en el 90% de los carcinomas de tipo seroso (NEEC independientes de estrógenos) [159]. En el tipo de célula clara, las mutaciones de TP53 juegan un papel menos importante en comparación con el tipo seroso [160]. Se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas entre la presencia de alteraciones en TP53 en histologías no endometrioides, tumores de alto grado y ausencia de receptores de progesterona [161].

En carcinoma endometriode las mutaciones de TP53 se encuentran durante fases de progresión o diferenciación, etapas avanzadas. Se han observado alteraciones genéticas en TP53 en el 17% de los carcinomas endometrioides (EEC) de grado 3 [162].

### **VI.2.2.d PTEN**

El gen PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) se localiza en el cromosoma 10q23 y está formado por 9 exones; codifica para una fosfatasa lipídica y se comporta como un gen supresor de tumores.

La estructura de la proteína PTEN consiste en un dominio N-terminal con actividad fosfatasa y un dominio C-terminal denominado C2. El dominio fosfatasa contiene el sitio activo con el cual lleva a cabo su función enzimática. El dominio C2 es una estructura que permite a la proteína unirse a la membrana celular. Cuando PTEN funciona con normalidad, actúa como parte de una vía de señalización que produce el cese de la división de la célula y que puede llevar a la muerte celular programada (apoptosis) si es necesario (figura 18). Estas funciones previenen el crecimiento descontrolado de la célula, hecho que causa la formación de tumores. La actividad fosfatasa lipídica de PTEN induce el paro del ciclo celular en el punto G1/S, defosforilando PIP3, que se transforma en PIP2, resultando en la inhibición de la vía de señalización de PI3K/AKT. De esta manera PTEN regula positivamente los mecanismos proapoptóticos dependientes de AKT y negativamente los mecanismos antiapoptóticos dependientes de Bcl-2. La actividad fosfatasa de PTEN también está relacionada con la inhibición de formaciones focales de adhesión, distribución celular y migración [166].

La pérdida de la actividad de PTEN por medio de mutaciones, deleciones o silenciamiento del promotor por metilación ocurre con gran frecuencia en multitud de tumores primarios y metastásicos [167, 168]. Se han documentado mutaciones del gen PTEN en la línea germinal como causantes de la enfermedad de Cowden, con un patrón de herencia autosómico dominante, que confieren gran susceptibilidad a padecer cáncer de mama y carcinoma de tiroides. Las mutaciones de la línea somática han sido documentadas principalmente en glioblastomas y en carcinoma de endometrio. Las mutaciones suelen afectar al motivo catalítico de la proteína, que se corresponde con el exón 5 del gen.

La inactivación de PTEN puede estar inducida por mutaciones que conducen a una pérdida de expresión o en otros casos causada por el mecanismo de pérdida de heterocigosidad (LOH). Se conoce que la hipermetilación del promotor del gen PTEN juega un papel relativamente importante en la alteración de su función. La hipermetilación del promotor de PTEN se ha observado en el 19% de los tumores y se asocia con metástasis [169]. En general, la ocurrencia de alteraciones en el gen PTEN se asocia a un comportamiento metastásico y a estadios avanzados en muchos tipos de tumores, de ahí que se encuentre citado como PTEN/MMAC (*Phosphatase and TENSine homolog deleted on chromosome ten/Mutated in Multiple Advanced Cancers*).

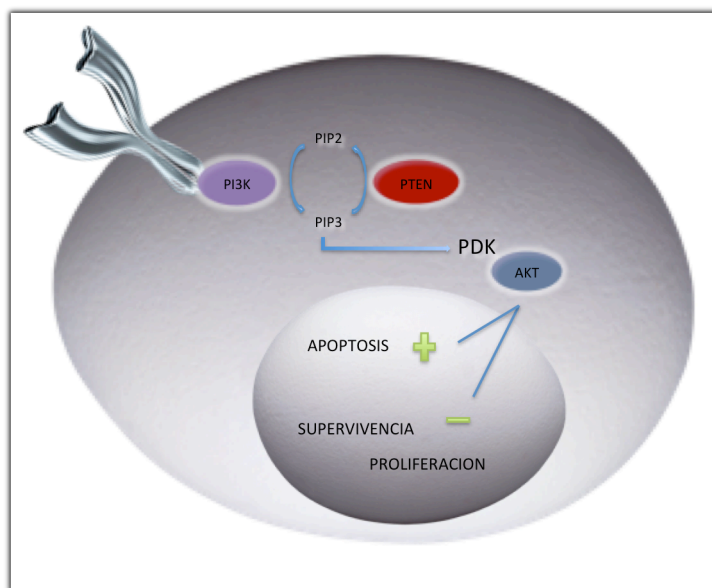


Fig 18. Mecanismo de acción de PTEN

El gen supresor de tumores PTEN se encuentra frecuentemente alterado en carcinoma de endometrio. La pérdida de función de PTEN es un hecho temprano en la tumorigénesis endometrial [71, 164]. La pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10q23 ocurre en el 40% de los EC y las mutaciones somáticas en el gen PTEN son comunes en EC pero su presencia se limita casi exclusivamente a los EEC encontrándose en un porcentaje entre el 30 y el 60% en

este tipo de tumores. Por otro lado, se han encontrado altas correlaciones entre el estado de Inestabilidad de Microsatélites (MI) y el estado mutacional de PTEN en EC: las mutaciones se encuentran en el 60-80% de los tumores tipo EEC con MI positivo y tan solo en el 20-35% de los tumores con MI negativo.

## VII INESTABILIDAD GENÓMICA

Multitud de datos publicados hasta la fecha demuestran que en el proceso de tumorigénesis se requieren múltiples cambios genéticos y que, a consecuencia de éstos cambios, se produce la acumulación de más alteraciones que afectan tanto a nivel cromosómico como a nivel génico y que aceleran el proceso tumoral. La estabilidad genómica tiene, por tanto, una importancia vital en la supervivencia de la célula ya que de ella depende la correcta regulación de los sistemas de respuesta celular al daño genómico y la integridad de los sistemas de reparación del mismo.

Los tipos mas importantes de inestabilidad genómica en cáncer de endometrio son la inestabilidad de microsatélites (MI, *Microsatellite Instability*) y la aneuploidía cromosómica. La aneuploidía cromosómica se caracteriza por la presencia de pérdidas y ganancias cromosómicas distribuidas a lo largo del genoma. La inestabilidad de microsatélites pone en evidencia la existencia de deficiencias en el sistema de reparación de errores del ADN (MMR, *MisMatch Repair*).

### VII.1 ANEUPLOIDÍA CROMOSÓMICA

La aneuploidía en cáncer, como la variación en el número normal de cromosomas de una célula (ganancia o pérdida), puede ocurrir durante la mitosis si no se separan correctamente las cromátidas dando lugar a la descompensación en la dosis génica de los loci implicados. En condiciones normales, durante la división celular, los cromosomas se distribuyen equitativamente hacia cada célula hija a través del huso acromático. Sin embargo, en las células cancerosas, es común observar que los cromosomas son segregados de manera errónea, provocando que las células hijas tengan más o menos información genética de la que deberían (figura 19).

La principales causas de aneuploidía en las células tumorales son los defectos en el huso acromático, los malos alineamientos cromosómicos en el centro de la célula, la mala unión de los cinetocoros a los microtúbulos, anomalías en el número y la función de los centrosomas, etc. [170, 171]. En 1997 Lengauer y col. [172] señalaron que la aneuploidía era la causa del aumento

anormal de inestabilidad cromosómica que persiste durante el proceso tumoral derivando de mutaciones en genes que participan en el proceso de mitosis y cuya alteración produce anomalías en la segregación cromosómica [173]. También existen sustancias químicas capaces de provocar daños en los microtúbulos como son el alquitrán, el amianto, el níquel, el arsénico, el plomo, las dioxinas, etc.

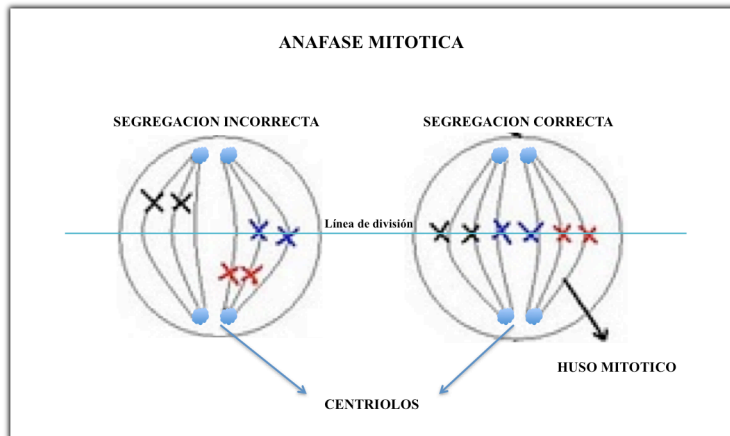


Fig 19. Segregación cromosómica durante la mitosis

Los desequilibrios numéricos, al alterar la transcripción de multitud de genes, producen un estrés en la célula que ocasiona una demora en su crecimiento, propiedad que podría ser utilizada como supresor tumoral, introduciendo deliberadamente aneuploidías en células pre neoplásicas. Sin embargo, en cáncer se han observado patrones característicos, modelos de aneuploidía que se repiten en los mismos tipos de tumor. Hay, pues, algún tipo de asociación entre qué aneuploidía sucede y qué cáncer se padece. Incluso, algunas aneuploidías tienen valor diagnóstico, prediciendo qué capacidad invasiva tiene el tumor, cómo de avanzado está, cómo responderá a la medicación. Todos estos sucesos podrían deberse a que la aneuploidía en una célula confiere cierta presión selectiva hacia la acumulación de mutaciones adicionales que permitirían la resistencia frente a los efectos adversos que a su vez produce en el crecimiento el desequilibrio numérico.

Entre un 25 y un 45% de los cánceres de endometrio son aneuploides. Tanto la aneuploidía como un alto porcentaje de células en fase S se han relacionado con menor supervivencia [174]. Ambas características se suelen asociar a tumores poco diferenciados, con gran invasión miometrial y estadios avanzados.

Los análisis de expresión de genes basados en arrays de cDNA han demostrado que los NEEC contienen con frecuencia sobre expresión de genes relacionados con la regulación de la metafase mitótica de la célula. Uno de ellos (STK-15) es esencial en la segregación de los cromosomas y las funciones de los centrosomas y se encuentra frecuentemente amplificado en los NEEC [87].

## VII.2 INESTABILIDAD DE MICROSATELITES (*Microsatellite Instability*)

Los microsatélites forman parte, junto con los minisatélites, del conjunto de secuencias repetidas del genoma humano: VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*). Los microsatélites son repeticiones de secuencias cuya longitud es menor de 5 pares de bases. Los minisatélites son repeticiones de bloques de mayor longitud. El número de repeticiones de un determinado microsatélite es muy variable entre los individuos de una población pero permanecen estables en un determinado individuo durante toda su vida.

Aunque se localizan en regiones no codificantes, los microsatélites son muy susceptibles a las alteraciones por defectos en el sistema de reparación de errores en el ADN. La inestabilidad somática de los microsatélites se observó por primera vez en cáncer de colon y recto (HNPCC) [175, 176] y fue asociada a mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales para la reparación de errores en el ADN [177, 178]. Las proteínas del sistema de reparación de errores (MMR, *MisMatch Repair*) interaccionan con bases mal alineadas, hecho que ocurre durante la replicación y la recombinación del ADN, y reparan esos errores. Si el sistema no funciona correctamente los errores permanecen sin corregir, convirtiéndose en mutaciones que se fijan en las repeticiones siguientes como adiciones o deleciones en una o mas unidades de repetición en el microsatélite. La inestabilidad de microsatélites constituye, por tanto, la manera indirecta de conocer la existencia de alteraciones en aquellos otros genes que codifican proteínas con funciones de reparación de errores en el ADN de la célula.

La inestabilidad de microsatélites se ha visto en diversos tipos de tumores (colon, endometrio y otros) en pacientes con cáncer de colon hereditario de tipo no polipósico (HNPCC) pero también se ha observado en el 25-30% de los EC esporádicos [179, 180]. Los pacientes de HNPCC con EC llevan una mutación hereditaria en los genes que codifican las proteínas MMR: MLH-1, MSH-2, MSH-6 o PMS-2 (lo que sería el primer suceso de la hipótesis de Knudson), pero el EC se desarrolla sólo como consecuencia de la aparición de una segunda deleción o mutación en el alelo del cromosoma homólogo correspondiente (lo que sería el segundo suceso) en las células endometriales. Una vez concurren los dos sucesos necesarios, la función de los genes MLH-1, MSH-2, MSH-6 o PMS-2 de reparación de errores en el ADN se ve alterada causando la adquisición de MI y el desarrollo de los tumores.

En EC esporádico la inactivación de MLH-1 mediante la hipermetilación del promotor es la principal causa de la deficiencia en la reparación de errores [181] y frecuentemente ocurre en lesiones precursoras como la hiperplasia atípica [182]. Por lo tanto, la hipermetilación de MLH-1 es un suceso temprano en la patogénesis de los EEC y precede el desarrollo de MI.

### VII.3 HIPERMETILACIÓN DE PROMOTORES

La metilación del ADN es uno de los sistemas, junto a otros como son las modificaciones covalentes de histonas (H2A, H2B, H3 y H4), los depósitos de proteínas no histonas en los nucleosomas, el reordenamiento local de cromatina y la expresión de ARN no codificante, responsable de la estructura de la cromatina y del control de la transcripción de genes a nivel epigenético [183].

En todos los mamíferos, los patrones de metilación se establecen durante el desarrollo embrionario. Antes de la fertilización tiene lugar un proceso de desmetilación generalizada del ADN que elimina la distribución característica de 5-metilcitosinas en el oocito y el espermatozoide. Tras la implantación, un nuevo proceso de metilación vuelve a restablecer el patrón somático característico esencial en el desarrollo y la diferenciación del embrión [186-188].

Las citosinas que forman parte de las llamadas “islas CpG” (regiones ricas en dinucleótidos CG y características de las zonas cercanas a los promotores) son metiladas en la posición 5 de manera fisiológica en los organismos eucariotas. Las proteínas DNMTs (*DNA (cytosine-5)-MethylTransferases*) catalizan la transferencia del grupo metilo desde la SAM (*S-Adenosyl-L-Methionine*) a la posición 5 del anillo (figura 20). El porcentaje de citosinas metiladas, su distribución y las secuencias donde se encuentran varía entre especies. En mamíferos se asocia a cromatina transcripcionalmente inactiva, secuencias repetitivas como ALU, inactivación del cromosoma X y fenómenos de impronta genómica. La proporción de dinucleótidos CpG en el genoma humano se ha contabilizado cerca de un 1%, cantidad mucho menor de la esperada (4%) teniendo en cuenta la abundancia de citosinas y guaninas (42% de las bases) en las células [185, 186].

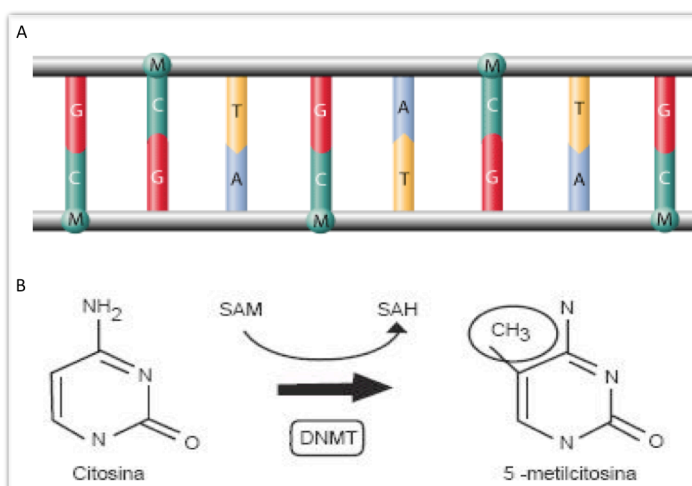


Fig 20. Metilación de citosinas en hebras complementarias; B: Las proteínas DNMTs (*DNA (cytosine-5)-MethylTransferases*) catalizan la transferencia del grupo metilo desde la SAM (*S-Adenosyl-L-Methionine*) a la posición 5 del anillo aromático



La presencia de residuos 5-metilcitosina en el ADN influye en la agrupación de diferentes enzimas, factores de transcripción y proteínas represoras en la región del ADN afectada. Algunas proteínas reconocen el ADN metilado y forman diversos complejos represores de la transcripción. Además, la metilación del ADN interfiere directamente con la unión de ciertos factores de transcripción como CREB (*Cyclic-AMP-Response-Element-Binding protein*), o SP1, o proteínas relacionadas con impronta genómica como CTCF (*CCCTC binding factor*) o BORIS (*Brother of the Regulator of the Imprinted Sites*) [187, 189-191]. Por otro lado, existen proteínas que se unen selectivamente a secuencias no metiladas del ADN, como la proteína CGBP (*CpG-Binding Protein*), que protege las zonas CpG de ser metiladas [186, 192].

Tanto la ganancia como la pérdida de metilación genómica (hipermetilación/hipometilación) se asocian frecuentemente con el proceso neoplásico de forma generalmente proporcional a la severidad de la enfermedad [184]. Los genomas de las células pre-neoplásicas, tumorales y envejecidas comparten cambios significativos en los niveles de metilación como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Por un lado, la hipometilación de la heterocromatina que causa inestabilidad genómica e incrementa la recombinación mitótica; por otro, la hipermetilación de las islas CpG en promotores de genes constitutivos y genes supresores de tumores. La hipo y la hipermetilación pueden presentarse independientemente o de forma simultánea, en general, la hipermetilación esta relacionada con el silenciamiento de genes (supresores) y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (oncogenes).

La hipermetilación aberrante de las regiones promotoras ocurre en muchos genes relacionados con cáncer como aquellos asociados al control del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN. Se puede detectar variación en el patrón de metilación entre tejido no tumoral y tejido tumoral indicando un cambio en la actividad génica que participa en la génesis del cáncer.

Normalmente, las islas CpG se metilan causando silenciamiento transcripcional en células tumorales. Los genes supresores de tumores suelen ser susceptibles a la desregulación por hipermetilación de su promotor lo que produce el agrupamiento de complejos represores en la zona afectada que reducen o inhiben completamente la expresión. Algunos ejemplos son el gen CKDN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), MLH1 (*MutL Homolog 1*), VHL (*Von Hippel-Lindau tumor suppressor*), Cadherina-E y el gen del retinoblastoma [125, 193, 194].

El análisis del ADN metilado se ha convertido en un poderoso biomarcador para la detección temprana de cáncer, además permite clasificar los cánceres considerando los subtipos histológicos, el grado de malignidad, diferencias en la respuesta al tratamiento y los diversos pronósticos.

En carcinoma de endometrio se encuentra metilación diferencial según se trate de EEC o NEEC lo que sugiere desarrollos epigenéticos divergentes y vías tumorigénicas únicas [195].

La hipermetilación se encuentra mas frecuentemente en los EEC que en los NEEC [196]. Muchos de los genes supresores de tumores que se encuentran mutados en los EEC pueden también sufrir inactivación mediante hipermetilación de sus promotores.

Se ha descrito una frecuencia de hipermetilación en cáncer de endometrio del 40% en el gen hMLH1, del 22% en el gen APC, del 14% en el gen de la E-cadherina y del 2,3% en el gen RAR- $\beta$  [197]. La inactivación del gen hMLH1 por hipermetilación del promotor se ha visto presente en la mayoría de los adenocarcinomas endometrioides que presentan MI, lo que sugiere que la metilación anormal es un paso anterior en la adquisición del fenotipo mutante en la carcinogénesis endometrial [182]. En el gen p16 no se ha encontrado hipermetilación del promotor. Otros genes inactivados por hipermetilación en cáncer de endometrio incluyen: PgR, HOXA11, THBS2, PEG3, GSTP1 [198-201], aunque el impacto que supone la metilación de estos genes aun no ha quedado bien establecida.



# *Hipótesis y Objetivos*

---



La hipótesis general en este trabajo ha sido la siguiente: “Existen alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores que juegan un papel primordial en el desarrollo y la progresión del cáncer de endometrio. Su análisis contribuirá a añadir nuevas claves en el descubrimiento de nuevas dianas de diagnosis y terapias individuales”, y el objetivo principal de este trabajo se ha basado en el análisis de las alteraciones sufridas por distintos oncogenes y genes supresores de tumores en series de muestras tumorales y no tumorales procedentes de pacientes con EEC (Tipo I) y NEEC (Tipo II). Tanto la hipótesis como el objetivo general, pueden ser desglosados en los siguientes:

1 Dado que el patrón de metilación de algunos promotores se encuentra frecuentemente alterado en adenocarcinoma endometrioide con inestabilidad de microsatélites y coincide frecuentemente con la existencia de mutaciones en K-RAS nuestra hipótesis al respecto plantea la posibilidad de que la hipermetilación del promotor de RASSF1A pueda resultar un fenómeno frecuente en carcinoma de endometrio.

El objetivo en este caso fue el estudio de la expresión del gen RASSF1A y del patrón de metilación de su promotor en carcinoma de endometrio así como relacionar ambos aspectos con la presencia de inestabilidad de microsatélites, mutaciones en el gen K-RAS y otros datos clínico-patológicos.

2 Las proteínas SPRY regulan las vías de señalización FGF y RAS-MAPK. Dado que estas dos vías se encuentran frecuentemente desreguladas en carcinoma de endometrio, la hipótesis que planteamos es la posibilidad de que las proteínas SPRY jueguen un papel importante como supresores de tumores en la tumorigénesis endometrial.

El objetivo aquí fue el análisis de expresión del gen SPROUTY2 y el estudio del patrón de metilación de su promotor en carcinoma de endometrio.

3 Mutaciones en los genes PIK3CA y PTEN coexisten frecuentemente en carcinoma de endometrio pero no queda claro si este suceso ocurre en células que sufren inactivación de PTEN de forma monoalélica o bialélica.

Los objetivos en este caso fueron el análisis de mutaciones en el gen PIK3CA, el estudio de la correlación de dichas mutaciones con diversas alteraciones en PTEN y con inestabilidad de microsatélites, así como con mutaciones en los genes K-RAS y CTNNB-1.

4 Dada la frecuencia de mutaciones del gen FGFR2 encontrada en carcinoma de endometrio (10-12%) manejamos la hipótesis de que el oncogén FGFR2 pueda ser una nueva diana terapéutica en este tipo de tumores.

## Hipótesis y Objetivos

En este caso, el objetivo fue el análisis de distintas alteraciones que afectan al gen FGFR2, estudiando tanto su expresión como la existencia de mutaciones y su relación con diversos factores clínico-patológicos así como con la expresión de los genes PTEN, RASSF1A y SPRY2, entre otros.

# *Resultados*

---





**1. LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DE RASSF1A Y LA DISMINUCIÓN DE SU EXPRESIÓN SON ALTERACIONES FRECUENTES EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

- 1.1 La expresión de RASSF1A sobre tejido endometrial normal varía dependiendo de la fase del ciclo menstrual.
- 1.2 La expresión de RASSF1A se encuentra reducida de manera significativa en carcinoma de endometrio con respecto a tejido endometrial normal.
- 1.3 La gran mayoría de los tumores de EC presentan hipermetilación del promotor del gen RASSF1A existiendo una relación con el estadio patológico del tumor.
- 1.4 La expresión de RASSF1A se encuentra reducida en aquellos casos que muestran hipermetilación del promotor.



# Promoter hypermethylation and reduced expression of *RASSF1A* are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma

Judit Pallarés<sup>1</sup>, Ana Velasco<sup>1</sup>, Nuria Eritja<sup>1</sup>, Maria Santacana<sup>1</sup>, Xavier Dolcet<sup>1</sup>, Miriam Cuatrecasas<sup>2</sup>, Victor Palomar-Asenjo<sup>1</sup>, Lluís Catasús<sup>2</sup>, Jaime Prat<sup>2</sup> and Xavier Matias-Guiu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Lleida, Spain and <sup>2</sup>Department of Pathology Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

Alterations in the regulation of the RAS–MAPK pathway are frequent in endometrial carcinoma. *RASSF1A* is a tumor-suppressor gene that can regulate this pathway negatively. *RASSF1A* has been found to be inactivated by promoter methylation in some human tumors. The aim of the study was to assess the immunohistochemical expression of *RASSF1A* in normal endometrium and endometrial carcinoma, and to correlate its expression with *K-RAS* mutations, presence of microsatellite instability, *RASSF1A* promoter methylation, and clinicopathological data. *RASSF1A* immunostaining was evaluated in one tissue microarray constructed from 80 paraffin-embedded samples of normal endometrium, and two tissue microarrays constructed with a total of 157 endometrial carcinomas (one constructed with 95 endometrial carcinomas previously evaluated for *K-RAS* mutations, and microsatellite instability, and another one containing 62 endometrial carcinomas that were also subjected to *RASSF1A* promoter methylation analysis). *RASSF1A* immunostaining was correlated with cell proliferation (Ki67), *Cyclin D1* expression and clinicopathological data. Promoter methylation of *RASSF1A* was assessed by methylation-specific PCR. *RASSF1A* immunostaining was variable during the menstrual cycle in normal endometrium. *RASSF1A* expression was significantly reduced in 48% of endometrial carcinomas, particularly in tumors exhibiting microsatellite instability. *RASSF1A*-promoter methylation was very frequent in endometrial carcinoma (74%), and was frequently associated with reduced expression of *RASSF1A*. *RASSF1A*-promoter hypermethylation was common in advanced-stage endometrial carcinoma. The results suggest that reduced expression of *RASSF1A* may play a role in endometrial carcinogenesis by controlling cell proliferation and apoptosis through the MAPK-signaling pathway.

*Modern Pathology* (2008) 21, 691–699; doi:10.1038/modpathol.2008.38; published online 9 May 2008

**Keywords:** endometrial carcinoma; *RASSF1A*; tissue microarray; promoter hypermethylation; *K-RAS*; microsatellite instability

Endometrial carcinomas can be classified in two main types;<sup>1</sup> type I are endometrioid adenocarcinomas.<sup>2</sup> They usually develop in perimenopausal women and are related to estrogen stimulation. Endometrioid adenocarcinoma may show microsatellite instability<sup>3</sup> and mutations of the *PTEN*,<sup>4</sup> *PIK3CA*,<sup>5</sup> *K-RAS*<sup>6</sup> and  $\beta$ -catenin genes.<sup>7,8</sup> Type-II tumors are non-endometrioid carcinomas, which

tend to occur in older women, are unrelated to estrogen stimulation and are frequently associated to p53 mutations and chromosomal instability.<sup>9</sup>

The RAS-signaling pathway plays an important role in tumorigenesis. Mutations in the *RAS* oncogene have been detected in many different types of tumors. The RAS superfamily of small GTP-binding proteins has a fundamental role in cell growth and differentiation, transcriptional regulation and apoptosis. The frequency of *K-RAS* mutations in endometrial carcinoma ranges between 10 to 30%.<sup>6</sup> In some series, *K-RAS* mutations have been reported to be more frequent in endometrioid adenocarcinoma showing microsatellite instability.<sup>6</sup> In these tumors, *K-RAS* mutations are typically transitions, which may be preceded by abnormal DNA methylation.

Correspondence: Dr J Pallarés, MD, PhD, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Av Alcalde Rovira Roure 80, Lleida 25198, Spain.

E-mail: jpallares@arnau.scs.es

Received 30 August 2007; revised and accepted 23 January 2008; published online 9 May 2008

The fact that in endometrioid adenocarcinoma, microsatellite instability frequently coexists with *K-RAS* methylation-related transitions has led to the suggestion that these two alterations are close related.

The *RASSF1A* gene has been recently identified and mapped to chromosome 3p.21.3. *RASSF1A* is the longest isoform of *RASSF1*, a new group of RAS effectors thought to regulate cell proliferation and apoptosis.<sup>10</sup> Expression of *RASSF1A* has been detected in any normal tissue tested. However, *RASSF1A* transcripts have been found to be lost in several cancer cell lines. Also, re-expression of *RASSF1A* dramatically reduces cell growth of tumor cells, supporting a role for *RASSF1A* as a tumor-suppressor gene. The *RASSF1A* gene is epigenetically inactivated in a large percentage of different human malignancies, including cancers of the lung, breast, kidney, bladder, stomach, ovary and neuroblastoma.<sup>11</sup>

*RASSF1A* can either associate with oncogenic/mutant *K-RAS* or with GTP-bound *K-RAS* through heterodimerization with *NORE1*, a RAS-GTP-binding protein.<sup>12</sup> This assumption raises the hypothesis of *K-RAS-BRAF-RASSF1A* genes as partners in the same pathway.

Promoter methylation is a frequent mechanism of gene inactivation of endometrioid adenocarcinoma. It may involve many different genes participating in cell signalling, apoptosis and cell proliferation (*p14*, *PTEN*, *p16*, *TSP-1*, *IGF-2*, estrogen receptor- $\alpha$ , *HIC-1*, *MLH-1*). Inactivation of *hMHL-1* by promoter hypermethylation is present in the majority of endometrioid adenocarcinoma with microsatellite instability, which suggests that abnormal methylation is the first step in the acquisition of the mutator phenotype in endometrial carcinogenesis.<sup>13</sup> Since altered methylation status is frequent in endometrioid adenocarcinoma with microsatellite instability, and also frequently coexists with *K-RAS* mutations, we may hypothesize that *RASSF1A* promoter hypermethylation could be frequent in endometrial carcinoma, possibly coexisting with any of these phenomena.

The main aim of the present study was to assess the frequency of reduced expression of *RASSF1A* and *RASSF1A*-promoter hypermethylation in endometrial carcinoma in correlation with the presence of microsatellite instability, *K-RAS* mutations and clinicopathological data. Also, the purpose of this study was to assess immunohistochemical expression of *RASSF1A* in normal endometrium, in different phases of the menstrual cycle, using microarray technology.

## Materials and methods

### Tissue Microarrays

Three tissue microarrays were constructed. The first tissue microarray was constructed from 80

paraffin-embedded samples of normal endometrium in different phases of the menstrual cycle, obtained from the surgical pathology files from Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. The second tissue microarray was composed of 95 endometrial carcinomas, previously evaluated for *K-RAS* mutations and microsatellite instability.<sup>3,6</sup> The third tissue microarray was constructed from 62 endometrial carcinomas that were also subjected to *RASSF1A*-promoter methylation (see below). Overall, the two last tissue microarrays comprised 157 endometrial carcinomas, obtained from the surgical pathology files of Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida and Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain. They included 47 grade-I endometrioid adenocarcinomas, 58 grade-II endometrioid adenocarcinomas, 26 grade III endometrioid adenocarcinomas, 15 serous carcinomas, four clear-cell carcinomas and seven mixed Müllerian malignant tumors. One hundred and eight tumors were stage-I, 15 stage-II carcinoma, 22 stage-III and one was a stage-IV carcinoma. Staging information was incomplete for 11 cases. The study was approved by the local ethical committee. Specific informed consent was obtained from all subjects.

A Tissue Arrayer device (Beecher Instrument, MD, USA) was used to construct tissue microarrays. Briefly, all the samples were histologically reviewed and representative areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in largest diameter) from two different areas were included in each case. Control normal tissues from the same endometrial carcinoma specimens were also included.

### Immunohistochemical Study

Tissue-microarray blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m, dried for 16 h at 56° before being de-waxed in xylene and rehydrated through a series of graded ethanol concentrations, followed by wash with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 min in EDTA (pH 8.9). Before staining sections, endogenous peroxidase activity was blocked. The antibodies used were as follows: anti-*RASSF1A* (1:500 dilution; eB114-20H1; eBioscience), Ki67 (1:100 dilution; MIB-1; Dako) and cyclin D1 (1:25 dilution; DCS6; Dako). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection kit (Dako), using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were also tested.

Immunohistochemical results were evaluated by two pathologists following uniform pre-established criteria. *RASSF1A* immunoexpression was graded semi-quantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score

was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula: Histoscore =  $1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate staining}) + 3 \times (\% \text{ strong staining})$ . The reliability of such score for interpretation of immunohistochemical staining in endometrial carcinoma tissue microarrays has been proven previously.<sup>14–17</sup> Since each tissue microarray included two different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was conducted after examining both samples. Finally, the percentage of positive nuclei in each case was used to assess the cellular proliferation (Ki67) and the cyclin D1 expression.

The reproducibility of tissue-microarray immunostaining was confirmed by comparing results from tissue microarray with those obtained in sections from the corresponding paraffin blocks of 37 randomly selected cases. The overall concordance was 89.2%. The Kappa index of agreement between the two methods ranged from 0.68 to 0.83.

### Methylation-Specific PCR

Genomic DNA was isolated with the DNAeasy tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), from normal and tumor tissue from 57 patients with endometrial carcinoma. Samples were frozen after surgery and corresponded to 57 of the 62 endometrial carcinoma samples of the third tissue microarray. A specific informed consent was used and the study was approved by the local ethical committee. DNA was subjected to bisulfite treatment. Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of DNA was denatured by sodium hydroxide and modified by sodium bisulfite. DNA samples were then purified and treated again with sodium hydroxide, precipitated with ethanol and resuspended in water (EZ DNA Methylation kit; ZYMO RESEARCH, USA). *RASSF1A*-promoter methylation status was determined following protocols from previous studies.<sup>18</sup> DNA was amplified with primers MF (GTGTTAACGCGTTGCGTATC) and MR (AACCCCGCGAACTGAAAAACGA) for methylated DNA and UF (TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG) and UR (CAAACCCACAAAATAAAACAA) for unmethylated DNA. Each PCR reaction contained 1  $\times$  buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 U/ $\mu\text{l}$  TaqGold (Applied Biosystems Inc., Santa Clara, CA, USA); 0.2 mM dNTPs (Biotools B&M Labs, SA, Madrid, Spain) and 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer. PCR conditions were as follows: an initial 10-min denaturation at 96°C followed by two cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 67°C, 30 s at 72°C; an additional two cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 65°C, 30 s at 72°C, a further two cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 63°C, 30 s at 72°C cycles and a final extension step of 10 min at 72°C. Each PCR product was directly loaded on 3% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV illumination.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with a database using SPSS for Windows (version 11.5; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Immunohistochemical results were compared by Mann–Whitney *U* and Student's *t*-test when applicable. Associations between qualitative variables were assessed by  $\chi^2$ - or Fisher's exact tests. Correlations between quantitative variables were established through Pearson and Spearman  $\rho$  tests. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

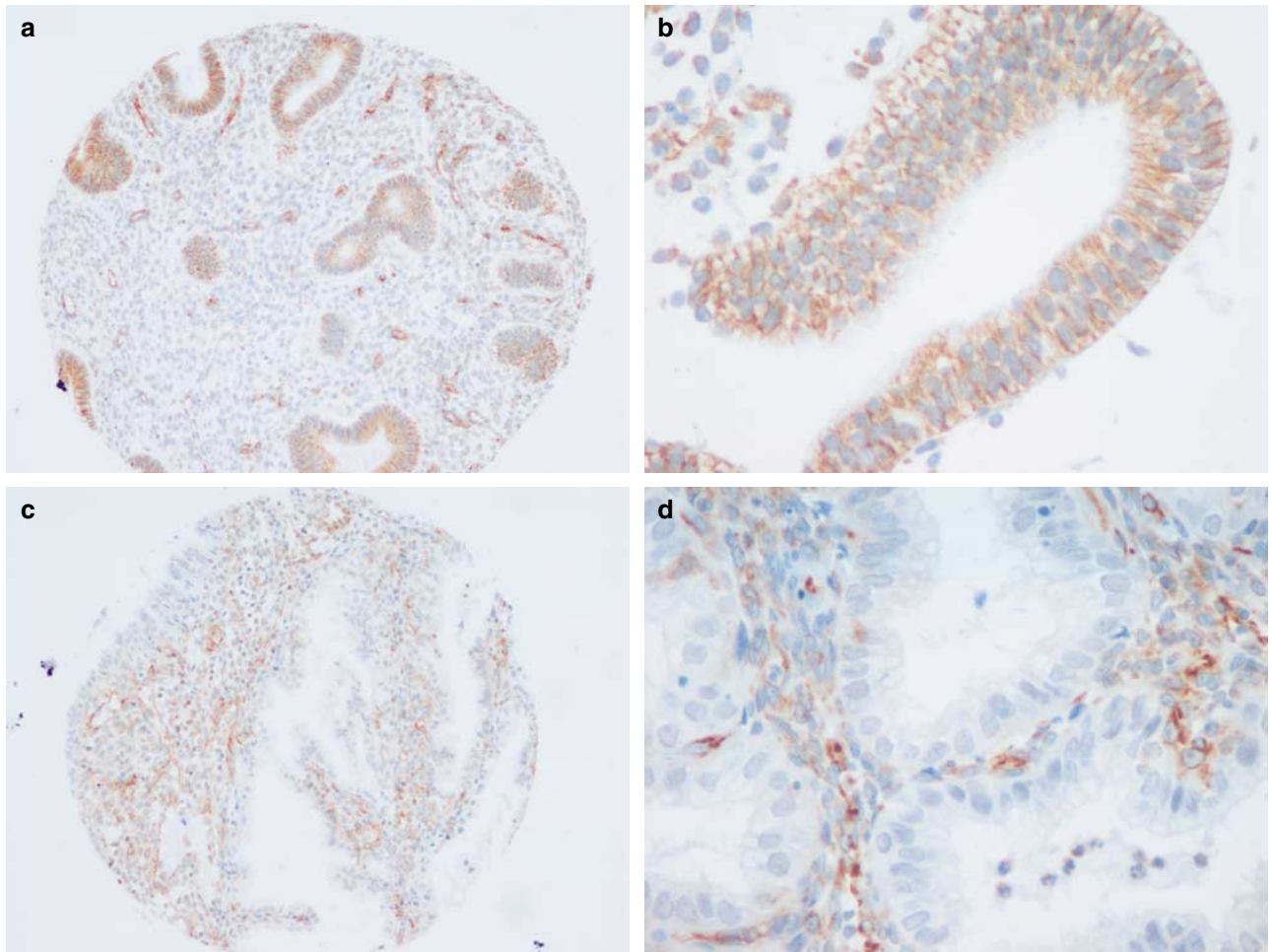
## Results

### Immunohistochemistry

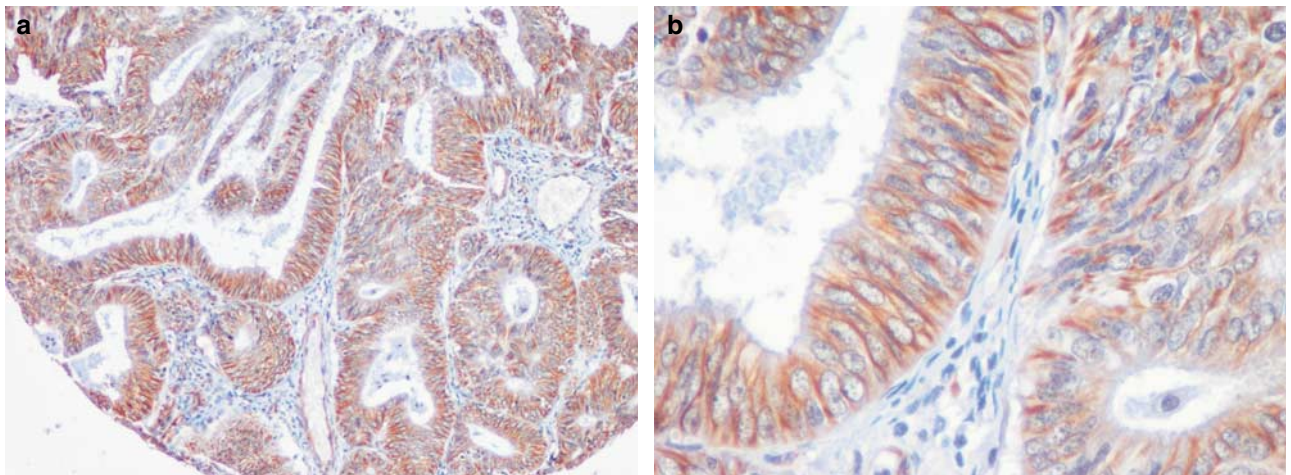
In normal endometrium, *RASSF1A* was evaluated in all the 80 cases that were included in the first tissue microarray. *RASSF1A* immunostaining varied according to the different phases of the menstrual cycle. *RASSF1A* immunoreexpression was significantly higher in the proliferative phase (mean Histoscore, 45.96) than in the secretory endometrium (mean Histoscore, 31.58) ( $P = 0.001$ ) (Figure 1). Staining was cytoplasmic. Stromal cells were positive in both, the proliferative and the secretory phases.

In endometrial carcinoma, *RASSF1A* was evaluated in 148 out of the 157 cases that were included in the second and third tissue microarrays. Six cases were excluded as there was no representative tumor tissue in the tissue microarray sections, and three cases were missed in the construction of tissue microarray. Overall, *RASSF1A* immunoreexpression was significantly reduced in endometrial carcinoma as compared with normal endometrium. Mean *RASSF1A* Histoscore was 38.28 in endometrial carcinoma and 70.00 in normal endometrium ( $P = 0.007$ ). We observed negative staining for *RASSF1A* in 71 cases of endometrial carcinoma (48%), whereas remaining 77 cases were positive (52%). Staining was cytoplasmic and heterogeneous, and Histoscore ranged from 10 to 290 (Figures 2 and 3). Nuclear immunostaining was observed in 11 cases.

A slightly reduced *RASSF1A* immunostaining was observed in non-endometrioid endometrial carcinomas (mean Histoscore, 25.25) as compared with endometrioid endometrial carcinoma (mean Histoscore, 30.18). However, these differences were not statistically significant ( $P = 0.457$ ). The correlation between *RASSF1A* immunoreexpression and histological grade or pathological stage did not get any significant difference ( $P = 0.771$  and  $P = 0.303$ , respectively). There was no significant correlation between cell proliferation (Ki67) and *RASSF1A* immunoreexpression ( $r = 0.088$ ,  $P = 0.446$ ). Cyclin D1 nuclear expression was observed in 64.79% cases of endometrial carcinoma, and no correlation was found with *RASSF1A* protein expression ( $P = 0.635$ ).



**Figure 1** RASSF1A immunostaining was higher in the proliferative phase (a, b) than in the secretory phase (c, d).

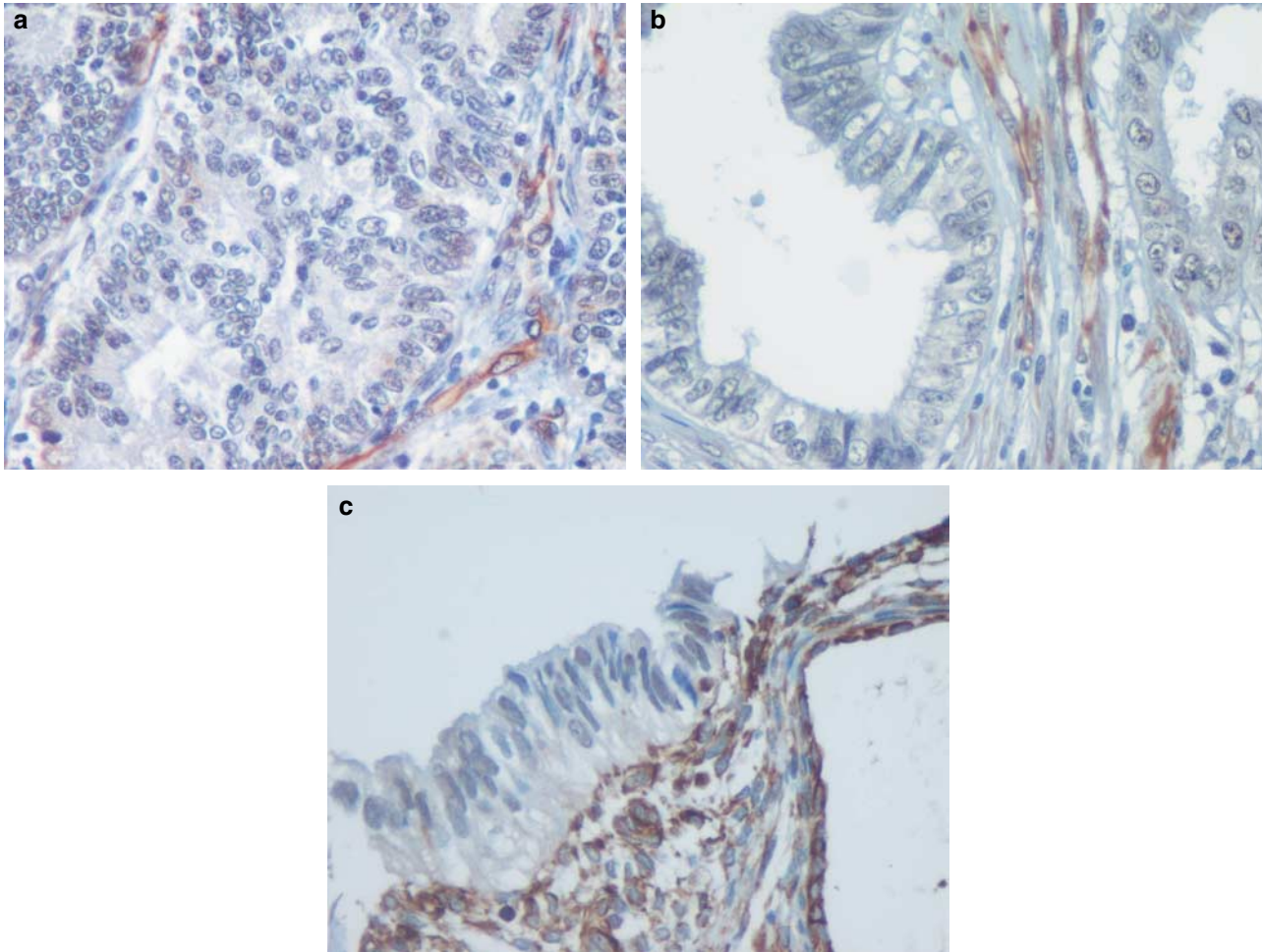


**Figure 2** RASSF1A immunoeexpression in an endometrial carcinoma without *RASSF1A*-promoter hypermethylation. Notice the strong cytoplasmic staining (a, b).

Finally, RASSF1A immunoeexpression was correlated with microsatellite instability and *K-RAS* mutations in 67 cases of endometrial carcinoma

from the second tissue microarray. No significant correlation was found when we considered total absence of RASSF1A expression (Histscore 0) as





**Figure 3** RASSF1A immunostaining in an endometrial carcinoma with *RASSF1A*-promoter hypermethylation. Notice that the cytoplasmic staining (a, b) is lower than in the case illustrated in Figure 2a and b. The corresponding normal tissue, exhibited positive staining (c).

negative ( $P=0.510$  and  $P=0.294$ ). However, association between RASSF1A immunostaining and presence of microsatellite instability turned out to be significant when we considered as negative those endometrial carcinoma with a Histocore less than 50. In other words, 18 of the 20 endometrial carcinomas with microsatellite instability exhibited Histocores less than 50 ( $P=0.042$ ) (Table 1). Moreover, seven from the 10 cases with *K-RAS* mutations were negative for RASSF1A immunorexpression (Histocore less than 50), but differences were not statistically significant ( $P=0.540$ ) (Table 1).

### **RASSF1A-Promoter Hypermethylation**

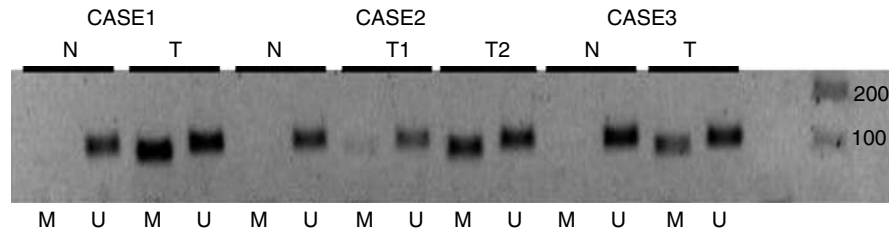
*RASSF1A*-promoter hypermethylation was detected in 42 of the 57 (74%) endometrial carcinoma samples that were tested (Figure 4). In some cases, the degree of promoter methylation varied in different areas of the tumor (Figure 4, case 2, T1 and T2). Promoter methylation was not detected in normal tissue samples from the same patients with

**Table 1** RASSF1A immunorexpression according to microsatellite instability and *K-RAS* mutational status

	Microsatellite instability		K-RAS mutations	
	Positive	Negative	Positive	Negative
RASSF1A positive	2	16	3	15
RASSF1A negative (Hscore < 50)	18	31	7	42
Total	20	47	10	57

endometrial carcinoma. Interestingly, the frequency of *RASSF1A*-promoter methylation increased in correlation with pathological stage (Table 2). *RASSF1A*-promoter methylation was observed in 67% of stage-IA or stage-IB endometrial carcinoma cases (18/26) as compared with 80% of stage-IC endometrial carcinomas (10/14) and 100% of stage-IIIa endometrial carcinomas (6/6). The vast majority of *RASSF1A* unmethylated tumors were stage-IA endometrial carcinomas (54.5%) (6/11), and only two





**Figure 4** MS-PCR for the *RASSF1A* gene in endometrial carcinoma and normal tissue. U, PCR product with primers specific for unmethylated DNA; M, PCR product with primers specific for methylated DNA. *RASSF1A* is methylated in the three cases of endometrial carcinoma. Notice that the degree of promoter hypermethylation differed between two different areas of one tumor (T1 and T2) of case 2.

**Table 2** *RASSF1A* methylation status according to pathological stage

Stage	<i>RASSF1A</i> methylated	<i>RASSF1A</i> unmethylated	Total
IA	5	6	11
IB	13	3	16
IC	10	4	14
IIA	2	0	2
IIB	6	2	8
IIIA	6	0	6

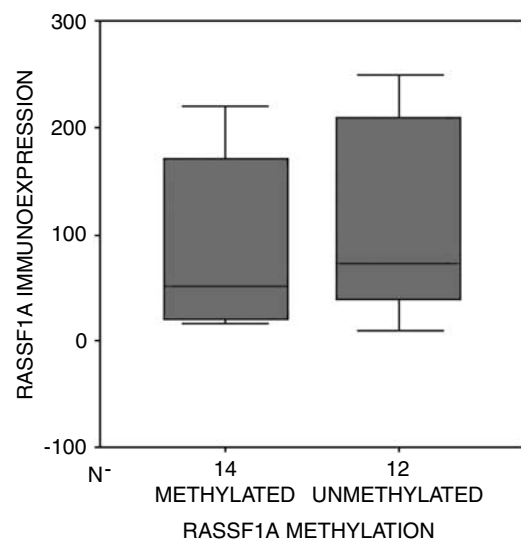
of the 16 stage-II or stage-III endometrial carcinomas were unmethylated (12%). *RASSF1A*-promoter hypermethylation was more frequent among endometrioid carcinomas (75%) (37 of 49 cases) as compared with non-endometrioid carcinomas (62.5%) (5 of 8 cases), but these differences were not statistically significant ( $P=0.422$ ). *RASSF1A* was also analyzed in correlation with histological grade. Grade-I and grade-II endometrial carcinomas were more frequently methylated (71 and 86%, respectively) than grade-III tumors (57%). However, the differences were not significant ( $P=0.152$ ).

#### Correlation between *RASSF1A* Immunostaining and *RASSF1A*-Promoter Hypermethylation

Finally, we assessed the correlation between *RASSF1A* immunoexpression and the methylation status of the promoter region of the gene in 53 of the 57 initial cases studied for *RASSF1A*-promoter hypermethylation. *RASSF1A* was methylated in 26 of 27 cases negative for *RASSF1A* immunostaining (Table 3). As expected, *RASSF1A* protein expression was dramatically reduced in cases with *RASSF1A*-promoter methylation (mean Histoscore, 30.38) as compared with unmethylated cases (mean: 101.92), and differences were statistically significant ( $P=0.000$ ). However, 14 cases exhibited *RASSF1A* immunostaining in the presence of *RASSF1A*-promoter methylation. Interestingly, *RASSF1A* staining in these cases was heterogeneous and weaker. A comparison between cases with positive or negative *RASSF1A*-promoter hypermethylation among endometrial carcinoma with

**Table 3** Correlation between methylation and *RASSF1A* immunoexpression

	<i>RASSF1A</i> methylated	<i>RASSF1A</i> unmethylated	Total
<i>RASSF1A</i> -positive immunostaining	14	12	26
<i>RASSF1A</i> -negative immunostaining	26	1	27



**Figure 5** Box-plot comparison of *RASSF1A* immunoexpression and methylation status.

positive *RASSF1A* staining was performed. Interestingly, endometrial carcinoma cases with *RASSF1A*-promoter methylation showed reduced *RASSF1A* immunoexpression (mean Histoscore, 86.09) as compared with unmethylated cases (mean Histoscore, 110.42) (Figure 5), but these differences were not significant ( $P=0.274$ ).

#### Discussion

Epigenetic inactivation is defined as a change imposed onto the functionality of a gene that does not involve an alteration of its coding sequence. Transcriptional silencing by hypermethylation of

CpG islands in the promoter regions of tumor-suppressor genes is becoming a common phenomenon in carcinogenesis. Although this phenomenon is seen in a wide spectrum of tumors, it is a frequent mechanism of tumor-suppressor gene inactivation in endometrial carcinoma. *De novo* methylation of the *RASSF1A* promoter is one of the most frequent inactivation events detected in human cancer and leads to silencing of *RASSF1A* expression.<sup>11</sup> The C-terminus of RASSF1A is homologous to the mammalian RAS-effector protein NORE1 and encodes a RAS-association domain. Three major splice variants, RASSF1A, RASSF1B and RASSF1C, are transcribed from two different CpG islands, separated approximately by 3.5 kb.<sup>19</sup>

In the present study, we have assessed the immunohistochemical expression and the presence of promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene in a series of endometrial carcinomas, and detected reduced expression of RASSF1A in 48% of the cases and promoter hypermethylation in 73%. Moreover, there was a statistically significant association between both the phenomena. Although *RASSF1A*-promoter hypermethylation has previously been evaluated in endometrial carcinoma, this is the first study in the literature to demonstrate that it is associated with reduced RASSF1A protein expression, in a large series of endometrial carcinoma and a tissue-microarray approach. In other studies, the frequency of *RASSF1A*-promoter hypermethylation in endometrial carcinoma has been reported to be between 30 and 85%, as found by methylation-specific PCR (MS-PCR).<sup>20,21</sup> Moreover, in a recent study Kang *et al* found promoter hypermethylation in two of four endometrial carcinoma cell lines tested for promoter hypermethylation (*AN3-CA*, *HEC-1-B*, *KLE*, *RL95-2*). They also demonstrated that endometrial carcinoma cell lines with promoter hypermethylation, treated with 5-aza-2-deoxycytidine, a drug that inhibits DNA methylation, restored *RASSF1A* expression.

RASSF1A protein expression was heterogeneous in our endometrial carcinoma samples. Some cases were RASSF1A positive in many areas and negative in some foci, and also some RASSF1A-negative samples contained a small proportion of cells showing strong staining. In our opinion, the heterogeneous distribution of *RASSF1A*-promoter hypermethylation is the reason that explains why we detected *RASSF1A*-promoter hypermethylation in tumors with positive immunostaining for RASSF1A. This phenomenon can also be found in other types of tumors and with other genes that are silenced by promoter methylation. For example, it has recently been seen that a heterogeneous protein expression of some genes, including *RASSF1A*, is seen in about 70% of malignant melanoma cases, due to intra-tumoral distribution of promoter hypermethylation.<sup>22</sup>

During tumorigenesis, activated *RAS* is usually associated with enhanced proliferation, transformation

and cell survival. *RAS* effectors, like RASSF1A, are supposed to have an inhibitory growth signal, which needs to be inactivated during tumorigenesis. Contradictory results between RASSF1A inactivation and *K-RAS* mutation have been obtained using different types of tumors. They were mutually exclusive events in colorectal and pancreatic cancer,<sup>23,24</sup> but the correlation was not significant in lung cancer.<sup>25</sup> Finally, in thyroid cancer, *RASSF1A* methylation is mutually exclusive with mutations in *BRAF*.<sup>26</sup> Since *BRAF* mutations are very infrequent in endometrial carcinoma, we focused our interest in the correlation between *RASSF1A* inactivation and *K-RAS* mutations and microsatellite instability.

In our series of endometrial carcinoma, seven out of 10 cases with *K-RAS* mutations were negative for RASSF1A immunoeexpression. Kang *et al* found *RASSF1A* hypermethylation to be associated very strongly with microsatellite instability, and inversely correlated with *K-RAS/BRAF* mutations in microsatellite instability-negative endometrial carcinomas. Very recently, Pijnenborg *et al* reported *RASSF1A* hypermethylation in 85% of recurrent endometrial carcinoma, without finding any correlation between *RASSF1A*-methylation status and *K-RAS* or *BRAF* mutations. Interestingly, they demonstrated hypermethylation of *RASSF1A* in samples of endometrial hyperplasias (50%), cyclic (21%) and atrophic endometrium (38%). The authors suggest a role of *RASSF1A* methylation as an early event in endometrial carcinogenesis. However, we have not been able to detect *RASSF1A*-promoter hypermethylation in any of the normal tissue samples corresponding to the 57 cases of endometrial carcinoma. Moreover, the staining pattern that we obtained in normal endometrial tissue was dependent on the menstrual cycle phase, which suggests that in normal endometrium, *RASSF1A* is under the regulation of steroid hormone-signaling pathways.

Microsatellite instability occurs in 25–30% of sporadic endometrial carcinoma, and is characteristic of endometrioid adenocarcinoma. The identification of CpG-island methylation in several genes in colonic and gastric carcinomas with microsatellite instability suggested a relationship between altered methylation and the microsatellite-mutator phenotype. In the present study, we analyzed the possible association between *RASSF1A* expression and the microsatellite instability status in our tissue-microarray approach. We observed a statistically significant association between decreased RASSF1A protein expression and microsatellite instability when we considered as negative those tumors exhibiting RASSF1A HistoScore of less than 50. Our results support the data of Kang and co-workers who also demonstrated that *RASSF1A* methylation was strongly associated with microsatellite instability and *hMLH-1* methylation. Similar results were also obtained in colorectal cancer in which a higher frequency of *RASSF1A*-promoter methylation has

been described in microsatellite instability + colorectal cancers as compared with tumors without the microsatellite instability phenotype. The results suggest that the methylation affecting *RASSF1A* promoter may preferentially occur within the context of microsatellite instability + endometrioid adenocarcinoma.

In the present series, we have observed a higher frequency of *RASSF1A*-promoter methylation in correlation with advanced pathological stage and poorly differentiated carcinomas. In agreement with this result, Jo *et al*,<sup>27</sup> found that *RASSF1A* methylation was significantly more frequent in endometrial carcinoma in association with advanced stage (III, IV), lymph node involvement and high histological grade. Moreover, they demonstrated higher incidence of recurrences and lower disease-free survival in patients with *RASSF1A* hypermethylation.

Finally, we noted a nuclear immunostaining of *RASSF1A* in some cases of endometrial carcinoma. Biochemical studies have demonstrated that *RASSF1A* is a microtubule-binding protein, which regulates mitotic progression.<sup>28</sup> It has also been shown that *RASSF1A* overexpression induces mitotic arrest at the metaphase with aberrant mitotic cells.<sup>28</sup> *RASSF1A* regulates mitosis by inhibiting the anaphase-promoting complex through *Cdc20*, and induces G2–M arrest at the prometaphase. Also, *RASSF1A* prevents degradation of cyclin D1 and delays mitotic progression.<sup>29</sup> *RASSF1A* is also able to affect other cyclins, such as cyclin D3 or cyclin A, through interaction with transcription factor p120<sup>E4F</sup>, which induces cell-cycle arrest and provides a mechanistic link with other known tumor-suppressor genes such as *p14<sup>ARF</sup>*, *Rb* and *p53* that are known to interact with p120<sup>E4F</sup>.<sup>30</sup> To evaluate the possible relationship between *RASSF1A* and the cell-cycle machinery, we checked the relation between *RASSF1A* expression with cyclin D1 expression or proliferation index (Ki67 staining), but found no significant association.

In summary, we report, for the first time, reduced protein expression of *RASSF1A* in endometrial carcinoma using tissue-microarray technology, and reduced *RASSF1A* immunorexpression in cases with promoter hypermethylation. Also, we demonstrate higher frequency of *RASSF1A*-promoter methylation in advanced endometrial carcinoma stage, suggesting that *RASSF1A* could be a useful indicator of tumor aggressiveness in endometrial carcinoma patients.

## Acknowledgements

This work was supported by grants FIS PI060577, FIS PI070276, SAF2002-10529-E, SAF2004-05250; Marató de TV3 2005-47 and programa de intensificación de la investigación, Instituto Carlos III. XD holds a postdoctoral fellowship from Fondo de

Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028).

## Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

## References

- 1 Bockman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10–17.
- 2 Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, *et al*. Molecular Pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:569–577.
- 3 Catusus L, Machín P, Matias-Guiu X, *et al*. Microsatellite instability in endometrial carcinomas. Clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998;29:1160–1164.
- 4 Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, *et al*. PTEN mutations in endometrial carcinomas. A molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum Pathol* 2000;31:312–317.
- 5 Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, *et al*. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2006;37:1465–1472.
- 6 Lagarda H, Catusus L, Argüelles RM, *et al*. k-RAS mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193–199.
- 7 Machin P, Catusus L, Pons C, *et al*. CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:206–212.
- 8 Moreno-Bueno G, Hardisson D, Prat J, *et al*. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981–7990.
- 9 Prat J, Oliva E, Lerma E, *et al*. Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10 case study of p53 and c-erbB 2 expression and DNA content. *Cancer* 1994;74:1778–1783.
- 10 Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, *et al*. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (*RASSF1A*) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2003;18:665–677.
- 11 Pfeiffer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene *RASSF1A* in human tumors. *Biochem* 2005;70:576–583.
- 12 Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, *et al*. The putative tumor suppressor *RASSF1A* homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 2002;21:1381–1390.
- 13 Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, *et al*. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1767–1772.
- 14 Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, *et al*. Abnormalities in NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204:569–577.
- 15 Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, *et al*. Survivin expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24:247–253.
- 16 Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, *et al*. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:719–727.

- 17 Dolcet X, Llobet D, Pallares J, *et al*. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest* 2005;85:885–894.
- 18 Nakamura N, Carney JA, Jin L, *et al*. RASSF1A and NORE1A methylaton and BRAF<sup>V600E</sup> mutations in thyroid tumors. *Lab Invest* 2005;85:1065–1075.
- 19 Dammann R, Li C, Yoon JH, *et al*. Epigenetic inactivation of a Ras-association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25:315–319.
- 20 Kang S, Lee JM, Jeon ES, *et al*. RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2006;119:1316–1321.
- 21 Pijnenborg JMA, Dam-de Veen GC, Kisters N, *et al*. RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutations and recurrent endometrial cancer. *Ann Oncol* 2007;18:491–497.
- 22 Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C, *et al*. Frequent intra-tumoral heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma. *Histol Histopathol* 2007;22:1005–1015.
- 23 Van Engeland M, Roemen GM, Brink M, *et al*. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 2002;21:3792–3795.
- 24 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, *et al*. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003;22:3806–3812.
- 25 Kim DH, Kim JS, Park JH, *et al*. Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:6206–6211.
- 26 Xing M, Cohen Y, Mambo E, *et al*. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:1664–1668.
- 27 Jo H, Kim JW, Kang GH, *et al*. Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer. *Oncol Res* 2006;16:205–209.
- 28 Liu L, Tommasi S, Lee DH, *et al*. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* 2003;22:8125–8136.
- 29 Song MS, Song SJ, Ayad NG, *et al*. The tumor suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC–Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 2004;6:129–137.
- 30 Fajas L, Paul C, Vié A, *et al*. Cyclin A is a mediator of p120E4F-dependent cell cycle arrest in G1. *Mol Cell Biol* 2001;21:2956–2966.



## **2. LA HIPERMETILACION DEL PROMOTOR Y LA EXPRESION DEL GEN SPROUTY2 EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

- 1.1 La expresión de SPRY2 sobre tejido endometrial normal varía dependiendo de la fase del ciclo menstrual.
- 1.2 La expresión de SPRY2 en tumores de carcinoma de endometrio es mayor que en endometrio normal en la fase proliferativa.
- 1.3 Existe una relación inversa entre el índice de proliferación celular (Ki67) y la expresión de SPRY2 en los tumores de carcinoma de endometrio.
- 1.4 La hipermetilación del promotor de SPRY2 es un hecho frecuente en carcinoma de endometrio.
- 1.5 La hipermetilación del promotor de SPRY2 se encuentra con cierta frecuencia en las muestras no tumorales de endometrio.





## Original contribution

# Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma<sup>☆</sup>

Ana Velasco BSc, Judit Pallares MD, PhD<sup>\*</sup>, Maria Santacana BSc, Sonia Gatus MD, Melisa Fernandez MD, Monica Domingo, Joan Valls PhD, Andree Yeramian PhD, Mario Encinas PhD, Xavier Dolcet PhD, Xavier Matias-Guiu MD, PhD

Department of Pathology and Molecular Genetics and Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, 25198 Lleida, Spain

Received 15 March 2010; revised 2 August 2010; accepted 3 August 2010

**Keywords:**

Endometrial carcinoma;  
Sprouty2;  
Tissue microarray;  
Promoter  
hypermethylation

**Summary** Sprouty 2 is a key antagonist regulator of receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, like fibroblastic growth factor (FGF) and Ras-mitogen-activated protein kinase (RAS-MAPK). By controlling these pathways, sprouty 2 is involved in regulation of cell proliferation, differentiation, and angiogenesis. Alterations in fibroblastic growth factor receptor (FGFR) and members of the RAS-MAPK pathway are frequent in endometrial carcinoma. The expression of sprouty 2 has been found to be decreased in several types of human cancer, by mechanisms of promoter methylation. In the present study, we have assessed the expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma, in correlation with sprouty 2 promoter methylation. Sprouty 2 immunohistochemical expression was assessed using 3 different tissue microarrays: one constructed from paraffin blocks of 80 samples of normal endometrium and 2 tissue microarrays containing samples of 157 endometrial carcinoma (1 tissue microarray constructed with 95 endometrial carcinomas previously studied for microsatellite instability and alterations in phosphatase and tensin homolog (PTEN), k-ras, and b-catenin, and 1 tissue microarray containing 62 endometrial carcinoma, which were also subjected to sprouty 2 promoter methylation analysis). The immunohistochemical expression of sprouty 2 was correlated with cellular proliferation (Ki67) and clinicopathologic data. Sprouty 2 promoter methylation was assessed by methylation-specific polymerase chain reaction, with DNA obtained from fresh-frozen samples of endometrial carcinoma and corresponding normal tissues, and correlated with promoter methylation of RAS association domain family-1A (RASSF1A). A highly significant decrease in sprouty 2 immunoexpression was seen in the proliferative phase of normal endometrium ( $P < .001$ ). Differences were detected between types I and II endometrial carcinoma, but they were not statistically significant. Reduced immunoexpression of sprouty 2 was seen in 19.85% of endometrial carcinoma and was strongly and inversely associated with increased cell proliferation (Ki67;  $r = -0.367$ ;  $P = .001$ ). Sprouty 2 promoter methylation was detected in 31 (53.4%) of 58 endometrial carcinomas. Results from our study show that alterations in sprouty 2 may be involved in endometrial carcinogenesis by controlling cell proliferation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Supported by grants FIS PI060577, FIS PI070276, Marató de TV3 2005-47, 2009SGR794, and RD06/0020/134 from the Instituto de Salud Carlos III. X. D. holds a postdoctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028). A.Y. holds a postdoctoral fellowship from Programa Juan de la Cierva, Ministerio de Ciencia e Innovación. (JCI-2008-1969). Tumor samples were obtained with the support of Xarxa catalana de Bancs de Tumors, the Tumor Banc Platform of RTICC and RD09/0076/00059.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: jpallares@arnau.scs.es (J. Pallares).



## 1. Introduction

Endometrial carcinoma (EC) is one of the most common gynecologic malignancies [1]. Currently, there are 2 different clinicopathologic subtypes of EC. Type I EC, or endometrioid EC (EEC) [2], is an estrogen-related tumor and shows defects in DNA-mismatch repair genes [3] and alterations in phosphatase and tensin homolog (PTEN) [4], phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA) [5], K-ras [6], and *b*-catenin [7,8]. Type II EC, or nonendometrioid EC (NEEC), is frequently associated with aneuploidy and p53 mutations [9].

Alterations in receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream signaling pathways are frequent in EC. Somatic mutations in the RTK fibroblastic growth factor receptor 2 (FGFR2), identical to the germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes, have been recently detected in 10% to 12% of EC, particularly in EEC (16%) [10]. FGFR2 oncogenic mutations are associated with increased function of the FGF signaling pathway and downstream pathways, like Ras-mitogen-activated protein kinase (RASSF1A). The RAS-signaling pathway plays an important role in tumorigenesis. It is composed of a superfamily of small guanosine 5 $c$ -triphosphate-binding proteins that have a fundamental role in cell growth and cell differentiation, transcriptional regulation, and apoptosis. The frequency of K-RAS mutations in EC ranges between 10% and 30% [6]. In some series, K-RAS mutations have been reported to be more frequent in EEC showing microsatellite instability. Inactivation of RASSF1A, which is a negative regulator of the RAS-MAPK pathway, is also frequent in EC [11].

RTK-mediated signaling events are precisely regulated to ensure a physiologically appropriate biologic outcome. The control of RTKs function can be achieved by a mechanism of negative-feedback loop [12]. Sprouty (SPRY) proteins are some of these regulators and have been identified as repressors of the RTK signaling in vertebrates and invertebrates. Modulation of growth factor signaling by SPRY proteins is particularly important during embryonic development of the branching lung tissue and the remodeling of the urinary tract [13]. The mode of action of SPRY proteins is complex and subjected to several unknown mechanisms of regulation. SPRY proteins have been found to regulate both the FGF and the RAS-MAPK pathways. Because both signaling pathways are frequently deregulated in EC, SPRY proteins are good candidates to play a tumor suppressor role in endometrial tumorigenesis.

In humans, 4 SPRY genes are known (SPRY1-SPRY4), but SPRY1 and SPRY2 are deemed the most important. All SPRY proteins share a unique highly conserved cysteine-rich domain at the COOH-terminus. This region is supposed to be critical for targeting them to phosphatidylinositol (4,5-bisphosphate) in the plasma membrane and plays an inhibitory role on the MAPK pathway [14]. The NH<sub>2</sub>-terminal portion of the SPRY proteins is less conserved among the different proteins and could be

responsible for their functional divergence and tissue-specific expression of some of them. SPRY genes have been demonstrated to be inactivated by promoter hypermethylation in some tumors.

The aim of the study is to assess the presence of SPRY2 promoter hypermethylation in EC, as well as to evaluate SPRY2 expression by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry, in correlation with cell proliferation, and the main molecular alterations of this tumor.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material

Tissue samples were obtained from Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida and Hospital de Sant Pau, Barcelona. A specific informed consent was obtained from each patient, and the study was approved by the local ethical committee. Material included 80 samples of normal endometrial (NE) tissue, which were fixed in formalin and embedded in paraffin. A total of 157 samples corresponded to EC. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were available for each of them. Moreover, fresh-frozen samples of normal and tumor tissue were also obtained from 62 of the 157 patients. The subgroup of 62 patients included 22 endometrioid (EEC) carcinomas grade I, 24 endometrioid carcinomas (EEC) grade II, 7 endometrioid carcinomas (EEC) grade III, 3 mixed endometrioid and nonendometrioid carcinomas (all of them with a serous component, which in 1 case also coexisted with clear cell elements), 2 nonendometrioid carcinomas (NEEC; all of them serous carcinomas) grade III, and the epithelial components of 4 malignant mixed Müllerian tumors (all of them with a nonendometrioid component of serous type). Forty-three tumors were stage I, 11 were stage II, and 8 were stage III. Overall, the series of 157 EC included 47 endometrioid carcinomas (EEC) grade I, 58 EEC grade II, 26 EEC grade III, 15 serous carcinomas, 4 clear cell carcinomas, and 7 mixed Müllerian malignant tumors. One hundred eight tumors were stage I, 15 were stage II, 22 were stage III, and 1 was stage IV. Staging information was incomplete in 11 cases.

### 2.2. Tissue microarrays

Three tissue microarrays (TMAs) were constructed. The first TMA was constructed from 80 paraffin-embedded samples of NE in different phases of the menstrual cycle (20 proliferative, 50 secretory, 10 menstrual). The second TMA was composed of 95 ECs, previously evaluated for K-RAS mutations, and microsatellite instability, alterations in PTEN, and *b*-catenin. The third TMA was constructed from 62 EC that were also subjected to SPRY2 promoter methylation and

previously analyzed for RASSF1A promoter hypermethylation. A Tissue Arrayer device (Beecher Instrument, Silver Spring, MD) was used to construct the TMA. Briefly, all the samples were histologically reviewed, and representative areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in largest diameter) from 2 different areas were included in each case. Control normal tissues from the same EC specimens were also included.

### 2.3. Immunohistochemical study

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu\text{m}$ , dried for 16 hours at 56° before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series, and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 minutes in EDTA (pH 8.9). Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. The antibodies used were as follows anti-SPRY2 developed against amino acids 79 to 98 (N-terminal) (1:500 dilution; N-terminal, S 1444; Sigma-Aldrich, USA), Ki67 (1:100 dilution; MIB-1; DAKO, Denmark), estrogen receptor (1:50, 6F11; Novocastra, UK), and progesterone receptor (1:50, PgR 636; DAKO). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (DAKO) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin.

Immunohistochemical results were evaluated by 2 pathologists, by following uniform preestablished criteria. SPRY2 immunoreaction, as well as staining for estrogen and progesterone receptors, was graded semiquantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histologic score was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula,  $\text{histoscore} = 1X (\% \text{ light staining}) + 2X (\% \text{ moderate staining}) + 3X (\% \text{ strong staining})$ . The reliability of such score for interpretation of immunohistochemical staining in EC TMAs has been shown previously [11]. Because each TMA included 2 different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was done after examining both samples. Finally, the percentage of positive nuclei in each case was used to assess the cellular proliferation (Ki67). The specificity of the SPRY2 antibody was confirmed by obtaining a negative staining in cell blocks from HEK293T cells infected with lentiviruses carrying SPRY2 shRNA; whereas HEK293T transfected with a scrambled shRNA were positive. Appropriate positive and negative controls were also tested in each immunohistochemical assay. For SPRY2 analysis, we used HEK293T cells transfected with a scrambled shRNA as positive controls, and HEK293T cells were transfected with a shRNA against SPRY2, as negative controls.

The reproducibility of TMA immunostaining was confirmed by comparing TMA's results with those obtained in sections from the corresponding paraffin blocks of 37 randomly selected cases. The overall concordance was

89.2%. The  $k$  index of agreement between the 2 methods ranged from 0.68 to 0.83.

### 2.4. Methylation-specific PCR

Methylation-specific PCR was performed in 62 EC samples, which corresponded to those included in the third TMA. Genomic DNA was isolated with the DNeasy tissue kit (Qiagen GMBH, Hilden, Germany), from normal and tumor frozen tissue samples. DNA was subjected to bisulfite treatment. Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of DNA was denatured by sodium hydroxide and modified by sodium bisulfite. DNA samples were then purified and treated with sodium hydroxide, precipitated with ethanol and suspended in water (EZ DNA Methylation kit; Zymo Research, Orange, CA). SPRY2 promoter methylation status was determined following protocols from previous studies [11]. The promoter region of the SPRY2 human gene has been described as a CpG-rich region. Several areas in the promoter region could be candidate for methylation studies [15]. We focused our study on 2 CpG islands encompassing approximately 800 bp upstream and downstream the promoter site (Islands A and B). Island A contains more than 22 CpG dinucleotides expanding approximately 200 bp. Island B contains more than 14 CpG dinucleotides expanding approximately 200 bp. PCR was carried out using primer sets specific for methylated and unmethylated promoters (Table 1) [5]. Each PCR reaction contained 1 $\times$  buffer, 1.5 mmol  $\text{MgCl}_2$ , and 1 U of TaqGold polymerase (Applied Biosystems Inc, Santa Clara, CA), 0.2 mmol dNTPs (Biotools B&M Labs, SA, Madrid, Spain), and 0.2 mol of each primer. Amplification was carried out in 2 cycles at 55°C, 2 cycles at 53°C, and 30 cycles at 50°C for 39 minutes each as annealing temperatures. Each PCR product was directly loaded on 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV illumination.

### 2.5. Real-time PCR analysis

Total cellular RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Switzerland), and 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was retrotranscribed into cDNA using Taqman Reverse Transcription Reagents (P/N N808-0234). SPRY2 expression levels in tumor and normal tissues were evaluated with the ABI-7000 Sequence Detection System using assays-on-

**Table 1** SPRY2 MSP primers

AF1M	5' TTTGTAGTGTTTAGTTCGGTCCG 3'
AF1U	5' TTTGTAGTGTTTAGTTTGGTTTTG 3'
AF2M	5' GGGCGGTAGGATCGGTTTGGGGAC 3'
AF2U	5' GGGTGGTAGGATTGGTTTGGGGAT 3'
ARM	5' CAATAAATAACGTCATATAAATCC 3'
ARU	5' CAATAAATAACATCATATAAATCC 3'

Modified by McKie et al [15].

demand (Applied Biosystems). Endogenous control gene 18S rRNA was used to normalizing relative expression values.

## 2.6. Statistical analysis

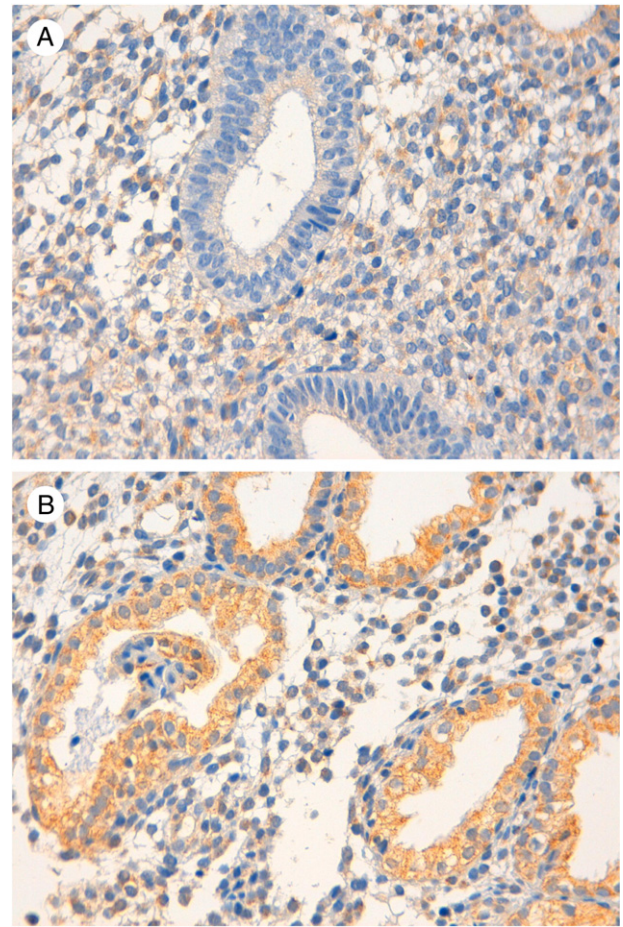
Regarding the analysis of the NE samples, we performed analysis of variance analysis to evaluate statistically the differences found in *SPRY2* expression among different phases of menstrual cycle. In addition, Spearman nonparametric correlation coefficient was computed to assess the relationship among *SPRY2* expression, cell proliferation, and hormonal receptor expression. Regarding the analysis of the tumor endometrial samples, we evaluated whether the differences in *SPRY2* gene expression were different depending on clinical-pathological data, and we used for this purpose the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test as suitable. Relative differences in expression were measured by means of computing a fold-change. Also, Spearman nonparametric test was used to assess whether *SPRY2* expression was correlated with cell proliferation and receptor hormonal status. To evaluate statistical significance, we set a threshold of 0.05.

## 3. Results

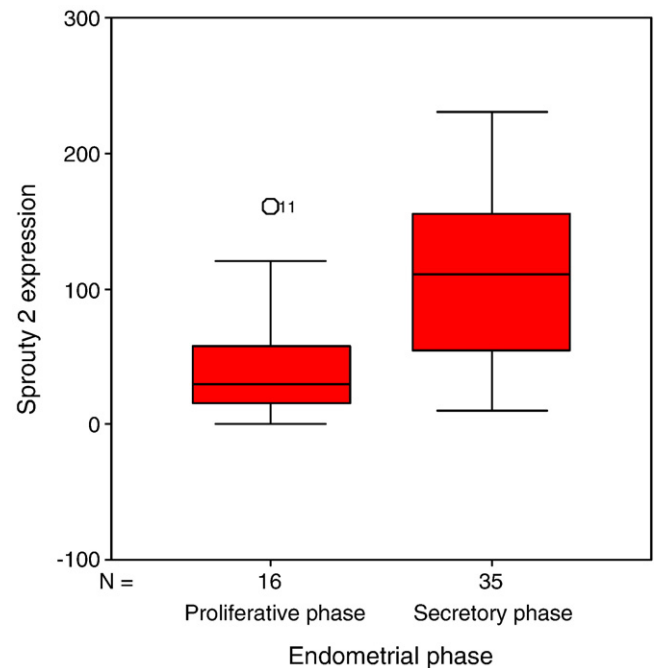
### 3.1. *SPRY2* expression by immunohistochemical analysis of TMAs

In NE tissue, *SPRY2* protein expression was evaluated in 80 samples, which corresponded to different phases of the menstrual cycle. *SPRY2* protein expression was variable in epithelial cells with some staining in stromal cells and capillaries. *SPRY2* immunostaining was significantly higher in the secretory phase in comparison with the proliferative phase (mean Hscores 107.14 and 43.44, respectively; fold-change, 2.47;  $P = .0004$ ; Figs. 1 and 2; Table 2). The staining was cytoplasmic and granular, although some cases also exhibited a strong membranous staining.

In EC, *SPRY2* was evaluated in 136 of the 157 cases that were included in the second and the third TMAs. Nine cases were missed in the construction of the TMA, 6 cases were excluded because unreliable tissue immunostaining, and another 6 cases did not contain representative tumor sample. *SPRY2* protein expression was positive in most of the cases (109/136, or 80.14%). The mean Hscore was 130.31. There was a great variability in the intensity of the staining, with cases with low, moderate, and strong immunoreaction (Hscore range, 0-295; Fig. 3). Twenty-seven cases (19.85%) showed complete absence of *SPRY2* staining. Overall, *SPRY2* protein expression in EC carcinoma was slightly reduced (mean Hscore, 138.33) when compared with the TMA of NE tissue (secretory, proliferative, and menstrual; mean Hscore, 169.88), and the difference did not reach statistical significance ( $P = .495$ ). However, *SPRY2*



**Fig. 1** *SPRY2* expression in normal endometrium, during the proliferative (A) and secretory (B) phases.

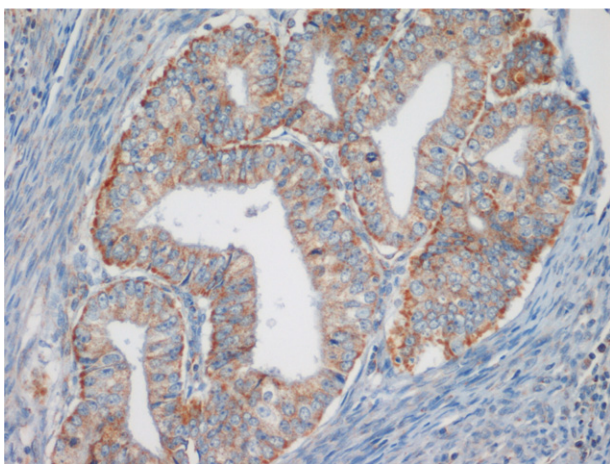


**Fig. 2** Box-plot comparisons of *SPRY2* immunostaining in normal endometrium, between the proliferative and secretory phases.



**Table 2** SPRY2 immunoexpression according to histologic type, FIGO grade, and pathological Stage

SPRY2 expression	n	Min	Max	Mean	SD	Fold-change	P
<i>Normal samples</i>							
Proliferative	16	0	160	43.44	43.23		
Secretory	35	10	230	107.14	63.74	2.47	.0004
<i>Normal vs tumor</i>							
Normal (proliferative) vs tumor							
Normal samples	16	0	160	43.44	43.23		
Tumor samples	137	0	295	130.31	82.05	3.00	.00002
Normal (secretory) vs tumor							
Normal samples	35	10	230	107.14	63.74		
Tumor samples	137	0	295	130.31	82.05	1.22	.089
<i>Tumor samples</i>							
NEEC	21	0	250	114.52	74.11		
EEC	115	0	295	134.20	83.01	1.17	.36
<i>Grade</i>							
1	40	0	295	139.70	85.06	1	
2	52	0	290	155.00	76.02	1.11	.35
3	44	0	250	95.23	74.09	0.68	.01900
<i>Stage</i>							
I	107	0	295	125.75	84.25	1	
II	17	70	290	174.12	65.96	1.38	.03
III	12	45	240	117.33	65.14	0.93	.72
IV	1	30	30	30.00		0.24	
						Trend P value	.83
						Global P value	.064
IA	16	5	290	146	81	1	
IB	27	0	295	143	92	0.98044841	
IC	37	0	285	119	82	0.81475433	
IIA	6	70	290	173	88	1.19027159	
IIB	11	110	260	175	56	1.19859571	
IIIA	11	50	240	124	64	0.85087794	
IIIB	1	45	45	45	NA	0.30901288	
IVB	1	30	30	30	NA	0.20600858	
						Trend P value	.6
						Global P value	.25



**Fig. 3** SPRY2 immunohistochemical staining in a sample of grade I EEC.

protein expression in EC carcinoma was increased (mean Hscore, 130.31) when compared with the TMA of normal proliferative endometrial tissue (mean Hscore, 43.44), and the difference reached statistical significance ( $P = .00002$ , fold-change, 3.00) (Table 2). Moreover, SPRY2 staining in EC was compared with that of the corresponding NE tissue from the same patient in 18 cases, but the NE tissue was atrophic in all cases. Most of the cases (10/18; 55.6%) showed lower SPRY2 expression in EC (Table 3; Fig. 4). However, the SPRY2 expression was similar in both, normal and tumor tissue, in 5 cases, and in 3 cases, SPRY2 expression was higher in EC than in the corresponding normal endometrium.

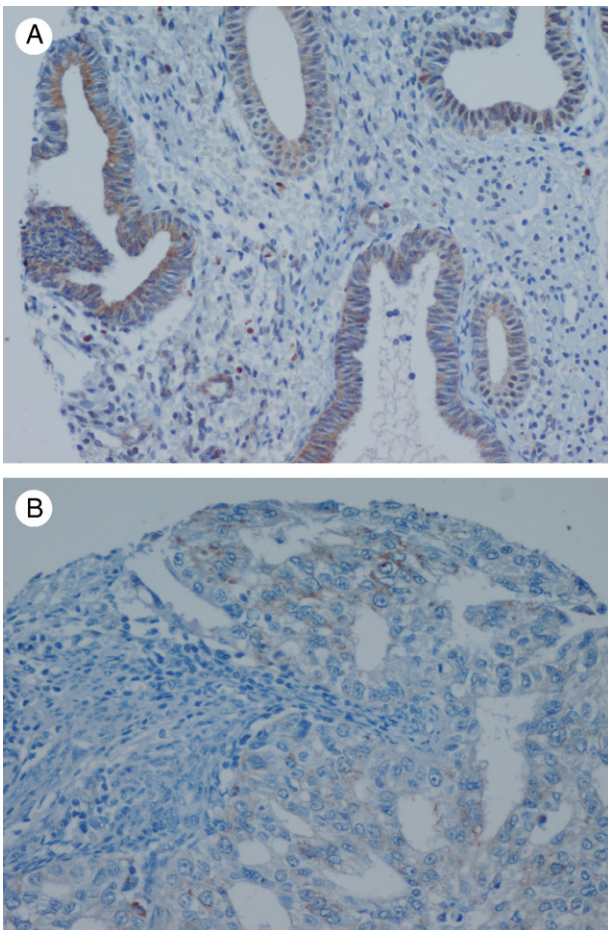
SPRY2 expression was lower in NEEC (mean Hscore, 114.52; range, 0-250) (Fig. 5) in comparison with EEC (mean Hscore, 134.20; range, 0-295), but the differences were not statistically significant ( $P = .36$ ; fold-change, 1.17). Moreover, grade III EC (including NEEC and EEC) showed

**Table 3** Correlation between the immunohistochemical findings and promoter methylation status of SPRY2 in the 18 patients with EC tumor tissue (EC) and corresponding normal tissue (NE)

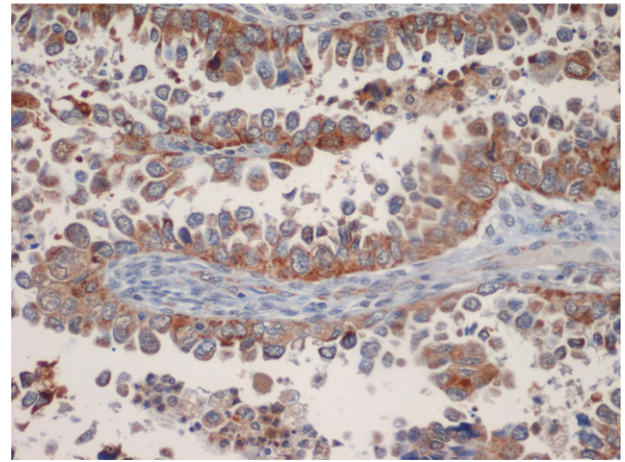
	Methylated EC	EC
Identical SPRY2 staining between EC and NE (n = 3)	2/3 (66.66%)	1/3 (33.33%)
Reduced SPRY2 staining in EC compared with NE (n = 10)	6/8 (75%)	2/8 (25%)
Increased SPRY2 staining in EC compared with NE (n = 5)	3/5 (60%)	2/5 (40%)

a significantly reduced SPRY2 protein expression (mean, 95) when compared with grade I and II EC (mean, 139 and 155, respectively; trend  $P$ -value = .01) (Table 2).

Although SPRY2 protein expression was slightly decreased in EC showing k-RAS and b-catenin alterations, those differences were not statistically significant ( $P = .323$  and  $P = .192$ , respectively). Finally, no differences were seen in SPRY2 immunostaining in correlation with PTEN alterations and microsatellite instability ( $P = .835$  and  $P = .167$ ).



**Fig. 4** SPRY2 immunostaining is lower in EC tissue (B) in comparison with normal endometrium (A) from the same patient.



**Fig. 5** SPRY2 immunohistochemical staining in a sample of NEEC of the serous type.

As expected, the proliferative endometria exhibited the highest index of cell proliferation (Ki67; mean, 27) compared with the secretory endometrium (mean, 9;  $P = .003$ ) and a very significant correlation with the estrogen and progesterone receptor expression ( $r = 0.727$ ,  $P = .000$ , and  $r = 0.786$ ,  $P = .000$ , respectively). SPRY2 protein expression was inversely correlated with hormonal receptors expression (estrogens  $r = -0.268$ ,  $P = .031$ , and progesterone  $r = -0.321$ ,  $P = .010$ ) and showed a tendency toward less immunostaining in cases with increased proliferation ( $r = -0.207$ ;  $P = .103$ ).

When we compare the TMA of NE samples with the TMAs of ECs, there is an expected significant increase of the cell proliferation in the tumors ( $P < .00001$ ; fold-change, 1.94). However, this increment is only significant when we compare ECs with the secretory endometrium ( $P < .00001$ ; fold-change, 2.93). In the proliferative endometrium, the level of cell proliferation is nearly as high as the observed in tumor samples (proliferative endometrial mean, 26.64, and EC mean, 28.82;  $P = .63$ ).

NEEC exhibited the highest level of cell proliferation (Ki67; mean, 41) compared with EEC (mean, 26.79;  $P = .007$ ). Noteworthy, NEEC showed also the lowest level of SPRY2 immunoexpression. We noted a significant increase in the cell proliferation (Ki67) in the cases with reduced expression of SPRY2 ( $r = -0.367$ ;  $P = .0015$ ), but no differences were seen in correlation with the estrogen receptor expression ( $r = 0.015$ ,  $P = .90$ ). The same expected results were seen for the ECs grade III. There was a significant increase in the cell proliferation index according to the FIGO grade. Hence, the mean Hscores for grade I tumors was 17.06; for grade II, 34.13; and for grade III tumors, 42.76 ( $P = .000$ ). Also, grade III ECs exhibited the lowest expression of SPRY2 (see Table 2).

Finally, when we compare the ECs according the pathological stage, stage IIB and III tumors showed the highest level of cell proliferation ( $P = .03$ ). Stage III and IV tumors also had the lowest levels of SPRY2 immunostaining (see Table 2).



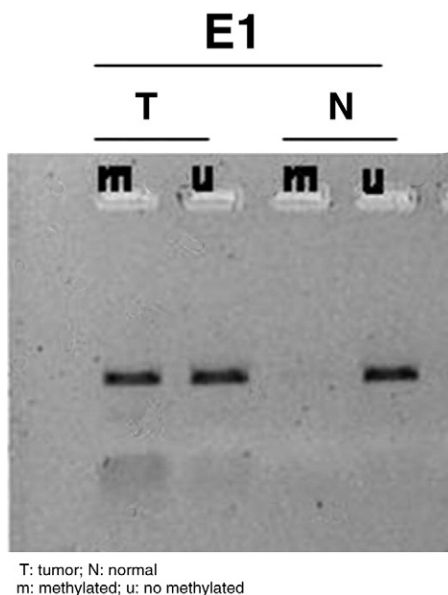
### 3.2. SPRY2 promoter hypermethylation

A total of 124 samples were informative for promoter methylation in island A, and 25 of them (20 tumor/5 normal) presented evidence of methylation (Fig. 6). With regard to island B, 125 samples were informative, and 55 of them (30 tumor/25 normal) presented promoter methylation. There was concordance when comparing methylation in islands A and B; tumors with methylated CpG island A were also methylated in CpG island B (50%;  $P = .04$ , Fisher test). Overall, SPRY2 promoter methylation in 1 of the 2 islands was detected in 31 (53.4%) of 58 informative ECs.

SPRY2 promoter methylation was correlated with results previously published regarding promoter methylation in RASSF1A, in the very same series of cases. Promoter hypermethylation was more common for RASSF1A (73.6%) than for SPRY2 (53.4%), but both genes were simultaneously methylated in nearly half of the cases (42.9%). Interestingly, there was a trend in the increase of the number of cases methylated for RASSF1A (68%) in the cases without SPRY2 methylation compared with the cases with SPRY2 methylation (methylation of RASSF1A: 32%).

SPRY-2 promoter hypermethylated cases showed a proportion of grade III ECs lower than nonhypermethylated tumors (16.1% versus 40.7%, respectively), and these differences were near to be significant ( $P = .07$ ). SPRY-2 methylation was more frequent among stage II or III ECs than in stage I (IA, IB, or IC) (40.7% versus 22.5%), even though these differences did not reach statistical significance ( $P = .22$ ).

Ten cases (10 tumor and 10 normal tissues) were selected for SPRY2 expression analysis using real-time quantitative



**Fig. 6** Methylation-specific PCR for SPRY2 in samples from one patient with EC. SPRY2 methylation was seen in tumor tissue (EC), but not in normal tissue (NT).

PCR. The expression levels of the SPRY2 gene in each normal tissue sample were used as control, and the comparative level in the matching tumor sample was expressed as a percentage of the control. We observed a slight reduction in the levels of SPRY2 in several tumor samples, but there was no correlation with the methylation status of SPRY2. These data suggest that expression levels of SPRY2 in tumor and normal samples are not exclusively dependent of the methylation status of the gene.

### 3.3. SPRY2 protein expression and promoter hypermethylation

Overall, SPRY2 immunostaining was lower in EC with promoter hypermethylation (mean Hscore, 167) in comparison with EC without methylation (mean Hscore, 175.28), but these differences were not statistically significant ( $P = .533$ ). Most ECs with reduced expression of SPRY2 in comparison with corresponding normal tissue showed promoter hypermethylation of SPRY2 (75%; 6/8) (Table 3). In these cases, SPRY2 was unmethylated in the normal sample (88.88%). Interestingly, the cases with increased expression of SPRY2 in the tumor samples compared with the paired normal tissue also were predominantly methylated (60%), although there was a slight increase of methylation in the normal tissue (40%).

## 4. Discussion

SPRY2 is a good candidate to be tumor suppressor gene in EC, because of 3 reasons: (1) SPRY2 is a tumor suppressor gene in other solid tumors; (2) the 13q31 region, containing the SPRY2 gene, shows frequent deletions in EC; and (3) SPRY2 is a negative regulator of signaling pathways, which are frequently deregulated in EC. The major role of SPRY proteins is to regulate the RAS-MAPK signaling; and they exert such action, by regulating the downstream effects of a wide range of growth factors such as FGF, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), glial-cell derived neurotrophic factor (GDNF), and nerve growth factor (NGF) [12].

One of the first reports on the possible link between SPRY2 deregulation and cancer was published in breast cancer. Lo et al [16] demonstrated down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in 94.7% of breast cancer samples in comparison with normal tissue, as analyzed by reverse transcriptase PCR. They also showed a higher expression of SPRY2 during mammary gland formation and development, with little or no protein expression in the small number of human breast cancer tissues studied by immunohistochemistry. Similarly, SPRY2 expression has also been reported to be predominantly down-regulated in non-small cell carcinoma of the lung [17] and hepatocarcinoma [18]. In both

cases, the expression of SPRY2 was evaluated at the transcript and protein level, and some tumors exhibited a comparable staining or only weakly reduced expression compared with the adjacent normal tissue. Moreover, Fong et al [18] described even a higher expression of SPRY2 in the preneoplastic condition of cirrhosis than in hepatocarcinomas and normal tissue.

In the present study, we have demonstrated for the first time in the literature a differential expression of SPRY2 in normal endometrium, in different phases of the menstrual cycle. We have also shown that SPRY2 expression is decreased in some ECs, with some correlation with SPRY2 promoter methylation. In our study, SPRY2 protein was differentially expressed in the endometrial glands during the menstrual cycle, which may indicate a role in developing and branching of endometrial glands, similarly to the role traditionally attributed to SPRY proteins during branching of endothelial and epithelial structures, in organogenesis. The developmental scenario parallels the tissue remodeling of the *Drosophila* trachea and the mammalian lung formation [19]. In those models, SPRY proteins exert regulatory functions and their expression precludes random branching of the ducts acting as an antagonist of tracheal morphogenesis. In normal endometrium, SPRY2 could play a regulatory role in the development of the glands during the cyclical morphologic changes with respect to fluctuations in hormonal levels of the menstrual cycle. It is worth mentioning that SPRY2 protein expression was significantly inversely correlated with the estrogen and progesterone expression of the normal endometrium in different phases of the menstrual cycle, and the receptors expression were, as expected, very significantly correlated with the cellular proliferation index (Ki67).

The fact that SPRY2 protein expression was decreased in a substantial number of EC cases (57%) when compared with NE suggests that loss of SPRY2 expression could play a role in development and progression of EC. Interestingly, some ECs carcinomas showed increased SPRY2 protein expression in comparison with the normal tissue. These tumors could harbor other molecular alterations to help them to overcome the negative growth regulatory effects of SPRY2 protein in the process of tumor progression.

However, it is interesting to see that the expression of SPRY2 was lower in proliferative endometrium in comparison with EC. Apparently, this result contradicts a tumor suppressor role for SPRY-2 in endometrial tumorigenesis. The detection of decreased expression of SPRY2 in tumors with higher grade in comparison with low-grade carcinomas may suggest that SPRY-2 could act as a "Tumor progression" suppressor gene, similarly to what has been described for tumors that show decreased expression during metastasis (metastasis suppressor genes). The decreased expression of SPRY2 in normal proliferative endometrium can be explained by the importance of developing and branching of endometrial glands during the proliferative phase. In a sense, proliferative endometrium has features similar to some

organs during embryologic development. In other organs, the tumor suppressor role of SPRY2 has been suggested by comparing the protein levels in tumors in comparison with normal adult tissue, and not with the corresponding tissue during embryologic development. For that reason, we wonder whether proliferative endometrium is really (like other tissues during embryonic development) the best tissue for comparing SPRY2 levels in tumor tissue, to assess a tumor suppressor role for SPRY2 in the endometrium.

Human SPRY2 protein is encoded by a gene located on chromosome 13q31.1 that appears to be ubiquitously expressed [20]. SPRY2 expression may be altered by several different mechanisms, [21,22] and several transcription factor-binding sites have been identified in SPRY2 gene sequence [23], but little it is known about regulatory sequences in the promoter. The 13q31 region, where the gene is located, shows loss of heterozygosity in 11% of EC [24,25], suggesting that SPRY2 may be also inactivated by deletion. In the present study, we demonstrated frequent promoter methylation of SPRY2 in EC (53.4%). In general, methylation analysis in paired normal and tumor samples showed a heterogeneous pool of methylated and nonmethylated sequences. We found samples of NE and EC with all possible combinations, regarding methylation status. Interestingly, however, there was a great concordance between the methylation status observed in the 2 islands (A and B) that were selected.

Hypermethylation in EC has been assessed at many different promoter regions of several genes, such as hMLH1, CDKN2A/p16 genes [26], and APC in the early stages of endometrial tumorigenesis [27]. Salvesen et al [28] in 2001 found that PTEN promoter methylation was relatively frequent in EC. Also, the promoter regions of RASSF1A and RARb2 genes have been found methylated in EC [11,29]. RASSF1A promoter hypermethylation was previously demonstrated by our group in 73% of the same tumor samples that were now subjected to methylation-specific PCR analysis for SPRY2. Hypermethylation of both genes was seen in 42.9% of the cases. Although we failed to demonstrate a correlation between both events, EC without SPRY2 methylation showed more frequency of RASSF1A methylation than the cases with SPRY2 promoter methylation, suggesting that they could be mutually exclusive events in some cases, as expected if we realize that SPRY2 and RASSF1A are both negative regulators of the same pathway. It is also interesting to see that SPRY2 promoter hypermethylation did not correlate with microsatellite instability, a phenomenon also associated with promoter hypermethylation of a different gene (MLH1).

As expected, SPRY2 protein expression was very significantly inversely correlated with cell proliferation (Ki67) in EC. Previous studies in the breast cancer cell line MCF-7 demonstrated that abrogation of endogenous SPRY activity, by the overexpression of a negative mutant, resulted in enhanced cell proliferation and in a dramatic increase in the tumorigenic potential when used in vivo

nude mice models [16]. Also, forced expression of SPRY2 in cell lines obtained from lung tumors significantly reduced cell proliferation and blocked tumor formation in mice [17].

It is worth noting that SPRY2 protein expression was maintained in low-grade ECs but significantly reduced in grade III tumors and in carcinomas of the nonendometrioid type. The fact that low-grade ECs appear to retain SPRY2 expression suggests that the loss of protein expression could be a late event in endometrial carcinogenesis or to be associated with more aggressive tumors. In prostate cancer, an inverse correlation between SPRY2 expression and tumor grade was reported [15]. High-grade tumors had a significantly reduced SPRY2 expression when compared with benign prostatic hyperplasia and well-differentiated tumors.

The demonstration of SPRY2 decreased expression in high-grade ECs apparently contradicts the association between SPRY2 promoter hypermethylation and low-grade EC. It is important to realize that, as a tumor suppressor gene, SPRY2 may show multiple mechanisms of inactivation, other than promoter methylation. In this regard, we have mentioned before that the region 13q31 occasionally shows loss of heterozygosity in EC. The mechanisms for SPRY2 gene inactivation may differ in different subsets of EC.

In summary, we report for the first time a reduced expression of SPRY2 using a TMA technology, as well as frequent SPRY2 promoter methylation in EC, suggesting a tumor suppressor role for SPRY2 in EC, possibly by controlling the MAPK-kinase pathway.

## References

- [1] Bockman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10-7.
- [2] Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *HUM PATHOL* 2001;32:569-77.
- [3] Catusus LI, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas. Clinico-pathologic correlations in a series of 42 cases. *HUM PATHOL* 1998;29:1160-4.
- [4] Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, Prat J. PTEN mutations in endometrial carcinomas. A molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *HUM PATHOL* 2000;31:312-7.
- [5] Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. *HUM PATHOL* 2006;37:1465-72.
- [6] Lagarda H, Catusus LI, Arguëlles RM, Matias-Guiu X, Prat J. k-RAS mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193-9.
- [7] Machin P, Catusus L, Pons C, Muñoz J, Matias-Guiu X, Prat J. CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *HUM PATHOL* 2002;33:206-12.
- [8] Moreno-Bueno G, Hardisson D, Prat J, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981-90.
- [9] Prat J, Oliva E, Lerma E, Vaquero M, Matias Guiu X. Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10 case study of p53 and c-erbB 2 expression and DNA content. *Cancer* 1994;74:1778-83.
- [10] Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 2007;26:7158-62.
- [11] Pallarés J, Velasco A, Eritja N, et al. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:691-9.
- [12] Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signaling by sprouty: a developing story. *Mol Cell Biology* 2004;5:441-50.
- [13] Fritzsche S, Kenzelmann M, Hofmann MJ, et al. Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:839-49.
- [14] Lo TL, Fong CW, Yusoff P, et al. Sprouty and cancer: the first terms report. *Cancer Lett* 2006:1-10.
- [15] McKie AB, Douglas DA, Olijslagers S, Graham J, et al. Epigenetic inactivation of the human sprouty2 homologue in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:2166-74.
- [16] Lo TL, Yusoff P, Fong CW, et al. The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:6127-36.
- [17] Sutterlüty H, Mayer CE, Setinek U, et al. Down-regulation of sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res* 2007;5:509-20.
- [18] Fong CW, Chua MS, McKie A, et al. Sprouty2, and inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:2048-58.
- [19] Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA. Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signalling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 1998;92:253-63.
- [20] Su AI, Cooke MP, Ching KA, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4465-70.
- [21] Ozaki K, Kadamoto R, Asato K, Tanimura S, Itoh N, Kohno M. ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:1084-8.
- [22] Abe M, Naski MC. Regulation of sprouty expression by PLC gamma and calcium-dependent signals. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1040-7.
- [23] Ding W, Bellusci S, Shi W, Warburton D. Functional analysis of the human Sprouty2 gene promoter. *Gene* 2003;322:175-85.
- [24] Velasco A, Pallares J, Santacana M, et al. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:305-17.
- [25] Fujino T, Risinger JI, Collins NK, Liu FS, Nishii H, Takahashi H, Westphal EM, Barrett JC, Sasaki H, Kohler MF, et al. Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4294-8.
- [26] Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, et al. Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 2009;30:267-70.
- [27] Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981-90.
- [28] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2006;91:22-6.
- [29] Arafa M, Kridelka F, Mathias V, et al. High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology* 2008;53:525-32.





### **3. LAS MUTACIONES DE LOS GENES PIK3CA Y PTEN COEXISTEN CON FRECUENCIA EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

- 3.1 Las mutaciones del gen PIK3CA son un hecho frecuente en carcinoma de endometrio.
- 3.2 Los tumores con mutaciones en el gen PIK3CA tienden a portar mutaciones en el gen PTEN con mayor frecuencia.
- 3.3 Las mutaciones en el gen PIK3CA pueden tener un efecto aditivo a la inactivación monoalélica de PTEN en carcinoma de endometrio.
- 3.4 Las mutaciones en los genes PIK3CA y K-RAS son sucesos mutuamente excluyentes en carcinoma de endometrio.





## Original contribution

# ***PIK3CA* gene mutations in endometrial carcinoma. Correlation with *PTEN* and *K-RAS* alterations<sup>☆</sup>**

**Ana Velasco<sup>a,b</sup>, Elena Bussaglia PhD<sup>d</sup>, Judit Pallares MD<sup>a,b</sup>, Xavier Dolcet PhD<sup>a,b</sup>,  
David Llobet<sup>a,b</sup>, Mario Encinas PhD<sup>b</sup>, Nuria Llecha PhD<sup>a,b</sup>, Jose Palacios MD<sup>c</sup>,  
Jaime Prat MD, FRCPath<sup>d</sup>, Xavier Matias-Guiu MD<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, 25198 Lleida, Spain

<sup>b</sup>Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, 25198 Lleida, Spain

<sup>c</sup>Laboratory of Breast and Gynecological Cancer, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 28029 Madrid, Spain

<sup>d</sup>Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

Received 14 February 2006; revised 5 May 2006; accepted 16 May 2006

**Keywords:**

Endometrial carcinoma;  
*PIK3CA*;  
*PTEN*;  
Tissue microarray;  
Molecular pathology;  
Antibodies

**Summary** Alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway are common in endometrial carcinoma. Inactivation of the tumor suppressor gene *PTEN* leads to a constitutively active PI3K pathway, which plays a role in the early steps of endometrial tumorigenesis. Other alterations in the PI3K/AKT pathway are mutations in the *PIK3CA* gene, which encode the p110 $\alpha$  catalytic subunit of PI3K. *PIK3CA* mutations cluster to the helical (exon 9) and the kinase (exon 20) domains of the gene. In endometrial carcinomas, *PIK3CA* mutations have been found to coexist frequently with *PTEN* mutations, but it is not clear whether they occur in cells with monoallelic or biallelic inactivation of *PTEN*. In the present study we have evaluated *PIK3CA* mutational status in a series of 33 endometrial carcinomas, previously screened for microsatellite instability and mutations in *PTEN*, *K-RAS*, and *CTNNB-1*. The tumors were also evaluated for loss of heterozygosity on 10q23 and hypermethylation of the promoter region of *PTEN*/psi*PTEN* to assess the monoallelic or biallelic inactivation status of *PTEN*. *PIK3CA* mutations were detected in 8 (24%) of the 33 cases. Seven mutations were located in exon 20 and 1 in exon 9. *PTEN* alterations were found in 19 cases (57%). Biallelic inactivation of *PTEN* was demonstrated in 11 tumors, whereas 8 tumors exhibited alteration in only 1 of the 2 alleles. *PIK3CA* mutations coexisted with monoallelic alterations of *PTEN* in 4 cases (2 mutations and 2 allelic imbalances), with biallelic *PTEN* inactivation in 1 case (mutation and promoter methylation), and 3 tumors showed *PIK3CA* mutations in association with wild-type *PTEN*. *PIK3CA* mutations did not correlate with microsatellite instability or mutations in *CTNNB-1*. However, *PIK3CA* and *K-RAS* mutations (8 cases) were mutually exclusive alterations. In summary, the results confirm that *PIK3CA* mutations are frequent in endometrial carcinoma and support the hypothesis that *PIK3CA* mutations may have an additive effect to *PTEN* monoallelic inactivation in endometrial carcinoma.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

<sup>☆</sup> This study was supported by grants FISS 01/1656, FISS PI020227, FISS PI02-0371, FISS PI060577, SAF2002-10529-E, SAF2004-05250, Marató de TV3 2005-47, Tumor Bank RTICCCFIS (C03/010), 2004XT00090, and programa de intensificació de la investigació, Instituto Carlos III, Madrid, Spain. X. D. holds a postdoctoral fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (CP05/00028). D. L. holds a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (FI05/00191).

\* Corresponding author. Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain.

## 1. Introduction

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway plays a key role in the regulation of cellular homeostasis [1,2]. Activation of cell-surface receptors recruits PI3K, which phosphorylates the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate substrate to generate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, recognized by the protein kinase AKT and its regulator PDK1. In the cell membrane, AKT is phosphorylated in serine and threonine residues. Activated AKT modulates the expression of several genes involved in suppression of apoptosis and cell cycle progression. Moreover, there is a signaling cross talk between the PI3K/AKT pathway and the RAS-MEKK signaling pathway.

The PI3K/AKT pathway is frequently activated in endometrial carcinomas [3], often resulting from mutations in the tumor suppressor gene *PTEN*. *PTEN* antagonizes the PI3K/AKT pathway by dephosphorylating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, leading to a decreased translocation of AKT to cellular membranes, and subsequent down-regulation of AKT phosphorylation and activation [4-7]. *PTEN* alterations have been found in only 1 of the 2 alleles in some tumors. This has raised the question whether *PTEN* haploinsufficiency plays a role in endometrial tumorigenesis.

PI3K is a heterodimeric enzyme consisting of a catalytic subunit (p110) and a regulatory subunit (p85) [8]. The PI3K family comprises 8 members divided into several classes according to their sequence homology and substrate preference. The cloning of a number of catalytic subunits of PI3K has led to the classification of this multigene family into 3 groups (classes I, II, III). Class I members contain 4 different catalytic subunits (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , and p110 $\gamma$ ). There are 8 isoforms of p85 encoded by 3 genes [9]. The *PIK3CA* gene, located on chromosome 3q26.32, codes for the p110 $\alpha$  catalytic subunit of PI3K [10]. A high frequency of mutations in the *PIK3CA* gene has been reported recently in various human cancers [11], including colon [12], breast [13], ovary [14,15], and stomach [16]. Mutations are predominantly located in the helical (exon 9) and kinase (exon 20) domains. A recent study has described mutations in the *PIK3CA* gene in endometrial carcinomas for the first time [17]. In this series, *PIK3CA* mutations occurred in 36% of cases and coexisted frequently with *PTEN* mutations. The authors, however, did not evaluate the biallelic/monoallelic status of *PTEN*. These results indicate that *PIK3CA* mutations contribute to activate the PI3K/AKT pathway in endometrial carcinomas.

In the present study, we have assessed the frequency of *PIK3CA* mutations in a series of 33 endometrial carcinomas. We have correlated the presence of *PIK3CA* mutations with alterations of *PTEN* (mutations, loss of heterozygosity [LOH], promoter hypermethylation) and also with microsatellite instability, and mutations in the *K-RAS* and *CTNNB-1* genes. One of the goals of the study was to assess a possible additive effect of *PIK3CA* mutations with monoallelic inactivation of *PTEN*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Tissue samples

Thirty-three unselected endometrial carcinomas were retrieved from the Surgical Pathology Tissue Bank of the Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. Histologic classification of each tumor was based on the World Health Organization system. Genomic DNA from the tumors and corresponding non-tumor tissues was extracted by standard methods from fresh frozen tissues. The cases had previously been subjected to analysis of mutations in the *PTEN* [18], *K-RAS* [19], microsatellite instability [20], and *CTNNB-1* [21].

The study was approved by the local ethical committee.

### 2.2. Polymerase chain amplification

Primers for polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing were designed using the Primer3 program ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) and were synthesized by METABION (Martinsried, Germany), based on *PIK3CA* sequence obtained from National Center for Biotechnology Information (accession number N M\_006218). Two primer pairs were used to individually amplify exons 9 and 20 of *PIK3CA* from genomic endometrial cancer DNA (Table 1). PCR amplification was performed in 20- $\mu$ L reaction volumes that contained 100 ng of DNA, 75 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 20 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2  $\mu$ mol/L of each primer, 0.2 mmol/L of each deoxyribonucleotide triphosphate, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (BIOTOOLS, B&M Labs, SA, Madrid, Spain). The 2 exons were amplified with the following PCR conditions: an initial 5-minute denaturation at 94°C followed by 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 57°C, 1 minute at 72°C, and a final extension of 10 minutes at 72°C.

### 2.3. DNA sequencing

PCR products were first purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and were bidirectionally sequenced using the original primer pair and Applied Biosystem Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem Inc, Santa Clara, CA). Samples were analyzed on the ABI Prism 3100 Avant instrument, using standard run parameters. The separation matrix used was POP-6 using

**Table 1** Primer sequence used to amplify exons 9 and 20 of *PIK3CA* gene

Primer name	Sequence (5'-3')	Exon
e9L	CTG TGA ATC CAG AGG GGA AA	9
e9Rmod	ACA TGC TGA GAT CAG CCA AAT	
e20L	ATG ATG CTT GGC TCT GGA AT	20
e20R	GGT CTT TGC CTG CTG AGA GT	

**Table 2** Primers used in methylation-specific PCR

Primer set	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Fragment size	Annealing (°C)
Set I-M	GTTTGGGGATTTTTTTTTCGC	AACCTTCTCTACGCCGCG	178	62
Set I-U	TATTAGTTTGGGGATTTTTTTTTGT	CCCAACCTTCTCTACACCACA	183	
Set II-M	GGTAGAGGTCGAGGTTTAGTTCGTTAT	CTTACTCGAACCGATTCCCAA	206	60
Set II-U	TTTTTGGGTAGAGGTTGAGGTTTA	TACTCAAACCAATTCCCAACCAC	162	
Set III-M	TTCGTTTCGTCGTCGTCGTATT	GCCGCTTAACTCTAAACCGCAACCG	101	62
Set III-U	GTGTTGGTGGAGGTAGTTGTTT	ACCACTTAACTCTAAACCACAACCA	105	

Abbreviations: M, methylated; U, unmethylated.

1× Tris-borate-EDTA buffer with EDTA running buffer (Applied Biosystems).

#### 2.4. Loss of heterozygosity analysis at chromosome 10q23

The microsatellite markers D10S579, D10S2491, AFMa086wg9, and D10S541, located on chromosome 10q, in the interval known to contain the *PTEN* gene and its flanking regions, were used to determine LOH at the *PTEN* locus. Fluorescent-labeled PCR products were analyzed with an automated sequencing System (ABI Prism 310, Applied Biosystems), using GeneScan software (Applied Biosystems). A double peak observed for the microsatellite marker amplified from normal DNA indicated a heterozygote. A single peak in tumor tissue DNA compared with normal tissue DNA indicated loss of 1 allele.

#### 2.5. Methylation-specific PCR

Two micrograms of DNA was chemically modified after the protocol by Herman et al [22] (Table 2). This consists of denaturing the DNA in a volume of 50  $\mu$ L with NaOH (0.2 mol/L final concentration) followed by treatment with 520  $\mu$ L 3 mol/L sodium bisulphite (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) and 30  $\mu$ L 10 mmol/L hydroquinone (Sigma-Aldrich Co) overnight at 65°C. After incubation, a purification in a Wizard DNA column (Wizard DNA Clean-Up System, Promega, Madison, WI) was done, followed by precipitation with 10 mol/L  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , 2  $\mu$ L of glycogen 20 mg/mL (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and 100% ethanol at -20°C. The sample was dried and resuspended in 20  $\mu$ L RNase-free water. PCR was carried out using primers that were specific for either the methylated or the unmethylated version of *PTEN* promoter. DNA obtained from placental tissue was used as a negative control of methylation. Placental tissue DNA treated with *Sss*I Methylase CpG Methylase (New England BioLabs, Beverly, MA) was used as positive control. Water was used as a negative control of the PCR. PCR products were separated in 2% agarose gel.

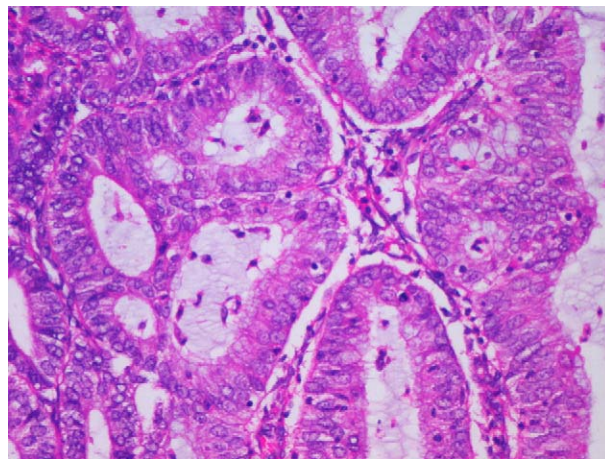
#### 2.6. Tissue microarray design

A tissue microarray was constructed from paraffin-embedded blocks of the 33 endometrial carcinomas.

A tissue arrayer device (Beecher Instrument, Sun Prairie, WI) was used. All endometrial carcinomas were histologically reviewed, and representative tumor areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in the largest diameter) from 2 different tumor areas were included for each case. Normal control tissues from the same specimens were also included. Thus, 2 different tissue microarray blocks were constructed; each of them contained 66 cylinders.

#### 2.7. Immunohistochemistry

The tissue microarray blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m, dried for 16 hours at 56°C. They were dewaxed in xylene, rehydrated through a graded ethanol series, and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 minutes in 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.5). Endogenous peroxidase was blocked. An antiphosphorylated AKT antibody was used (polyclonal, dilution 1:25; Cell Signaling, Danvers, MA). The reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as substrate. Sections were counterstained with Harris hematoxylin. The immunohistochemical reactions were performed in a Dako Autostainer LV-1 immunostainer. Endometrial stroma was used as a positive control, and the negative control was run without addition of the primary antibody. Antigen preservation was



**Fig. 1** Microscopic appearance of an endometrioid carcinoma.



**Table 3** Summary of the clinical, pathologic, and molecular genetic features of 8 endometrial carcinomas with mutations in the *PIK3CA* gene

Age	Type	Grade	Stage	<i>PTEN</i> alteration	<i>PIK3CA</i> mutation	<i>K-RAS</i> mutation	MI	<i>CTNNB-1</i> mutation
77	END	1	Ic	963-968insA PH	E545D	–	+	–
52	END	3	Ib	–	H1047R	–	+	W25X
74	END	3	Ic	LOH	H1047R	–	–	–
67	END	1	Ib	R173C	H1047R	–	–	–
78	END	2	Ic	993del C	H1065L	–	–	–
62	END	1	IIa	–	T1052K	–	–	S45P
59	END	2	Ib	LOH	H1047L	–	+	–
80	END	3	Ic	–	T1025A	–	–	–

Abbreviations: END, endometrioid carcinoma; MI, microsatellite instability, PH, promoter hypermethylation.

verified with vimentin and Ki-67 immunostaining. Only samples exhibiting positive vimentin and Ki-67 staining, as well as optimal internal control, were evaluated.

Immunohistochemical results were evaluated by 2 different pathologists (X. M.-G. and J. P.). Uniform preestablished criteria were used. Evaluations were done independently, and the discrepancies were resolved at a simultaneous viewing. Lin's concordance correlation coefficient was 0.947 (95% confidence interval, 0.681-0.995). Immunoreactivity was graded semiquantitatively by considering the percentage and intensity of the staining of the tumor cells. A histologic score was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula  $H_{\text{score}} = 1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate staining}) + 3 \times (\% \text{ strong staining})$ . Because each tissue microarray included 2 different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was done after examining both samples.

## 2.8. Validation of the tissue microarray

The reproducibility of tissue microarray immunostaining was confirmed in 10 cases by comparing tissue microarray results with those obtained in sections from the corresponding paraffin blocks of randomly selected cases. The overall concordance was 89.2%. The Kappa index of agreement between the 2 methods ranged from 0.68 to 0.83.

## 2.9. Statistical analysis

The Wilcoxon rank sum test was used to assess association between quantitative and dichotomous variables.

## 3. Results

### 3.1. Pathologic results

Thirty tumors were endometrioid adenocarcinomas (Fig. 1), whereas the remaining 3 were non-endometrioid (serous or clear cell) carcinomas. Nine tumors were grade 1 (International Federation of Gynecology and Obstetrics), 13

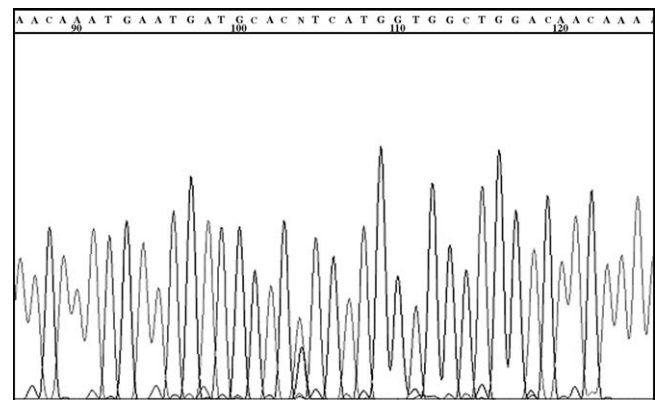
grade 2, and 11 grade 3. Four tumors were stage Ia, 8 stage Ib, 14 stage Ic, 4 stage II, 1 stage IIIa, and 1 stage IV. In 1 case, stage information was not available.

### 3.2. Molecular results

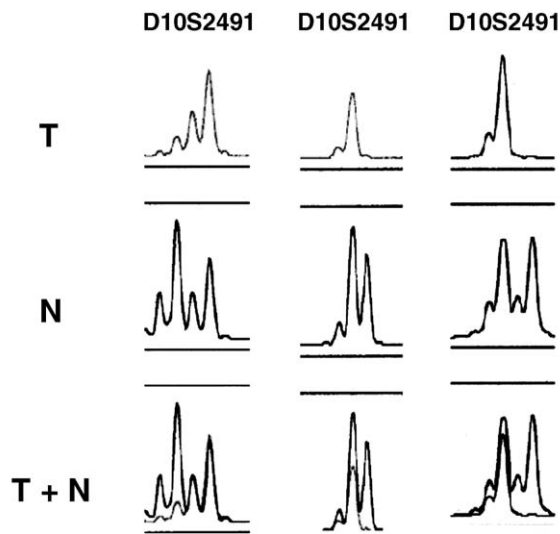
Mutations in the *PIK3CA* gene were observed in 8 cases (26.4%) (Table 3). Seven mutations were located in exon 20 and 1 in exon 9. All were missense mutations. The H1047R mutation was identified in 3 cases. The other 5 tumors contained the following mutations: E545D, H1065L, T1052K, T1025A, and H1047L (Fig. 2).

Alterations in *PTEN* were found in 19 tumors (57.7%). Point mutations had been previously identified in 15 cases [19], whereas LOH was detected in 8 (Fig. 3). Coexistence of 2 genetic alterations (mutation and LOH or double mutations) was seen in 6 cases. Combination of *PTEN* mutation and LOH on 10q23 occurred in 4 tumors and 2 tumors had 2 concomitant point mutations.

Promoter hypermethylation of *PTEN*/psi*PTEN* (Fig. 4) was identified in 6 cases, always in association with mutations (5 cases) or LOH (1 case). Considering promoter methylation together with LOH and mutations of *PTEN*, biallelic inactivation of *PTEN* was demonstrated in 11 tumors.



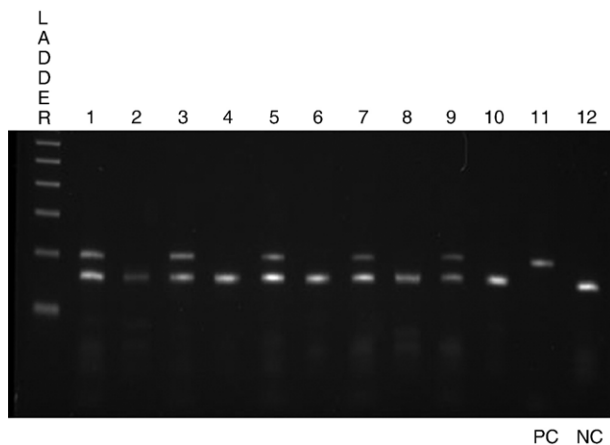
**Fig. 2** Representative nucleotide sequence of a missense mutation in *PIK3CA* gene.



**Fig. 3** Loss of heterozygosity at 10q23, demonstrated by microsatellite PCR and capillary electrophoresis. Abbreviations: T, tumor; N, no tumor.

Eight tumors had alteration in only 1 of the 2 alleles of *PTEN* (monoallelic inactivation). Single *PTEN* mutations were seen in 5 cases, whereas LOH was seen in the other 3 cases.

*PIK3CA* mutations coexisted with monoallelic alterations of *PTEN* in 4 cases (2 mutations and 2 losses of heterozygosity), with biallelic inactivation in 1 and with wild-type *PTEN* in 3 cases. The only tumor with biallelic *PTEN* inactivation had a mutation and *PTEN*/*psiPTEN*



**Fig. 4** Methylation-specific PCR for promoter region of *PTEN* (set 1, Salvesen et al [25]). The first lane is the 100–base pair ladder. In each case, the methylated and unmethylated PCR products were loaded in the same well. On lanes 11 and 12 are the controls for the methylated (PC) and unmethylated (NC) primer set showing the expected band size. Because the tumors also contain normal cells, amplification on the unmethylated sequence is seen in all cases.

**Table 4** Summary of molecular results

Genetic alteration	Cases/total
<i>PTEN</i> mutations	15/33
<i>PTEN</i> LOH	8/33
<i>PIK3CA</i> mutations	8/33
<i>K-RAS</i> mutations	8/32
Microsatellite instability	13/33
<i>CTNNB-1</i> mutations	6/33

promoter hypermethylation, the biologic significance of which is controversial. In 3 tumors with concomitant mutations in *PTEN* and *PIK3CA*, the *PIK3CA* mutation occurred in codon 1047, in the kinase domain.

*K-RAS* mutational status had been previously assessed in 32 tumors [19]. *K-RAS* mutations had been found in 8 tumors; however, they were not identified in any of the tumors with *PIK3CA* mutations. There were no statistically significant differences between the group of carcinomas with *PIK3CA* mutations and without *K-RAS* mutations, in comparison with the group of tumors with *K-RAS* mutations and without *PIK3CA* mutations, regarding histologic grade ( $P = .369$ ) or pathologic stage ( $P = .782$ ).

Thirteen tumors had microsatellite instability [20]. *PIK3CA* mutations coexisted with microsatellite instability in 3 cases. *CTNNB-1* mutations, which had been found in 6 cases [21], coexisted with *PIK3CA* mutations in 2.

A summary of molecular results is included in Table 4.

### 3.3. Immunohistochemistry

Phospho-AKT was evaluated in the 33 cases. One case was excluded because no representative tumor was found in the 2 cylinders. Positive immunostaining for phospho-AKT was obtained in 15 cases (45%), which exhibited a cytoplasmic pattern. The histologic score ranged from 5 to 75. There were no statistically significant differences between the group of tumors with and without molecular alterations of *PTEN* and *PIK3CA* with regard to the immunohistochemical expression of phospho-AKT ( $P = .675$ ). In addition, no statistically significant differences were found between phospho-AKT immunostaining and histologic grade ( $P = .427$ ) or pathologic stage ( $P = .157$ ).

## 4. Discussion

The PI3K signaling pathway regulates a number of kinases, transcription factors, and other molecules involved in various cellular processes, such as proliferation, survival, motility, cell size, and messenger RNA translation. Deregulation of the PI3K signaling pathway is an almost universal feature of human cancers and is responsible, in part, for some of the cellular characteristics of the cancer phenotype [1,2].

The *PTEN* tumor suppressor gene is a phosphoinositide 3-phosphatase that antagonizes the PI3K/AKT signaling



pathway [4-7]. *PTEN* may be inactivated by several mechanisms. Somatic mutations occur in tumors from various tissues. Inactivation by deletion is also common, as shown by the elevated frequency of LOH in various tumor types [23,24]. Lastly, a third proposed mechanism for *PTEN* inactivation is promoter hypermethylation [25]. Nevertheless, its true significance is under discussion. Some controversy exists in the literature regarding the possible interference of a processed *PTEN* pseudogene (*psiPTEN*) with the *PTEN* gene [26]. *PTEN* is frequently abnormal in endometrial carcinomas. Loss of heterozygosity at chromosome 10q23 occurs in 40% of cases [27,28], and somatic *PTEN* mutations have been found in 37% to 61% [29-31]. They are almost exclusively restricted to endometrioid endometrial carcinomas and in endometrial precancerous lesions [32,33].

Mutations in genes that encode components of the PI3K signaling pathway occur in human cancers. Recent identification of nonrandom somatic mutations in the *PIK3CA* gene of various tumors suggests the oncogenic role of the mutated protein [11]. The *PIK3CA* gene, mapped to 3q26, encodes the p110 $\alpha$  catalytic subunit of PI3K. Reported mutations have been of the missense type and clustered within 2 regions of the helical (exon 9) and kinase (exon 20) domains. These mutations affect residues that are highly conserved in evolution. The mutant p110 $\alpha$  proteins have been shown to display enhanced lipid kinase activity in comparison with the wild-type protein. An increasing number of neoplasias have been reported to contain *PIK3CA* mutations, including malignant tumors of the colon [11], breast [13], stomach [16], ovary [15], lung, or brain. Interestingly, some of these tumors share some morphological and molecular features with endometrial carcinomas. For example, in one series, *PIK3CA* mutations in ovarian carcinomas were more frequently detected in endometrioid and clear cell carcinomas compared with serous tumors [14].

Oda et al [17] recently first reported the presence of *PIK3CA* mutations in endometrial carcinomas. *PIK3CA* mutations were detected in 36% of tumors, and they frequently coexisted with *PTEN* mutations. The authors also knocked down *PTEN* expression in the HEC-1B endometrial carcinoma cell line, which exhibits both *K-RAS* and *PIK3CA* mutations, and demonstrated enhanced AKT phosphorylation, thus suggesting that a *PIK3CA* mutation and *PTEN* inactivation may have an additive effect on PI3K activation. Oda et al proposed 3 hypotheses to explain the concomitant presence of *PTEN* and *PIK3CA* alterations: (a) First, more than 1 input may be required to completely activate the PI3K/AKT pathway; (b) that either *PTEN* or p110 $\alpha$  possesses additional functions distinct from the PI3K pathway regulation; and (c) that other isoforms of p110 $\alpha$  might have roles in endometrial tumorigenesis.

In the present study, we have analyzed *PIK3CA* mutations in a series of 33 tumors, which had been previously evaluated for microsatellite instability, and mutations in

*K-RAS* and *CTNNB-1*. The cases had also been previously evaluated for *PTEN* mutations. Finally, the tumors were screened for LOH on 10q23 and for hypermethylation in the promoter region of *PTEN/psiPTEN*. Knowledge of the mutational spectrum of *PTEN* and LOH on 10q23 in these cases allowed us to know the biallelic or monoallelic inactivation status of *PTEN* in concordance with *PIK3CA* mutations. *PIK3CA* mutations were detected in 8 of the 33 cases, which represent 24% of the tumors. All *PIK3CA*-mutated tumors were endometrioid carcinomas (although non-endometrioid carcinomas were scarcely represented in the series), clearly indicating that deregulation of the PI3K pathway is common in this histologic type. Overall, 19 tumors exhibited 1 or more *PTEN* alterations (mutations in 15, LOH in 8, and promoter methylation in 6). Biallelic inactivation of *PTEN* was demonstrated in 11 tumors, whereas 8 tumors exhibited alteration in 1 of the 2 alleles. *PIK3CA* mutations coexisted with monoallelic alterations of *PTEN* in 4 cases (2 mutations and 2 allelic imbalances), whereas 3 tumors showed *PIK3CA* mutations in association with wild-type *PTEN*. A single tumor had a *PIK3CA* mutation coexisting with a biallelic alteration of *PTEN*; however, 1 hit was promoter hypermethylation of *PTEN/psiPTEN*, which has a controversial biological significance [26]. These results thus support the hypothesis that *PIK3CA* mutations may have an additive effect on *PTEN* monoallelic inactivation in endometrial carcinoma.

The hypothesis that alterations in tumor suppressor genes can cause haploinsufficiency has led to a reevaluation of the classical "2-hit" model of tumor suppressor gene inactivation. It has been suggested that under certain circumstances, 1 hit may be sufficient for inactivation of tumor suppressor genes such as *PTEN* [34,35]. Even more, it has been demonstrated that double heterozygosity for functionally related proteins could have an additive effect on tumor development and progression. The results of the present study may suggest that *PIK3CA* and monoallelic inactivation of *PTEN* may have an additive effect in endometrial carcinomas.

A second contribution of this study is the suggestion that in endometrial carcinomas, mutations in *PIK3CA* and *K-RAS* occur in a mutually exclusive way. Activation of PI3K can be accomplished either through receptor tyrosine kinase activation, nonreceptor tyrosine kinases, and RAS activation. RAS gene family members encode 21-kd proteins with guanosine triphosphatase activity, which regulates tyrosine kinase-induced MAPK activation. However, RAS also binds and activates PI3K, thus activating AKT. Production of activated GTP-bound RAS leads to direct recruitment and activation of the p110 catalytic subunit of PI3K in the absence of p85 effects [36,37]. Therefore, it seems logical that activating mutations in RAS and *PIK3CA* are redundant in tumor development because each may result in up-regulation of AKT and MAPK. Interestingly, a reciprocal mutational status for *PTEN* and N-RAS has been found in some tumors such as melanomas

[38]. Concomitant mutations *PIK3CA* and *K-RAS* have been found in colorectal carcinoma, whereas in gastric cancer, *PIK3CA* mutations tend to occur in tumors without *K-RAS* mutations [39].

A surprising result in our study was the lack of statistical significance when correlating AKT immunostaining in tumors with PI3K alterations (*PTEN* and *PIK3CA*) and those without these abnormalities. Several explanations could be offered. First, molecular alterations in other signaling pathways (such as *K-RAS*) may interfere with PI3K signaling. Second, it is possible that genes in the PI3K pathway, other than *PTEN* and *PIK3CA*, could also be deregulated in endometrial carcinomas.

Finally, our study shows that the finding of *PIK3CA* mutations does not correlate with microsatellite instability status or mutations in *CTNNB-1* gene, two frequent alterations of endometrial carcinomas. Lack of correlation between *PIK3CA* mutations and microsatellite instability is interesting because previous studies have reported this in gastric, but not in colonic, carcinoma [39].

In summary, the present study provides information regarding the frequent alteration of the PI3K pathway in endometrial carcinomas and supports the hypothesis that *PIK3CA* mutations may coexist with monoallelic inactivation of *PTEN*. Moreover, the results favor a mutually exclusive role of *PIK3CA* and *K-RAS* in endometrial carcinoma.

## References

- [1] Vazquez F, Sellers WR. The *PTEN* tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3 kinase signaling. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:21-35.
- [2] Leslie NR, Downes CP. *PTEN*: the down side of PI3 kinase signalling. *Cell Signal* 2002;14:285-95.
- [3] Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of *PTEN* expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:892-5.
- [4] Li J, Yen C, Liaw D, et al. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-6.
- [5] Unnisa I, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of *PTEN/MMAC1* gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1922-32.
- [6] Downes CP, Bennett D, McConnachie G, et al. Antagonism of PI3-kinase-dependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, *PTEN*. *Biochem Soc Trans* 2001;29:846-51.
- [7] Maehama T, Dixon JE. *PTEN*. A tumour suppressor that functions as a phospholipids phosphatase. *Trends Cell Biol* 1999;9:125-8.
- [8] Carpenter CL, Duckworth BC, Auger KR, Cohen B, Schaffhausen LC, Cantley LC. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem* 1990;265:19704-11.
- [9] Paez JG, Sellers WR. PI3K/*PTEN*/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 2003;115:145-67.
- [10] Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005;436:792.
- [11] Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:802-7.
- [12] Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, et al. Functional analysis of *PIK3CA* gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2005;65:4562-7.
- [13] Wu G, Xing M, Mambo E, et al. Somatic mutation and gain of copy number of *PIK3CA* in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7:609-16.
- [14] Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the *PIK3CA* gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:7678-81.
- [15] Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL. *PIK3CA* mutations in advanced ovarian carcinomas. *Hum Mutat* 2005;25:322.
- [16] Li VS, Wong CW, Chan TL, et al. Mutations of *PIK3CA* in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2005;5:29.
- [17] Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of *PIK3CA* and *PTEN* genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:10669-73.
- [18] Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, Prat J. *PTEN* mutations in endometrial carcinomas. A molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *HUM PATHOL* 2000;31:312-7.
- [19] Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. *K-RAS* mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193-9.
- [20] Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *HUM PATHOL* 1998;29:1160-4.
- [21] 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;33:206-12.
- [22] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
- [23] Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1995;10:2243-6.
- [24] Gray IC, Philips SMA, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 1995;55:4800-3.
- [25] Salvanes HB, MacDonald N, Ryan A, et al. *PTEN* methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2001;91:22-6.
- [26] Zysman MA, Chapman WB, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of *PTEN* tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2002;160:795-800.
- [27] Nagase S, Sato S, Tezuka F, Wada Y, Yajima A, Horii A. Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Br J Cancer* 1996;74:1979-83.
- [28] Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 1995;55:1922-6.
- [29] Tashiro H, Blazes MS, Wu R, et al. Mutations in *PTEN* are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:3935-40.
- [30] Kong D, Suzuki A, Zou TT, et al. *PTEN1* is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997;17:143-4.
- [31] Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. *PTEN/MMAC1* mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997;57:4736-8.
- [32] Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Hedrick Ellenson L. *PTEN* mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:3254-8.
- [33] Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered *PTEN* expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:924-31.
- [34] Santaros M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654:105-22.

- [35] Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, et al. Haploinsufficiency of the *PTEN* tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11563-8.
- [36] Rodriguez-Viciana P, Downward J. Ras activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Methods Enzymol* 2001;333:37-44.
- [37] Sakata K, Kato S, Fox JC, Shigemori M, Morimatsu M. Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:975-83.
- [38] Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative reciprocity of NRAS and *PTEN/MMAC1* alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 2000;60:1800-4.
- [39] Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of *PIK3CA* mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:1649-54.

#### **4. ALTERACIONES DEL GEN FGFR2 EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

- 3.5 La expresión de FGFR2 sobre tejido endometrial normal varía dependiendo de la fase del ciclo menstrual.
- 3.6 La expresión de FGFR2 es significativamente mayor en EEC en comparación con NEEC.
- 3.7 Los tumores de grado histológico III mostraron menor expresión de FGFR2 que los de grado II.
- 3.8 Las mutaciones del gen FGFR2 se encuentran a frecuencias bajas en carcinoma de endometrio.
- 3.9 Existe una alta incidencia del polimorfismo V232V en el exón 5 del gen FGFR2 en los tumores analizados.



# FGFR2 alterations in endometrial carcinoma

Sonia Gatus<sup>1</sup>, Ana Velasco<sup>1</sup>, Ainara Azueta<sup>1</sup>, Maria Santacana<sup>1</sup>, Judit Pallares<sup>1</sup>, Joan Valls<sup>1</sup>, Xavier Dolcet<sup>1</sup>, Jaime Prat<sup>2</sup> and Xavier Matias-Guiu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Genetics and Research Laboratory, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Lleida, Spain and <sup>2</sup>Department of Pathology, Hospital de Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is a tyrosine kinase receptor involved in many biological processes such as embryogenesis, adult tissue homeostasis and cell proliferation. Mutations in *FGFR2* have been reported in up to 10–12% of endometrial carcinomas identical to those found in congenital craniofacial disorders. Inhibition of FGFR2 could be a new therapeutic target in endometrial carcinoma. FGFR2 immunostaining was assessed in three tissue microarrays: one constructed from paraffin-embedded blocks of 60 samples of normal endometrium in different phases of menstrual cycle, and two tissue microarrays containing endometrial carcinoma samples (95 and 62 cases). FGFR2 expression was correlated with stage, histological type and grade as well as with immunostaining of PTEN, RASSF1A, estrogen and progesterone receptors, Ki67, Cyclin D1, STAT-3 and SPRY2. *FGFR2* mutations were assessed by PCR and direct sequencing, with DNA obtained from 31 paraffin-embedded endometrial carcinoma samples. In normal endometrium, FGFR2 expression was higher in the secretory than in the proliferative phase ( $P=0.001$ ), with an inverse correlation with Ki67 ( $P=0.00032$ ), suggesting a tumor-suppressor role for *FGFR2* in normal endometrium. Cytoplasmic expression of FGFR2 was higher in endometrial carcinoma when compared with the atrophic endometrium from the same patients ( $P=0.0283$ ), but was lower in comparison with normal endometrium from women in the menstrual cycle. Interestingly, nuclear staining was observed in some cases, and it was less frequent in endometrial carcinoma when compared with the adjacent atrophic endometrium ( $P=0.0465$ ). There were no statistical differences when comparing superficial and myoinvasive endometrial carcinoma samples. Endometrioid endometrial carcinomas showed higher expression of FGFR2 than nonendometrioid endometrial carcinomas (fold change 2.56;  $P=0.0015$ ). Grade III endometrioid endometrial carcinomas showed decreased FGFR2 expression when compared with grade II endometrioid endometrial carcinomas ( $P=0.0055$ ). No differences were found regarding pathological stage. Two missense mutations of *FGFR2* gene were detected in exons 6 and 11 (S252W and N549K, respectively; 6.45%). Results support the hypothesis that *FGFR2* has a dual role in the endometrium, by inhibiting cell proliferation in normal endometrium during the menstrual cycle, but acting as an oncogene in endometrial carcinoma.

*Modern Pathology* (2011) 24, 1500–1510; doi:10.1038/modpathol.2011.110; published online 1 July 2011

**Keywords:** endometrial carcinoma; *FGFR2*; mutation; oncogene; tissue microarray; tumor-suppressor gene

Endometrial carcinoma is one of the most commonly diagnosed malignant tumors of the female genital tract in Europe and United States.<sup>1</sup> There are two main clinicopathological variants of endometrial carcinoma. Endometrioid carcinomas (type I tumors)<sup>2</sup> are usually low-grade and estrogen-related carcino-

mas that usually develop in perimenopausal women and coexist or are preceded by complex and atypical endometrial hyperplasia. Nonendometrioid carcinomas (type II tumors) are very aggressive tumors, unrelated to estrogen stimulation, arising occasionally in endometrial polyps or from precancerous lesions developing in atrophic endometrium that mainly occur in older women; and may exhibit serous or clear cell features. Classification of endometrial carcinomas in these two types is probably too rigid, as tumors showing combined or mixed features are not infrequent in daily practice. However, cDNA analysis clearly has shown that

Correspondence: Professor X Matias-Guiu, MD, PhD, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Av Alcalde Rovira Roure 80, Lleida 25198, Spain.  
E-mail: xmatias@arnau.scs.es

Received 25 January 2011; revised 14 April 2011; accepted 18 April 2011; published online 1 July 2011

endometrioid endometrial carcinomas and non-endometrioid endometrial carcinomas exhibit different expression profiles.<sup>3</sup> The molecular alterations involved in the development of endometrioid endometrial carcinomas are different from those of nonendometrioid endometrial carcinomas. Nonendometrioid endometrial carcinomas exhibit alterations of *p53*,<sup>4</sup> *STK15*,<sup>3</sup> *p16*, *E-cadherin*,<sup>5</sup> and *C-erbB2*, as well as loss of heterozygosity on several chromosomes.<sup>6</sup> In contrast, endometrioid endometrial carcinomas show microsatellite instability,<sup>7</sup> and mutations in the *PTEN*,<sup>8</sup> *KRAS*,<sup>9</sup> and *CTNNB-1* genes.<sup>10–12</sup>

Oncogenic activation of tyrosine kinases is a common mechanism of carcinogenesis. Tyrosine kinases play a role in transduction of proliferating signals and can be good therapeutic target in several tumors. Recently, some investigators have suggested that alterations in *fibroblast growth factor receptor 2* (*FGFR2*) could be added to the molecular-specific features of endometrioid endometrial carcinomas.<sup>13–15</sup> *FGFR2* is of special interest, as it is a possible target for therapeutic approaches, and *FGFR2* inhibitors are currently under consideration in clinical trials for several types of solid tumors. *FGFR2* belongs to fibroblast growth factor receptor (FGFR) tyrosine kinase family that comprises four different transmembrane kinases (FGFR1–FGFR4) and their alternative spliced isoforms.<sup>16</sup> They differentially respond to 18 FGF ligands and activate downstream pathways such as RAS-MAPK. *FGFR2* has been described to play a role as either oncogene or tumor-suppressor gene, depending on the type of cell. Several types of molecular alterations have been described, including gene overexpression and point mutation. In this study, we evaluate *FGFR2* expression in normal endometrium and endometrial carcinoma by immunohistochemistry and the presence of somatic mutations of *FGFR2* by PCR in correlation with the main molecular alterations of this tumor.

## Materials and methods

### Material

Tissue samples were obtained from Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida and Hospital de Sant Pau, Barcelona. A specific informed consent was obtained from each patient, and the study was approved by the local ethical committee. The material included 60 samples of normal endometrial tissue that were fixed in formalin and embedded in paraffin (20 proliferative, 40 secretory). A total of 157 samples corresponded to endometrial carcinomas: 131 of them were endometrioid endometrial carcinomas and the other 26 were nonendometrioid endometrial carcinomas. Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were available for each of them. Overall, the series of 157 endometrial carcinoma included 47 endo-

metrioid endometrial carcinomas grade I, 58 endometrioid endometrial carcinomas grade II, 26 endometrioid endometrial carcinomas grade III, 15 serous carcinomas, 4 clear cell carcinomas and 7 mixed müllerian malignant tumors. In all, 108 tumors were stage I, 15 were stage II, 22 were stage III and 1 was stage IV. Staging information was incomplete in 11 cases. Furthermore, superficial and deep tumor samples of the same patient were taken in 34 cases.

### Tissue Microarrays

Three tissue microarrays were designed. The first tissue microarray was constructed from 60 paraffin-embedded samples on normal endometrium in different phases of menstrual cycle (20 proliferative, 40 secretory). The second tissue microarray was composed of 95 endometrial carcinomas, previously evaluated for microsatellite instability, *KRAS* mutations and alterations in *PTEN*, *Pik3CA* and *CTNNB-1*.<sup>7–11,17</sup> The third tissue microarray was constructed from 62 endometrial carcinomas that were also previously subjected to molecular analysis for genes involved in the control of *RAS-MAPK* pathway, such as *SPRY2*, and *RASSF1A* promoter hypermethylation.<sup>18,19</sup> A Tissue Arrayer device (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) was used to construct the tissue microarray. Briefly, all the samples were histologically reviewed and representative areas were marked in the corresponding paraffin blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in largest diameter) from two different areas were included in each case. Control normal tissues from the same endometrial carcinoma specimens were also included.

### Immunohistochemical Study

Tissue microarray blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu$ m, dried for 16 h at 56°C before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series, and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 min in EDTA (pH 8.9). Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. The antibodies used were: *FGFR2* (1:200 dilution; Abcam), *SPRY2* (1:500 dilution; N-terminal, S 1444, Sigma), *Ki67* (1:100 dilution; MIB-1, DAKO), *PTEN* (1:50 dilution; 6H2.1, DAKO), *RASSF1A* (1:100 dilution; eB114-10H1; e-Bioscience), Estrogen receptor (1:50, 6F11, NovoCastra), Progesterone receptor (1:50, PgR 636, DAKO), *Cyclin D1* (1:25, DCS6, DAKO) and *STAT-3* (1:500, sc8019, Santa Cruz). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (DAKO) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were also tested.



Immunohistochemical results were evaluated by two pathologists, by following uniform pre-established criteria. FGFR2 immunoreactivity, as well as staining for the other markers, was graded semiquantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula:  $\text{Histscore} = 1 \times (\% \text{ light staining}) + 2 \times (\% \text{ moderate staining}) + 3 \times (\% \text{ strong staining})$ . The reliability of such score for interpretation of immunohistochemical staining in endometrial carcinoma tissue microarrays has been shown previously.<sup>20–22</sup> As each tissue microarray included two different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was done after examining both samples. Finally, the percentage of positive nuclei in each case was used to assess the cellular proliferation (Ki67).

The reproducibility of tissue microarray immunostaining was confirmed by comparing tissue microarray's results with those obtained in sections from the corresponding paraffin blocks of 37 randomly selected cases. The overall concordance was 89.2%. The  $\kappa$  index of agreement between the two methods ranged from 0.68 to 0.83.

### Mutation Analysis of *FGFR2*

For PCR, two primer pairs were used to individually amplify 12 exons of *FGFR2* from genomic endometrial cancer DNA. Each PCR reaction contained 1 × Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1U/μl TaqGold (Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA), 0.2 mM dNTPs (Biotools B&M Labs, SA, Madrid, Spain) and 0.2 μM of each primer. PCR amplification was performed in 20 μl reaction volumes that contained 100 ng of DNA, 75 nM HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 μM of each primer, 0.2 mM of each dNTP and 1 unit of Taq DNA polymerase (Biotools, B&M Labs). All exons were amplified with the following conditions: an initial 5-min denaturation at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C and a final extension of 10 min at 72 °C.

For DNA sequencing, PCR products were first purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and were bidirectionally sequenced using the original primer pair and the Applied Biosystem Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Samples were analyzed on the AB Prism 3100-Avant instrument, using standard run parameters. The separation matrix used was POP-6 using 1 × TBE with EDTA running buffer (Applied Biosystems).

### Statistical Analysis

To evaluate differences in immunoreactivity for independent series, Mann–Whitney nonparametric

test was used to evaluate significance. Histscore means were computed to report absolute difference and, in addition, fold change was calculated to report relative differences. Regarding dependent series, where normal and tumor samples were obtained from the same patients, linear mixed models were used to take into account both paired observations and repeated measures, using model estimates to evaluate differences in expression levels. To evaluate coexpression between biomarkers, Pearson's linear correlation coefficient was applied whereas Spearman's nonparametric test was used to assess significance, which was set for all tests at a threshold of 0.05. All analyses were obtained using R statistical software.

## Results

### FGFR2 Expression by Immunohistochemical Analysis of Tissue Microarrays

In normal endometrial tissue, FGFR2 protein expression was evaluated in 30 samples, which corresponded to different phases of the menstrual cycle (Table 1 and Figure 1). The remaining samples were missed in the construction of the tissue microarray, lost during sectioning and staining, or did not show representative endometrial glands in the stained section. FGFR2 expression was variable in epithelial cells with some staining in stromal cells and capillaries. Cytoplasmic FGFR2 immunostaining was significantly lower in the proliferative phase (mean Hscore 64; range 0–150) in comparison with the secretory phase (mean Hscore 170; range 10–275) (fold change = 2.65;  $P = 0.001$ ; Figure 2). The staining was predominantly cytoplasmic and granular. FGFR2 protein expression was inversely correlated with estrogen (mean Hscore 198; range 0–300) and progesterone (mean Hscore 160; range 0–300) receptors ( $r = -0.76$ ;  $P = 0.00002$ ; and  $r = -0.75$ ;  $P = 0.00001$ , respectively) and was also inversely correlated with Ki-67 staining (mean percentage 14; range 0–70;  $r = -0.35$ ;  $P = 0.00032$ ; Table 2).

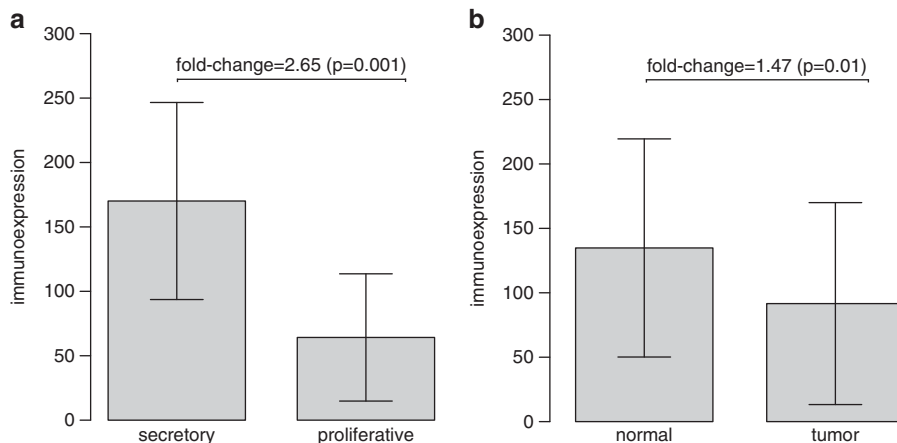
In endometrial carcinomas, FGFR2 was evaluated in 115 out of the 157 cases that were included in the second and the third tissue microarrays. The remaining samples were missed in the construction of the tissue microarray, lost during sectioning and staining, did not show representative tumor in the stained section, or had unreliable tissue immunostaining. FGFR2 showed two different types of staining patterns: cytoplasmic and nuclear. Cytoplasmic FGFR2 expression was higher in endometrial carcinomas in comparison with normal atrophic endometrial tissue from the same patient, which was available in 72 cases (fold change 3.35;  $P = 0.0283$ ; Figure 3 and Table 3). However, cytoplasmic FGFR2 expression of endometrial carcinomas was lower than FGFR2 expression in normal endometrium from samples of the first tissue



**Table 1** Summary of the main immunohistochemical results regarding FGFR-2

Normal samples	Min	Max	Mean	s.d.	Fold change	P-value
Proliferative	0	150	64.20	49.39	1.00	
Secretory	10	275	170.10	76.48	<b>2.65</b>	<b>0.001</b>
Normal vs tumor	Min	Max	Mean	s.d.	Fold change	P-value
<i>Normal (proliferative and secretory) vs tumor (cytoplasmic expression)</i>						
Normal samples	0	275	134.80	84.66	<b>1.47</b>	<b>0.013</b>
Tumor samples	0	275	91.61	78.37		
<i>Normal (proliferative) vs tumor (cytoplasmic expression)</i>						
Normal samples	0	150	64.20	49.39	0.70	0.34
Tumor samples	0	275	91.61	78.37		
<i>Normal (secretory) vs tumor (cytoplasmic expression)</i>						
Normal samples	10	275	170.1	76.48	<b>1.86</b>	<b>0.00016</b>
Tumor samples	0	275	91.61	78.37		
<i>Tumor samples</i>						
NEEC	0	260	38.60	70.51	<b>2.56</b>	<b>0.0015</b>
EEC	0	275	98.75	76.63	1.00	
<i>Grade</i>						
1	0	250	97.99	73.64	1	
2	0	275	118.01	82.00	0.83 (1 vs 2)	0.42
3	0	130	54.57	48.02	<b>2.16 (2 vs 3)</b>	<b>0.0055</b>
<i>Stage</i>						
I	0	275	102.67	78.66	1	
II	0	180	75.25	62.40	1.36 (I vs II)	0.21
III	38.33	125	90.08	36.80	0.84 (II vs III)	0.59
IV	80	80	80	—	1.13 (III vs IV)	—

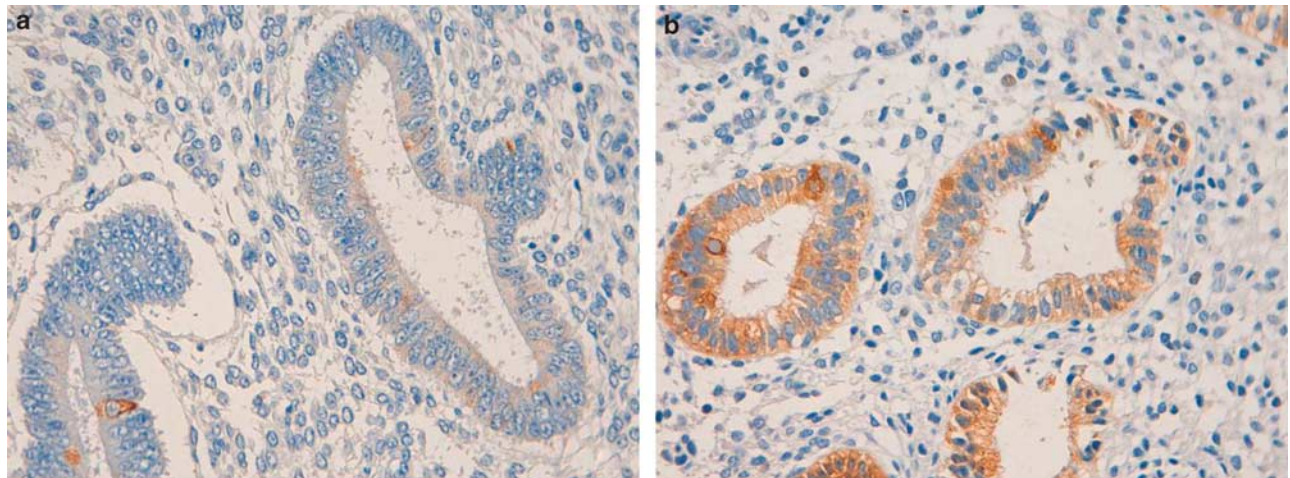
Bold values are significant *P*-values.



**Figure 1** (a) Differential immunoeexpression between secretory and proliferative samples. Bars represent means and segments means  $\pm$  1 s.d. Fold change indicates the relative difference between sample types. (b) Differential immunoeexpression between normal and tumor samples. Bars represent means and segments means  $\pm$  1 s.d. Fold change indicates the relative difference between sample types.

microarray, obtained from premenopausal patients in different phases of the menstrual cycle. Differences in the expression were significant for all normal endometrium samples (fold change 1.47;  $P=0.013$ ) and for normal endometrium samples in the secretory phase (fold change 1.86;  $P=0.00016$ ), but not for normal endometrium samples in the

proliferative phase ( $P=0.34$ ). Interestingly, nuclear staining was observed in some cases, and it was less frequent in endometrial carcinomas when compared with atrophic endometrium of the same patients ( $P=0.0465$ ; Figure 4). In some cases, nuclear staining was seen in atrophic glands with tubal metaplasia. Nuclear staining was not seen in normal



**Figure 2** Cytoplasmic FGFR2 expression in normal endometrium in the proliferative (a) and secretory (b) phases.

**Table 2** Main correlations between FGFR2 expression and remaining markers

<i>Normal cycling endometrium</i>	
FGFR2/estrogen receptor	$r = -0.76; P = 0.00002$
FGFR2/progesterone receptor	$r = -0.75; P = 0.00001$
FGFR2/MIB-1	$r = -0.35; P = 0.00032$
<i>Endometrial carcinoma</i>	
FGFR2/estrogen receptor	$r = 0.44; P = 0.00002$
FGFR2/progesterone receptor	$r = 0.22; P = 0.00122$
FGFR2/MIB-1	NS
FGFR2/PTEN	$r = -0.35; P = 0.00005$
FGFR2/SPRY2	$r = 0.22; P = 0.014$
FGFR2/RASSF-1A	NS
FGFR2/STAT-3	NS
FGFR2/Cyclin D1 ns	NS

NS, not significant.

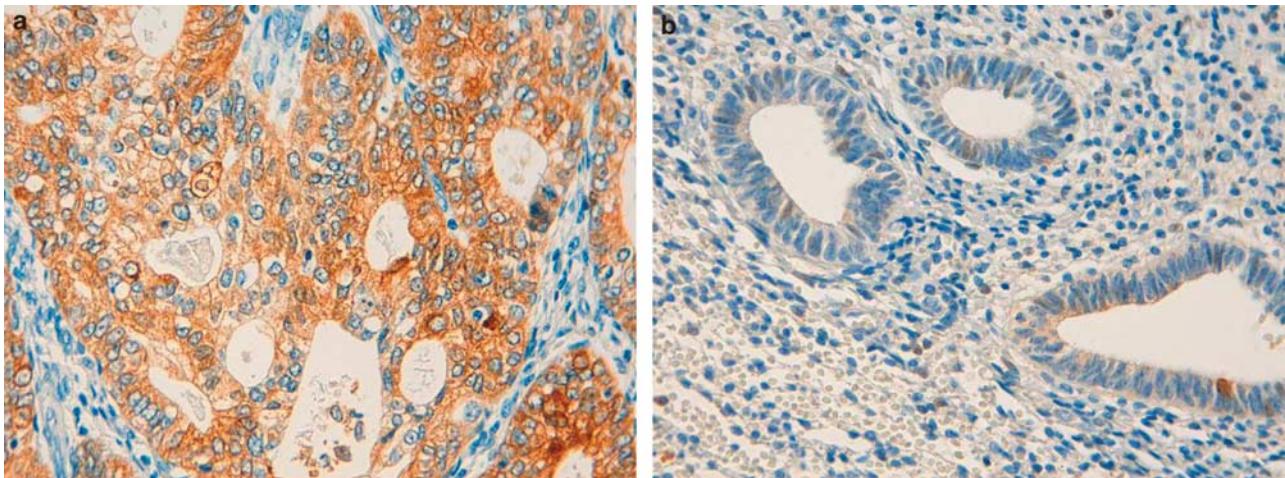
endometrium samples in different phases of the menstrual cycle.

Interestingly, the relationship between FGFR2 expression and estrogen and progesterone expression in endometrial carcinomas was different from the one obtained in normal endometrium during the menstrual phase. In endometrial carcinoma, FGFR2 was significantly associated with increased expression of estrogen receptors (mean Hscore 67; range 0–280;  $r = 0.44; P = 0.00002$ ) and progesterone receptors (mean Hscore 96; range 0–290;  $r = 0.22; P = 0.00122$ ). Moreover, FGFR2 expression was statistically inversely associated with PTEN immunostaining (mean Hscore 40.52; range 0–290;  $r = -0.35; P = 0.00005$ ). A significant association was also seen when correlating the expression of FGFR2 and SPRY2 ( $r = 0.22; P = 0.014$ ). In addition, FGFR2 expression did not show any statistical association with the expression of Ki-67, RASSF1A, STAT-3 and Cyclin D1 (Table 2). Moreover, FGFR2 expression did not show statistical association with KRAS mutations, in the 34 tumors in which KRAS mutation status was known ( $P = 0.85$ ).

Among endometrial carcinoma, FGFR2 immunostaining was higher in endometrioid endometrial carcinoma (mean Hscore 98; range 0–275) in comparison with the nonendometrioid endometrial carcinoma (mean Hscore 38; range 0–260), and the difference was statistically significant (fold change 2.56,  $P = 0.0015$ ; Figure 5). There were no statistical differences when comparing superficial and myoinvasive tumor samples ( $P = 0.5146$ ). Regarding histological grade, no significant differences were seen between grade I and grade II endometrial carcinomas. However, grade III endometrial carcinomas (mean Hscore 54.57; range 0–130) showed decreased FGFR2 expression when compared with grade II endometrial carcinomas (mean Hscore 118.01; range 0–275; fold change = 2.16;  $P = 0.0055$ ). No differences were found regarding pathological stage.

### FGFR2 Mutations

Missense mutations of *FGFR2* gene were detected in exons 6 and 11 (S252W and N549K, respectively) in two of the 31 assessed cases (6.45%), each of them in endometrioid endometrial carcinoma (Figure 6). None of the remaining 29 cases exhibited any mutation. These 31 cases had been previously evaluated for mutations in *PTEN* (15 of 31; 48%), *KRAS* (7 of 30; 23%), *CTNNB1* (5 of 29; 17%), *PIK3CA* (9 of 31; 29%) and also for microsatellite instability (13 of 31, 41%).<sup>7–10,17</sup> The tumor that exhibited the N549K mutation also had one mutation in *PTEN* (993delC) and one mutation in *PIK3CA* (H1065L), whereas the S252W *FGFR2* mutation coexisted with two mutations in *PIK3CA* (T1052K and E542V) and one mutation in *CTNNB-1*. None of these two cases showed a mutation in *KRAS*. DNA polymorphisms in *FGFR2* were very frequent (Figure 7), particularly the V232V change. DNA polymorphisms in exon 5 were seen in 85% of the cases, and in 50% were detected in homozygosis.



**Figure 3** Cytoplasmic FGFR2 expression in endometrial carcinoma (a) and the adjacent atrophic endometrium (b) of the same patient.

**Table 3** Expression of FGFR2 in endometrial carcinoma in comparison with adjacent atrophic endometrium

	Fold change	CI	P-value
Normal (atrophic adjacent to tumor) vs tumor (cytoplasmic expression)	3.35	(1.14–9.74)	<b>0.0283</b>
Normal (atrophic adjacent to tumor) vs tumor (nuclear expression)	0.35	(0.12–0.98)	<b>0.0465</b>

Bold values are significant P-values.

## Discussion

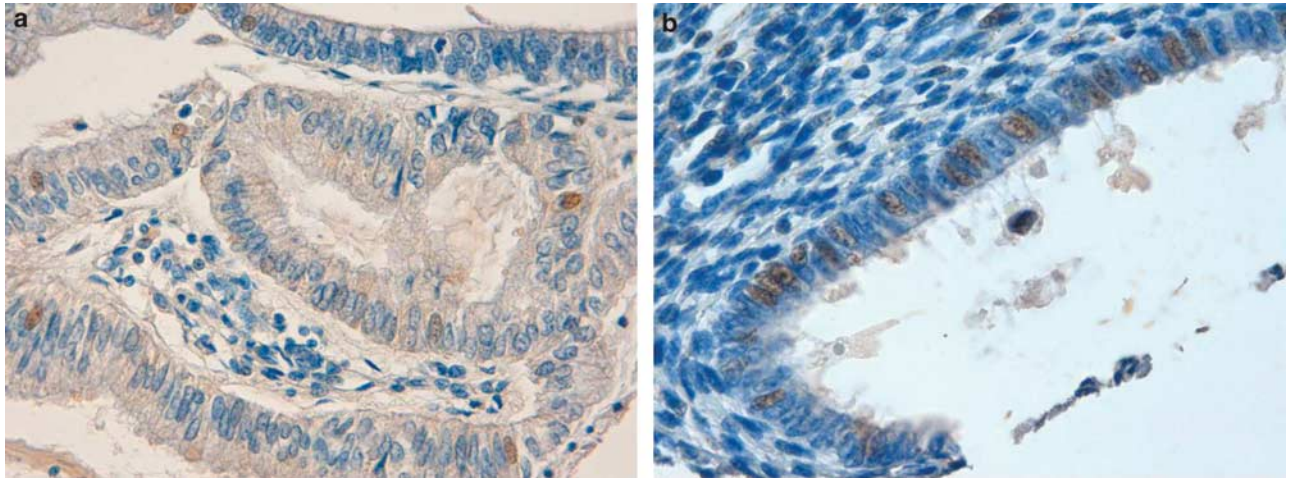
FGFs comprise a large group of heparin-binding growth factors that include 18 ligands. FGFs are expressed in almost all tissues, and play important roles in normal and neoplastic cells by regulating development, wound repair and angiogenesis. FGFs exert their function through four high-affinity tyrosine kinase receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3 and FGFR4).<sup>16</sup> Each receptor contains three Ig-like extracellular domains, a transmembrane region and intracellular domain with tyrosine kinase activity and a carboxy terminus. Binding of FGFs to the extracellular domains of FGF receptor results in dimerization and conformational shift in receptor structure that leads to activation of the intracellular kinase domain and subsequent transphosphorylation of tyrosine kinase domains. Activation of FGF receptors leads to signal transduction through multiple pathways including PLC $\gamma$ , PI3K, MAPK and STATs. However, one of the predominant signaling pathway activated downstream of FGFR is RAS-MAPK. Following FGFR activation, MAPK signaling induces cell proliferation, through induction of Cyclin D1. FGF signaling is under the regulatory control of some proteins. Among them, the members of the *Sprouty mammalian genes* (SPRY)<sup>23</sup> seem to have a significant role. The mode

of action of SPRY proteins is complex and subjected to several unknown mechanisms of regulation. SPRY proteins have been found to regulate both receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream signaling pathways like FGF and RAS-MAPK.<sup>24</sup> By controlling these pathways, SPRY2 is involved in regulation of cell proliferation, differentiation and angiogenesis.

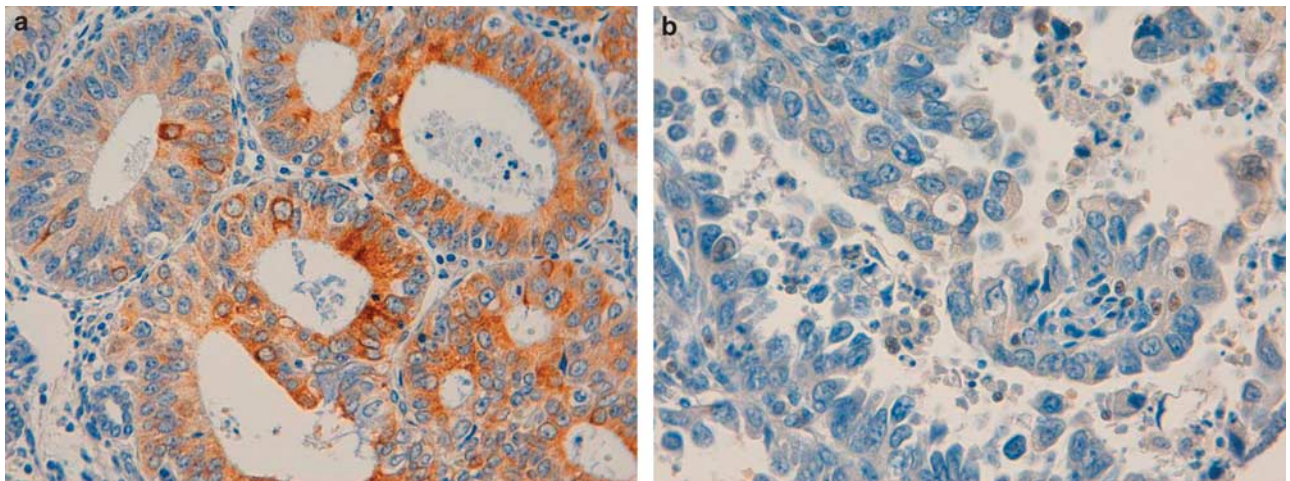
FGF signaling can be involved in tumor development or progression by different mechanisms in a context-dependent manner. In some scenarios, FGF activation may have oncogenic roles by increasing cell proliferation, survival and migration. However, in other settings, FGF signaling may also play tumor-suppressor roles.<sup>25</sup> In fact, loss of FGFR2 signaling may induce epithelial-to-mesenchymal transition<sup>26</sup> in tumor cells. Overexpression of FGFRs has been identified in tumors from the brain, thyroid, breast, prostate and skin. Copy number gains of *FGFR2* have been shown to result in FGFR2 overexpression in cancers from the breast<sup>27</sup> and stomach. Moreover, missense mutations of some of the *FGFR* have been reported. *FGFR2* mutations have been described in cancers from the ovaries, breast, stomach<sup>28</sup> and lung.<sup>29</sup> *FGFR2* mutations around the third immunoglobulin-like domain result in FGFR2 activation due to the creation of autocrine FGF signaling loop. Moreover, mutations involving the tyrosine kinase domain cause FGFR2 activation by release of FGFR2 from autoinhibition. The important role of FGF signaling in neoplastic development can be suggested after demonstration of high prevalence of single-nucleotide polymorphisms (SNPs)<sup>30</sup> within intron 2 of *FGFR2* in association with breast cancer through allelic *FGFR2* upregulation.

As mentioned before, the RAS-MAPK is an important signaling pathway downstream of FGFR. Activation of the pathway begins when a signal binds to a protein kinase receptor such as FGFR, and also EGFR or PDGFR, although it may also be





**Figure 4** Nuclear FGFR2 expression is lower in endometrial carcinoma (a) than the adjacent atrophic endometrium (b) of the same patient.

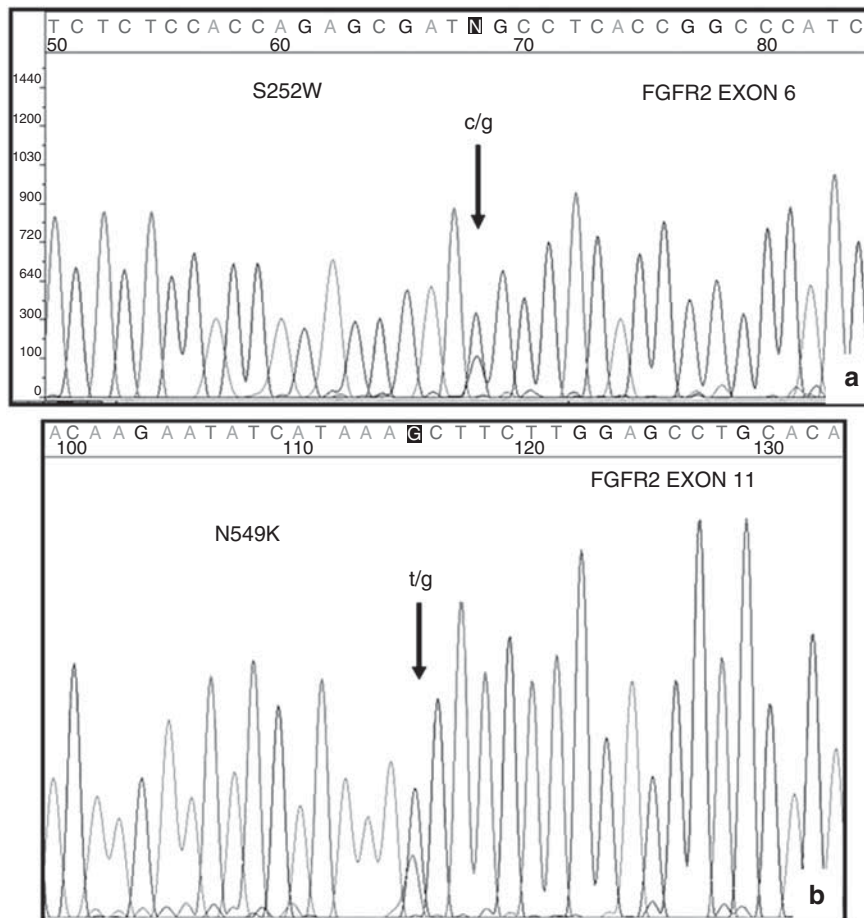


**Figure 5** Cytoplasmic FGFR2 expression is higher in endometrioid carcinomas of the endometrium (a) in comparison with nonendometrioid carcinomas (b).

activated by many other multiple upstream receptors. Deregulation of the RAS signaling pathway plays an important role in endometrial carcinoma.<sup>9</sup> The frequency of *KRAS* mutations in endometrial carcinoma ranges between 10 and 30%. In some series, *KRAS* mutations have been reported to be more frequent in endometrioid endometrial carcinomas showing microsatellite instability. Inactivation of *RASSF1A*, which is a negative regulator of the RAS-MAPK pathway, is also frequent in endometrial carcinoma. In a recent study, we found decreased expression of *RASSF1A*<sup>18</sup> in almost 50% of the cases. Reduced expression of *RASSF1A* was frequently associated with *RASSF1A* promoter hypermethylation.

There are several evidences suggesting that the FGF signaling pathway is important in endometrial carcinoma. Recent studies have shown that endometrial carcinoma presents frequent inactivation of *SPRY2*, a protein that is involved in the negative

regulation of the FGFR pathway. The expression of *SPRY2* has been found to be decreased in several types of human cancer, by mechanisms of promoter methylation. In a recent study, we have found reduced *SPRY2* immunorexpression in almost 20% of endometrial carcinoma, which was strongly associated with increased cell proliferation.<sup>19</sup> In this very same series of cases, *SPRY2* promoter methylation was detected in >50% of the cases. Moreover, somatic mutations in the receptor tyrosine kinase *FGFR2*, identical to the germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes, have been recently detected in 10–12% of endometrial carcinomas, particularly in endometrioid endometrial carcinomas (16%).<sup>13–15</sup> The somatic mutations included the S252W and P235R changes, which are associated with the Apert syndrome, the N549K and K659M, which are associated with Crouzon syndrome, as well as the N550K change.<sup>31</sup> Interestingly, *FGFR2* and *K-RAS*



**Figure 6** *FGFR2* mutations in endometrioid carcinomas: S252W (a) and N549K (b).

mutations were mutually exclusive events, whereas mutations in *FGFR2* and *PTEN* frequently coexisted. Ectopic expression of one *FGFR2* mutation (S252W) in NIH 3T3 cells conferred anchorage-independent growth, suggesting an oncogenic role for *FGFR2* mutations. Moreover, downregulation of *FGFR2* induced cell cycle arrest and cell death, independently to the status of *PTEN*.<sup>15</sup>

In the present study, we have assessed the role of *FGFR2* in endometrial carcinomas. First, we have evaluated *FGFR2* expression in normal endometrium, by correlating *FGFR2* immunohistochemical staining between samples in different phases of the menstrual cycle. Then, we compared *FGFR2* expression between endometrial carcinoma and the normal endometrium samples obtained in patients in different phases of the menstrual cycle, and also with samples corresponding to the atrophic endometrium adjacent to the neoplastic tissue, of the same patients with endometrial carcinoma. The results were very interesting. In normal endometrium during the menstrual cycle, *FGFR2* seems to be associated with decreased proliferative activity, as the expression is higher in the secretory endometrium, and *FGFR2* staining showed an

inverse statistical association with expression of estrogen and progesterone receptors and Ki-67 (MIB-1). In other words, in normal endometrium, *FGFR2* seems to play an inhibitory (tumor suppressor) function, different to the oncogenic role that has been shown to present in endometrial carcinoma. We have mentioned before that *FGFR2* has shown to exhibit this dual activity, by either promoting or inhibiting cell growth, in different cell types in distinct contexts. Now, we show that these different roles may take place in the endometrium, as *FGFR2* expression is associated with decreased proliferation in normal endometrium. It is important to remember that other genes also exhibit different roles in normal and neoplastic tissues. It is worth mentioning that *TGFβ* acts as a tumor suppressor in normal tissue, but plays an oncogenic role in tumors,<sup>32</sup> by promoting cell growth and development of epithelial-to-mesenchymal transition.<sup>33,34</sup> Interestingly, in our study, we identified two different patterns of *FGFR2* immunostaining: cytoplasmic and nuclear. Although cytoplasmic expression was higher in endometrial carcinoma in comparison with the adjacent atrophic endometrium from the same patients, nuclear *FGFR2*

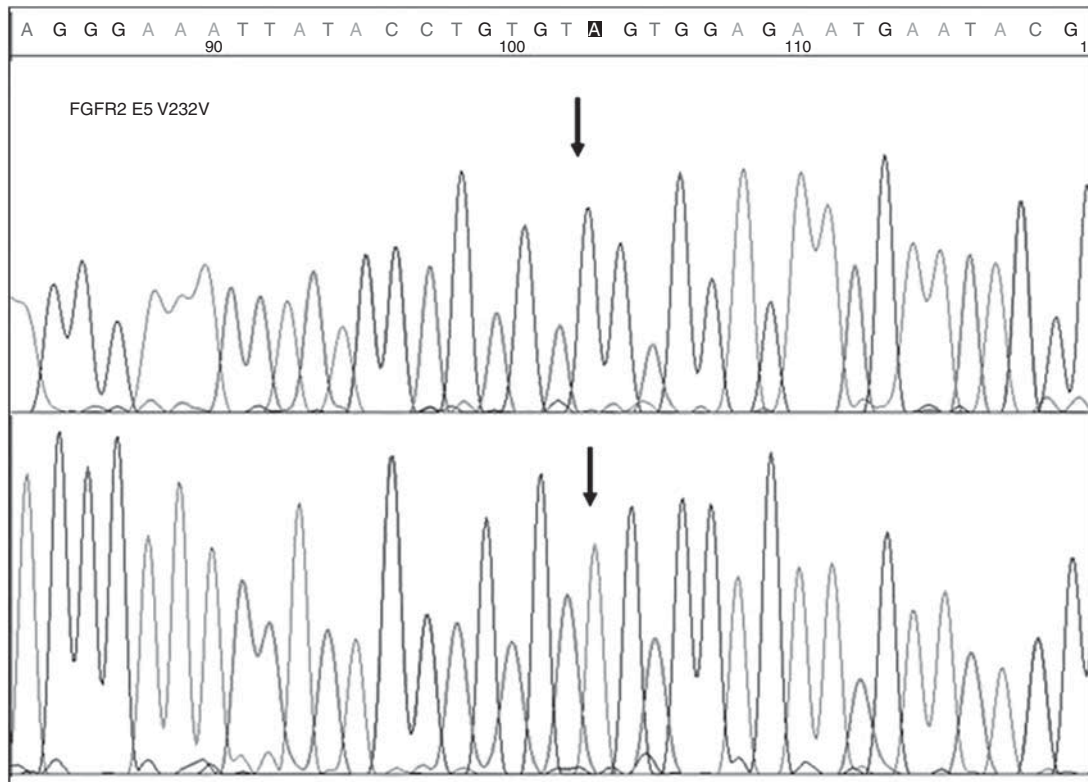


Figure 7 FGFR2 DNA polymorphism in exon 5.

expression was higher in the atrophic endometrium. These results suggest that a shift of FGFR2 from the cytoplasm to the nucleus may be associated with decreased oncogenic activity. There have been reports that FGFR2 may localize to the nucleus in various cell types. For example, nuclear expression of FGFR2 has been observed in Sertoli cell precursors upon FGF9 activation.<sup>35</sup>

As expected, FGFR2 expression was higher in endometrioid endometrial carcinoma than in nonendometrioid endometrial carcinoma, and the difference had statistical significance. In endometrial carcinoma, FGFR2 immunostaining was statistically significantly associated with estrogen and progesterone receptors and inversely associated with PTEN expression, whereas there was not an inverse correlation with SPRY2 expression (an inhibitor of FGF signaling),<sup>23</sup> and there was not significant association with the expression of three proteins related to signaling pathways downstream of FGFR2, such as RASSF-1A, Cyclin D1 (RAS-MAPK) and STAT-3. These results were unexpected. We would expect an inverse relationship of FGFR2 with SPRY2 and RASSF1A, as these are negative regulators of FGF and RAS-MAPK signaling pathways, while we would also expect a good correlation between FGFR2 expression and the immunohistochemical staining of STAT-3 and Cyclin D1, which are proteins activated as a result of signaling pathways downstream FGFR2. The lack of correla-

tion between these proteins probably reflects that many different signaling pathways are interconnected, following diverse genetic and epigenetic alterations, and emphasizes the difficulties of detecting in tumor tissue good correlations between molecular alterations and the expected targets. It is worth mentioning that increased Cyclin D1 staining may also occur in endometrial carcinoma with microsatellite instability, in association with specific mutations in *Cyclin D1*, which prevent Cyclin D1 degradation,<sup>36</sup> and such a phenomenon is independent of RAS-MAPK activation.

Moreover, when correlating FGFR2 staining and pathological features, we saw that grade III endometrioid endometrial carcinoma showed decreased FGFR2 expression when compared with grade II endometrioid endometrial carcinoma ( $P = 0.0055$ ). In addition, no differences were found in FGFR2 expression regarding pathological stage, and there were no statistical differences when comparing tumor cells in the superficial part and those in the front of myometrial invasion.

Mutation analysis of *FGFR2* demonstrated the presence of missense mutations in 2 of the 31 assessed cases. These two cases were endometrioid endometrial carcinoma. They were detected in exons 6 and 11 (S252W and N549K, respectively). Overall, *FGFR2* mutations were detected in 6.45% of endometrial carcinomas, whereas none of the nonendometrioid endometrial carcinoma cases



exhibited any mutation. The frequency of *FGFR2* mutations in this series (6.45%) is a little bit lower than that of previous series (10–12%).<sup>13–15</sup> However, the number of cases tested for *FGFR2* mutations is smaller than that of other series. It is worth mentioning that our series has the additional value that the cases had been previously tested for microsatellite instability, as well as mutations of *KRAS*, *PTEN*, *PIK3CA* and *CTNNB1*. As shown in other series, none of the tumors that presented a *FGFR2* mutation had *KRAS* mutations, whereas *FGFR2* mutations coexisted with mutations in *PTEN*, *PIK3CA* and *CTNNB-1*. Interestingly, we identified many DNA polymorphisms in the coding sequence of *FGFR2* in our series of cases.

In summary, in our study we provide additional information regarding the oncogenic role of *FGFR2* in endometrial carcinoma, and we also show that *FGFR2* has a growth-inhibitory function in normal endometrium. Our results give support to the hypothesis that *FGFR2* may be a good target for therapeutic intervention in endometrial carcinoma.

## Acknowledgements

This study was supported by grants FIS PI070276, FIS PI100922, 2009SGR794, RD06/0020/1034 and programa de intensificación de la investigación, Instituto Carlos III. XD holds a postdoctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028). Tumor samples were obtained with the support of Xarxa catalana de Bancs de Tumors, the Tumor Banc Platform of RTICC and RD09/0076/00059.

## Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bockman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10–17.
- Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, *et al.* Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:569–577.
- Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, *et al.* Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: *STK15* is frequently overexpressed and amplified in non-endometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697–5702.
- Prat J, Oliva E, Lerma E, *et al.* Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10 case study of p53 and c-erbB 2 expression and DNA content. *Cancer* 1994; 74:1778–1783.
- Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, *et al.* Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003;199:471–478.
- Velasco A, Pallares J, Santacana M, *et al.* Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:305–317.
- Catasús Ll, Machín P, Matias-Guiu X, *et al.* Microsatellite instability in endometrial carcinomas. Clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998;29:1160–1164.
- Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, *et al.* *PTEN* mutations in endometrial carcinomas. A molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum Pathol* 2000;31:312–317.
- Lagarda H, Catusus Ll, Argüelles RM, *et al.* k-RAS mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193–199.
- Machin P, Catusus L, Pons C, *et al.* *CTNNB1* mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:206–212.
- Palacios J, Catusús L, Moreno-Bueno G, *et al.* Beta and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2001; 438:464–469.
- Moreno-Bueno G, Hardisson D, Prat J, *et al.* Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981–7990.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, *et al.* Frequent activating *FGFR2* mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 2007;26:7158–7162.
- Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, *et al.* Drug-sensitive *FGFR2* mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8713–8717.
- Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, *et al.* Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite *PTEN* abrogation. *Cancer Res* 2008;68:6902–6907.
- Katoh M. Cancer genomics and genetics of *FGFR2* (Review). *Int J Oncol* 2008;33:233–237.
- Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, *et al.* *PIK3CA* gene mutations in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2006;37:1465–1472.
- Pallarés J, Velasco A, Eritja N, *et al.* Promoter hypermethylation and reduced expression of *RASS-F1A* are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:691–699.
- Velasco A, Pallares J, Santacana M, *et al.* Promoter hypermethylation and expression of *sprouty 2* in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2011;42:185–193.
- Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, *et al.* Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204:569–577.
- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, *et al.* *FLIP* is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to *TRAIL*-induced apoptosis. *Lab Invest* 2005;85:885–894.
- Pallares J, Santacana M, Puente S, *et al.* A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2009;31:217–226.
- Lo TL, Fong CW, Yusoff P, *et al.* *Sprouty* and cancer: the first terms report. *Cancer Lett* 2006;242:141–150.
- Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signaling by *sprouty*: a developing story. *Mol Cell Biol* 2004;5:441–450.
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:116–129.

- 26 Savagner P, Vallés AM, Jouanneau J, *et al.*, Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 1994;5:851–862.
- 27 Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, *et al.*, BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* 1991;6:659–663.
- 28 Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2001; 61:3541–3543.
- 29 Davies H, Hunter C, Smith R, *et al.* Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:7591–7595.
- 30 Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, *et al.* A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 2007;39:870–874.
- 31 Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, *et al.* Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999;14:115–125.
- 32 Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol* 2011;223:205–218.
- 33 Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, *et al.* TGF- $\beta$  regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J* 2011;30: 783–795.
- 34 Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. Transforming growth factor- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene* 2010;29:6485–6498 .
- 35 Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, *et al.* Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* 2004;131:3627–3636.
- 36 Moreno-Bueno G, Rodríguez-Perales S, Sánchez-Estévez C, *et al.* Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene* 2003;22: 6115–6118.





## *Discusión*

---



## **1. LA EXPRESIÓN DE RASSF1A APARECE DISMINUIDA EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

La inhibición de la transcripción causada por la metilación de las islas CpG en el promotor de un gen supresor tumoral se ha convertido en un fenómeno común en los procesos de carcinogénesis. Del mismo modo que la hipermetilación se presenta en gran variedad de tumores, este fenómeno ha resultado ser un mecanismo frecuente de inactivación de genes supresores de tumores en carcinoma de endometrio.

En este estudio se analizó la expresión inmunohistoquímica de RASSF1A y la presencia o ausencia de metilación en la zona promotora del gen RASSF1A en una serie de tumores de carcinoma de endometrio en la que detectamos un 48% de casos en los que los niveles de expresión aparecían reducidos y una frecuencia de metilación 73%, con una asociación estadísticamente significativa entre los dos fenómenos. Aunque la metilación del gen RASSF1A ya había sido previamente evaluada en carcinoma de endometrio, éste resultó ser el primer estudio de la literatura que demostró una asociación con la reducción de expresión en las mismas muestras de carcinoma de endometrio analizadas. En otros estudios, las frecuencias de metilación del promotor de RASSF1A en carcinoma de endometrio fueron del 30% y del 85% [136, 137]. En el estudio de Kang y col se halló metilación en el promotor de RASSF1A en dos de cuatro líneas celulares de carcinoma de endometrio (AN3-CA, HEC-1-B, KLE y RL95-2), y se demostró que las líneas celulares de carcinoma de endometrio con el promotor metilado que habían sido tratadas con 5-aza-2-deoxycitidina, una droga que inhibe la metilación del ADN, restablecían la expresión de RASSF1A.

El análisis de expresión de RASSF1A mediante inmunohistoquímica en nuestra serie de tumores de carcinoma de endometrio resultó ser muy heterogénea. Algunos de los casos fueron RASSF1A positivos en unas áreas y negativos en otras, incluso algunos casos con expresión negativa para RASSF1A contenían pequeñas porciones de células con fuerte marcaje. Se detectaron casos en los que la tinción resultaba positiva aún habiéndose detectado la presencia de metilación en el promotor. La razón de este hecho podría ser explicada si tenemos en cuenta que la metilación puede no tener una distribución heterogénea dentro del mismo tumor, como ocurre con la localización de la proteína en algunos casos. Este fenómeno ha sido explicado en melanoma maligno. La heterogeneidad intratumoral de la metilación encontrada en el promotor del gen RASSF1A en melanoma maligno es un hecho frecuente y soporta la hipótesis de una inestabilidad clonal durante la progresión de los tumores [202].

## **2. RASSF1A PODRÍA SER UN INDICADOR DE LA AGRESIVIDAD DE LOS TUMORES EN PACIENTES DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

Durante la formación de los tumores, la activación de RAS se asocia al aumento de la proliferación, a la transformación y a la supervivencia de la célula. Los efectores de RAS como RASSF1A ejercen señales inhibitorias del crecimiento por lo que se supone que han de ser inactivados en el proceso tumoral. Se han descrito resultados contradictorios entre la inactivación de RASSF1A y las mutaciones en el gen K-RAS en diferentes tipos de tumores. Estos dos fenómenos resultaron ser mutuamente excluyentes en cáncer colorrectal y cáncer de páncreas [203, 204], también en cáncer de pulmón pero en este caso la correlación no fue estadísticamente significativa [205]. En cáncer de tiroides la metilación de RASSF1A ocurría de manera contraria a la detección de mutaciones en el gen BRAF [206]. Debido al hecho de que la existencia de mutaciones en el gen BRAF es relativamente poco frecuente en cáncer de endometrio, nuestro trabajo se focalizó en relacionar la inactivación de RASSF1A con las mutaciones en K-RAS y la inestabilidad de microsatélites.

En la serie de carcinoma de endometrio analizada en este trabajo, de 10 casos con mutaciones en el gen K-RAS, 7 de ellos no expresaban RASSF1A. Kang y col (2006)[135] encontraron una fuerte asociación entre la existencia de metilación en el promotor de RASSF1A en casos de carcinoma de endometrio con inestabilidad de microsatélites y una asociación inversa con la existencia de mutaciones en los genes K-RAS y BRAF en casos de carcinoma de endometrio sin inestabilidad de microsatélites. Pijnenborg y col (2007)[137] publicaron un trabajo en el cual se había encontrado una frecuencia del 85% de metilación en el promotor de RASSF1A en casos de carcinoma de endometrio sin encontrar ninguna relación entre esta metilación y la existencia de mutaciones en los genes K-RAS y BRAF. Ellos mismos describieron la existencia de metilación en RASSF1A en muestras de hiperplasia endometrial con una frecuencia del 50%, en endometrio cíclico con una frecuencia del 21% y en endometrio atrófico con una frecuencia del 38%. Los autores sugirieron que la metilación del promotor de RASSF1A jugaba un papel determinante en el desarrollo temprano del cáncer de endometrio. Sin embargo, en el presente trabajo no se ha hallado ningún caso de tejido no tumoral (correspondientes a la serie de 57 casos de carcinoma de endometrio estudiados) en el que se detectara metilación en el promotor de RASSF1A. Además, el patrón de tinción obtenido en los tejidos no tumorales resultó dependiente de la fase del ciclo menstrual, lo que sugiere que en endometrio normal, RASSF1A se encuentra bajo la regulación de las vías de señalización de las hormonas esteroideas.

La inestabilidad de microsatélites en carcinoma de endometrio ocurre con una frecuencia del 25-30% y es característico del adenocarcinoma endometriode. La identificación de metilación en varios genes en carcinomas de colon y gástrico con inestabilidad de microsatélites sugiere la existencia de una relación entre el fenotipo con inestabilidad de microsatélites y la alteración en el patrón de metilación. En este estudio se ha analizado la posible asociación entre la expresión por inmunohistoquímica de RASSF1A y la inestabilidad de microsatélites en la serie que analizamos. Hemos podido percibir una asociación estadísticamente significativa entre la disminución de la expresión de la proteína de RASSF1A y la inestabilidad de microsatélites cuando se consideran negativos aquellos tumores con un Histoscore por debajo de 50. Estos resultados dan soporte a los datos de Kang y col, quienes demostraron que la metilación de RASSF1A estaba fuertemente asociada con la inestabilidad de microsatélites y la metilación del gen hMLH-1[135]. Resultados similares se obtuvieron en cáncer colorrectal en los que se ha descrito una mayor frecuencia de metilación en el promotor de RASSF1A en aquellos tumores con inestabilidad de microsatélites en comparación con los que no presentan inestabilidad. Estos resultados sugieren que la metilación del promotor de RASSF1A puede ocurrir preferentemente dentro del contexto de adenocarcinoma endometriode con inestabilidad de microsatélites.

En las series estudiadas se observa una frecuencia alta de metilación en el promotor de RASSF1A en asociación con carcinomas pobremente diferenciados en estadio patológico avanzado. En concordancia con estos datos, Jo y col (2006)[207] se encontraron con que la metilación de RASSF1A es significativamente mas frecuente en EC asociado a estadios avanzados (III, IV) con afectación de ganglios linfáticos y grados histológicos altos, además demostraron la presencia de hipermetilación de RASSF1A en pacientes con una incidencia alta de recurrencias y bajo índice de supervivencia libre de enfermedad.

En algunos casos de EC se observó inmunotinción de RASSF1A a nivel nuclear. Estudios bioquímicos han demostrado que RASSF1A es una proteína de unión a microtúbulos que regula la progresión mitótica [208]. También se ha demostrado que la sobre expresión de RASSF1A induce paro mitótico en metafase dando lugar a células mitóticas aberrantes [208]. La mitosis esta regulada por RASSF1A mediante la inhibición del complejo APC (*Anaphase Promoting Complex*) a través de CDC20 (*Cell-Division Cycle protein 20*) e induce el paro de G2-M en prometafase. Además, RASSF1A previene la degradación de la ciclina D1 y retrasa la progresión mitótica [209]. RASSF1A también es capaz de influir sobre otras ciclinas como la ciclina D3 o la ciclina A a través de la interacción con el factor de transcripción p120<sup>E4F</sup>, el cual induce el paro del ciclo celular y promueve el enlace con otros genes supresores de tumores conocidos como p14<sup>ARF</sup>, Rb y p53 que interaccionan con p120<sup>E4F</sup> [210]. Para evaluar la posible relación entre RASSF1A y la maquinaria del ciclo celular, examinamos la relación entre la

expresión de RASSF1A con la expresión de la ciclina D1 o el índice de proliferación (Ki67) pero no encontramos ninguna asociación significativa.

### **3. LA EXPRESIÓN DE SPRY2 APARECE DISMINUIDA EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

La función principal de las proteínas SPRY es la regulación de la vía de señalización RAS-MAPK a través de gran variedad de factores de crecimiento como son FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), GDNF (*Glial-cell Derived Neurotrophic Factor*) y NGF (*Nerve Growth Factor*) [211].

Uno de los primeros autores que establecieron la relación entre las proteínas SPRY y la carcinogénesis fueron Lo y col. en 2004 demostrando la existencia de regulación negativa de SPRY1 y SPRY2 en el 94% de tumores de mama en contraposición al tejido no tumoral. La misma publicación mostraba una alta expresión de SPRY2 durante la formación y el desarrollo de la glándula mamaria y una baja expresión en los tejidos tumorales de la mama estudiados mediante inmunohistoquímica [144]. De manera similar se ha descrito la disminución de la expresión de SPRY2 en cáncer de pulmón de célula no pequeña y hepatocarcinoma [145, 146]. En ambos casos la expresión de SPRY2 se evaluó a nivel de transcrito y de proteína y algunos tumores exhibían una tinción comparable o algo menor a la del tejido normal adyacente. Además, Fong y col. describieron una mayor expresión de SPRY2 en condiciones preneoplásicas de cirrosis comparado con la expresión hallada en hepatocarcinoma y tejido normal.

En el presente trabajo hemos demostrado por vez primera en la literatura la expresión diferencial de SPRY2 en endometrio normal en diferentes fases de ciclo menstrual. Hemos visto que la proteína SPRY2 se expresa de manera diferente en las glándulas endometriales a lo largo del ciclo menstrual, lo cual puede indicar un posible papel de SPRY2 en el desarrollo de las glándulas y de sus ramificaciones, de manera similar al papel tradicional atribuido a las proteínas SPRY en la ramificación de estructuras endoteliales y epiteliales durante la organogénesis. Este modelo reproduce de manera similar el que funciona en la conformación de la tráquea de *Drosophila* y la formación del pulmón en mamíferos [138]. En estos modelos las proteínas SPRY ejercen funciones regulatorias y su expresión impide la formación al azar de ramificaciones en los ductos, actuando como antagonistas de la morfogénesis de la tráquea.

En endometrio normal, SPRY2 podría ejercer un papel regulatorio en el desarrollo de las glándulas durante los cambios morfológicos cíclicos con respecto a las fluctuaciones en los niveles hormonales del ciclo menstrual. Es importante mencionar que la expresión de la proteína

SPRY2 se correlacionó de manera inversa y de forma significativa con la expresión de estrógeno y progesterona del endometrio normal en las diferentes fases del ciclo menstrual, y la expresión de los receptores estuvo en relación muy significativa con el índice de proliferación celular (Ki67).

También hemos mostrado que la expresión de SPRY2 en algunos ECs se ve disminuida en asociación con la hipermetilación del promotor de SPRY2. El hecho de que la expresión de la proteína SPRY2 se viera disminuida en un número significativo de casos de EC (57%) sugiere que la pérdida de la expresión de SPRY2 podría jugar un papel importante en el desarrollo y la progresión del carcinoma de endometrio. Por otro lado, algunos tumores mostraron un incremento en la expresión de la proteína SPRY2 comparado con la expresión en tejido no tumoral. La explicación a este hecho podría encontrarse si se considerara que esos tumores portaran otras alteraciones moleculares que inhibieran los efectos de regulación negativa del crecimiento por parte de la proteína SPRY2 en el proceso de progresión tumoral.

#### **4. SPRY2 COMO GEN SUPRESOR DE TUMORES**

SPRY2 resulta un gran candidato a gen supresor de tumores en EC por tres razones: la primera se debe a que SPRY2 funciona como gen supresor tumoral en otros tipos de tumores sólidos; la segunda es debida a que la región cromosómica 13q31, en la que se localiza el gen SPRY2, ha demostrado sufrir deleciones con frecuencia en EC; la tercera es porque SPRY2 es un regulador negativo de vías de señalización que, frecuentemente, se encuentran alteradas en EC.

En carcinoma de endometrio, la observación de pérdida en la expresión de SPRY2 en tumores de alto grado comparada con la expresión en carcinomas de bajo grado sugiere que SPRY2 podría actuar como gen supresor de la progresión tumoral de manera similar a lo que se ha descrito para tumores que muestran una disminución de expresión durante la metástasis (genes supresores de metástasis). Sin embargo, resulta interesante encontrar una disminución en la expresión de la proteína SPRY2 en endometrio proliferativo con respecto a EC. Aparentemente, estos resultados contradicen el efecto de SPRY2 como supresor tumoral en la génesis del carcinoma, pero este suceso puede explicarse por el importante desarrollo y ramificación de las glándulas endometriales durante la fase proliferativa. En cierto sentido, el endometrio proliferativo posee características similares a ciertos órganos durante el desarrollo embrionario. En otros tipos de órganos, el papel de SPRY2 como supresor de tumores se ha manifestado comparando los niveles de proteína en tumores con los niveles en tejido no tumoral, pero no con el correspondiente tejido durante el desarrollo embrionario. Es por esta razón que nos preguntamos si el endometrio proliferativo es en realidad (igual que otros tejidos



durante la fase de desarrollo embrionario) el mejor tejido para ser comparado frente a los niveles de SPRY2 en tumores y asignar el papel de supresor de tumores a SPRY2 en el endometrio.

La proteína SPRY2 en humanos está codificado por un gen localizado en el cromosoma 13q31.1 que parece estar expresado en todos los tejidos [212]. La expresión del gen SPRY2 puede verse alterada a causa de diferentes mecanismos [143, 213]. En la secuencia génica de SPRY2 se han identificado numerosos sitios de unión a factores de transcripción [214], pero se sabe poco sobre las secuencias reguladoras en el promotor. La región 13q31, donde se localiza el gen SPRY2, muestra pérdida de heterocigosidad en el 11% de los EC [123, 215], sugiriendo que SPRY2 pueda también ser inactivado por delección.

## **5. LA METILACIÓN EN EL PROMOTOR DE SPRY2 ES UN HECHO FRECUENTE EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

En el presente estudio hemos hallado una frecuencia de metilación en el promotor de Spry2 del 53.4% en EC. En general los análisis de metilación en muestras tumorales y no tumorales mostraron combinaciones heterogéneas en la serie estudiada. Sin embargo se encontraron grandes concordancias entre el estado de metilación de las dos islas CpG (A y B) que fueron estudiadas.

Se ha descrito la existencia de hipermetilación del promotor de diferentes genes en EC. Ejemplos de estos genes son hMLH1 y CDKN2A/p16 [216] y el gen APC en estadios tempranos de la tumorigénesis endometrial [85]. En 2001, Salvesen y col.[169] describieron la existencia de metilación en el promotor del gen PTEN con una frecuencia relativamente alta en EC. Los promotores de los genes RARb2 y RASSF1A también se hallan metilados en EC [217, 218]. La hipermetilación del promotor del gen RASSF1A ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo con una frecuencia del 73% en tumores de endometrio. Estos mismos tumores fueron sometidos al análisis de metilación del promotor de SPRY2. La coexistencia de metilación en el promotor de los dos genes se ha encontrado con una frecuencia del 42,9%. Dentro de los tumores de EC que no presentaron metilación en el gen SPRY2 se encontró una mayor frecuencia de metilación del gen RASSF1A que en aquellos que presentaron metilación de SPRY2. Aunque no conseguimos demostrar la relación entre estos dos hechos, los datos sugieren que ambas metilaciones pueden ser procesos mutuamente excluyentes en algunos casos tal y como se esperaría teniendo en cuenta que SPRY2 y RASSF1A son dos reguladores negativos de la misma vía de señalización. Resulta interesante señalar que la hipermetilación del promotor de SPRY2 no se correlaciona con la inestabilidad de microsatélites, fenómeno sí asociado a la hipermetilación del gen hMLH1 [216].

Como era de esperar, la expresión de la proteína SPRY2 se relaciona de manera inversa con la proliferación celular (Ki67) en EC. Estudios anteriores en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 demostraron que la abolición de la actividad endógena de SPRY, por sobreexpresión de un mutante negativo, resultaba en el aumento de la proliferación celular y en un dramático incremento en el potencial tumorigénico [144]. Además, la expresión forzada de SPRY2 en líneas celulares obtenidas de tumores de pulmón, redujo de manera significativa la proliferación y la formación de tumores en ratones [146].

Es importante destacar que la expresión de la proteína SPRY2 fue mantenida en EC de bajo grado pero significativamente reducida en tumores de grado III y en carcinomas de tipo no endometriode. Parece que el hecho de que los EC de bajo grado retengan la expresión de SPRY2 sugiere que la pérdida de la expresión de la proteína podría ser un suceso tardío en la carcinogénesis endometrial o estar asociado con tumores mas agresivos. En cáncer de próstata se han calculado correlaciones inversas entre la expresión de SPRY2 y el grado tumoral de manera que los tumores de alto grado muestran una disminución significativa de la expresión de SPRY2 comparados con hiperplasia benigna prostática y tumores bien diferenciados [219].

Los resultados del estudio de metilación del promotor del gen SPRY2 revelaron un mayor porcentaje de metilación en tumores de grado I en contraposición con aquellos de grado II y III. La evidencia de que la expresión de SPRY2 es reducida en EC de alto grado contradice aparentemente la asociación entre la hipermetilación del promotor de SPRY2 y EC de bajo grado. Es importante darse cuenta de que, como gen supresor tumoral, SPRY2 puede mostrar múltiples mecanismos de inactivación a parte de la metilación del promotor. En este aspecto, hemos mencionado con anterioridad que la región del cromosoma 13q31 muestra ocasionalmente pérdida de heterocigosidad en EC. Los mecanismos de la inactivación del gen SPRY2 difieren a menudo entre diferentes subgrupos de EC. Estos datos son similares a aquellos que Fong y col. proporcionan en el estudio de 2006 en el cual sostienen que la hipermetilación del promotor no es responsable de la regulación negativa de la expresión de SPRY2 en carcinoma hepatocelular [145].

## **6. LAS ALTERACIONES EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K SON UN HECHO FRECUENTE EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

La vía de señalización de PI3K regula una serie de quinasas, factores de transcripción y otras moléculas involucradas en varios procesos celulares como son la proliferación, la supervivencia, la motilidad, el tamaño celular y la traducción del ARN mensajero. La activación de forma inapropiada de la señal mediada por PI3K resulta en el incremento de la señal

independiente de AKT, produciendo el desajuste en los procesos celulares involucrados. La desregulación de la vía de señalización PI3K es un hecho común en cáncer y es responsable, en parte, de algunas de las características fenotípicas de los tumores [41, 42, 220, 221].

La identificación de mutaciones somáticas localizadas en el gen PIK3CA en varios tipos de tumores sugiere que la proteína alterada ejerce un papel oncogénico [222]. El gen PIK3CA, localizado en el cromosoma 3q26, codifica para la subunidad catalítica de PI3K, p110 $\alpha$ . Las mutaciones identificadas en este gen son de tipo *missense* (pérdida de sentido de la proteína) frecuentemente localizadas en el dominio helicoidal (exón 9) y en el dominio quinasa (exón 20) de la proteína. Estas mutaciones afectan a residuos intensamente conservados a lo largo de la evolución. Las proteínas p110 $\alpha$  alteradas por una mutación en el gen muestran un aumento en la actividad quinasa lipídica en comparación con la proteína no alterada. Se han hallado un elevado número de neoplasias que contienen mutaciones el gen PIK3CA, entre ellas tumores malignos de colon, mama, estómago, ovario, pulmón o cerebro[47, 49, 222, 223]. En el caso del carcinoma de endometrio, se han encontrado mutaciones en los exones 9 y 20 de PIK3CA con frecuencias del 10 al 36% en EEC y del 15 al 21% en NEEC [50, 54, 224-226]. Varios trabajos recientes han revelado que existe una cierta frecuencia de mutaciones en los exones 1-7 del gen PIK3CA en tumores de mama, ovario, etc [56, 227]. La región codificada por los exones 1 a 7 del gen corresponde a los dominios de la región N-terminal de p110 $\alpha$  en donde se localizan el ABD (p85/Adaptor-Binding Domain) y el C2 (protein kinase-C homology 2 domain). Es interesante remarcar el hecho de que se ha encontrado una frecuencia bastante alta de mutaciones en estos dominios en tumores de carcinoma de endometrio y que el 60% de las mutaciones confieren la activación de PIK3CA [56].

En este trabajo estudiamos la presencia de mutaciones en el gen PIK3CA en una serie de 33 tumores, los cuales habían sido previamente analizados para inestabilidad de microsatélites y mutaciones en los genes K-RAS, CTNNB-1 y PTEN. También se había examinado la presencia de LOH en el cromosoma 10q23 y la hipermetilación en la región promotora del gen PTEN/psiPTEN. El conocimiento del estado mutacional de PTEN y la existencia de LOH en el cromosoma 10q23 en estos casos nos permitió saber el estado de inactivación bialélico o monoalélico de PTEN en relación con el estado mutacional del gen PIK3CA. Se detectaron mutaciones en PIK3CA en 8 de los 33 casos (24% de los tumores). Todos los tumores que contenían mutaciones en PIK3CA correspondieron a carcinomas endometrioides (aunque los tumores de tipo no endometrioide eran escasos en esta serie) lo que indicó que la desregulación de la vía PI3K es un hecho común en este tipo histológico. En total, 19 tumores contenían una o más alteraciones en PTEN: 15 tumores contenían algún tipo de mutación, 8 presentaron LOH y 6 exhibían hipermetilación del promotor. Once tumores presentaron inactivación bialélica de PTEN mientras que ocho sólo tenían alterado uno de los dos alelos. Las mutaciones encontradas en el gen PIK3CA coexistían con alteraciones

monoalélicas de PTEN en cuatro casos, de los cuales dos correspondían a mutaciones y otros dos a un desequilibrio alélico. Tres de los tumores contenían mutaciones en PIK3CA y ninguna alteración de las estudiadas en PTEN. Tan solo uno de los tumores presentó mutación en PIK3CA y alteración bialélica de PTEN, una de estas alteraciones consistía en la hipermetilación del promotor de PTEN/psiPTEN. Este último suceso cobra un significado biológico confuso desde que en 2002 se publicó un trabajo en el que se investigaba la posible interacción entre el gen PTEN y su pseudogen. psiPTEN (PTENP1) es el pseudogén procesado de PTEN cuya secuencia genómica es idéntica en un 98% a la secuencia del cDNA de PTEN [228]. En el trabajo de 2002 los autores comprueban que es el pseudogen y no PTEN el que se encuentra predominantemente metilado en líneas celulares y tumores de endometrio mama y colon [229].

## **7. LAS MUTACIONES EN EL GEN PIK3CA PUEDEN TENER UN EFECTO ADITIVO A LA INACTIVACIÓN MONOALÉLICA DE PTEN EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

El gen supresor tumoral PTEN es una fosfatasa que antagoniza la vía de señalización PI3K/AKT [52, 53]. PTEN puede ser inactivado mediante multitud de mecanismos, uno de ellos es la existencia de mutaciones somáticas en el gen y que pueden encontrarse en tipos diferentes de tumores. La inactivación por delección también es otro mecanismo común de inactivación de PTEN, como se ha demostrado por la elevada frecuencia de LOH encontrada en diferentes tipos de tumores [230, 231]. Un tercer mecanismo de inactivación de PTEN es la hipermetilación de su promotor [169], aunque ya se ha dicho que existe cierta controversia en la literatura debido a la posible interferencia por parte del pseudogén de PTEN (psiPTEN) con el gen PTEN [229]. En carcinoma de endometrio, PTEN se encuentra frecuentemente alterado. Se ha visto pérdida de heterocigosidad del gen en el 40% de los casos [232, 233] y entre el 37 y el 60% de los casos contienen mutaciones somáticas en PTEN [159, 234]. Estas mutaciones se encuentran casi exclusivamente en EEC y en lesiones endometriales precancerosas [71, 164].

Fueron Oda y col. los primeros en advertir la existencia de mutaciones en el gen PIK3CA en carcinoma de endometrio con una frecuencia del 36% coincidiendo, a menudo, con mutaciones en el gen PTEN [50]. Mediante la inhibición de la expresión de PTEN en la línea celular de EC HEC-1B, la cual contiene mutaciones en los genes K-RAS y PIK3CA, estos mismos autores comprobaron un aumento de la fosforilación de AKT, con lo que pudieron deducir que la concurrencia de una mutación en el gen PIK3CA y la inactivación del gen PTEN podría tener un efecto aditivo en la activación de la vía PI3K. Este descubrimiento fue, en parte,

controvertido puesto que la pérdida de PTEN y la activación de las PI3Ks tienen efectos similares en el pool PIP3, además comprobaron que el valor pronóstico que confiere PTEN por si solo no varia entre aquellos tumores portadores o no de mutaciones en PIK3CA [235]. Por dichos motivos, estos mismos autores propusieron tres hipótesis para explicar la presencia conjunta de alteraciones en los genes PTEN y PIK3CA: 1) para activar completamente la vía PI3K/AKT se requiere mas de un suceso; 2) tanto PTEN como PIK3CA poseen funciones adicionales distintas a la regulación de la vía PI3K; 3) puede que otras isoformas de p110 $\alpha$  tengan algún tipo de función en la formación del carcinoma de endometrio.

La hipótesis de que las alteraciones en genes supresores de tumores pueden causar haplo-insuficiencia ha llevado a la re-evaluación del modelo clásico de la inactivación de genes a través de dos sucesos necesarios. Se ha sugerido que bajo ciertas circunstancias un solo suceso podría ser suficiente para la inactivación de genes supresores de tumor como PTEN [236, 237]. Incluso se ha demostrado que la doble heterocigosidad en proteínas funcionalmente relacionadas podría tener un efecto aditivo en el desarrollo y la progresión de los tumores. Los resultados del presente estudio sugieren que PIK3CA y la inactivación monoalélica de PTEN pueden tener un efecto aditivo en carcinoma de endometrio.

## **8. PIK3CA Y KRAS EJERCEN FUNCIONES MUTUAMENTE EXCLUYENTES EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

Una segunda contribución derivada del estudio de mutaciones en el gen PIK3CA en EC es la posibilidad de que en carcinoma de endometrio, las mutaciones de PIK3CA y de K-RAS puedan ser sucesos mutuamente excluyentes.

La activación de la vía PI3K puede venir inducida tanto por la activación de receptores tirosina quinasa como por la activación de RAS. Los miembros de la familia génica RAS codifican proteínas con actividad GTPasa que regulan la activación de MAPK. Sin embargo, RAS también se une y activa a PI3K, activando así mismo AKT. De esta manera parece lógico que las mutaciones en RAS y PIK3CA resulten redundantes para el desarrollo de los tumores porque las dos implicarían la sobre-regulación de AKT y MAPK.

Posteriormente al presente trabajo, otros estudios han descrito la existencia de mutaciones en el gen PIK3CA en carcinoma de endometrio y la coincidencia con mutaciones en el gen KRAS pero a bajas frecuencias [54]. Una posible explicación a este suceso puede encontrarse en el hecho de que las series estudiadas en estos últimos trabajos fueron de mayor tamaño. De cualquier modo, la frecuencia de mutaciones en PIK3CA resultó menor en EC con mutaciones en KRAS que en aquellos tumores que carecían de mutaciones en este último gen (21% vs 31%). Sin embargo, y mas recientemente, un estudio a mayor escala en el que se

analizan las mutaciones de los genes PIK3CA, PTEN, CTNNB1 y KRAS en una serie de 196 EEC y 20 hiperplasias endometriales, señala la asociación de mutaciones en PIK3CA con PTEN y CTNNB1 pero no con mutaciones en KRAS [238]. En otro estudio reciente en el cual se analiza el estado mutacional de los genes PIK3CA, KRAS, NRAS y BRAF en una serie de 504 tumores de diversos tipos (mas de 28 tipos diferentes de cáncer) demuestra una cierta prevalencia de mutaciones KRAS en tumores con PIK3CA mutado comparado con aquellos con PIK3CA no mutado [239]. Sin embargo, de esos 28 tipos de tumores diferentes, el 50% procedían de colon, ovario y piel (melanoma), mientras que el otro 50% estaba repartido entre los 25 tipos restantes constituyendo tan solo el 6% del total, la representación tumoral de cáncer de útero sin especificar el tipo. De hecho, en dicho estudio, la coexistencia de mutaciones en los dos genes en cuestión se hacía realmente patente cuando se analizaban sólo los casos de colon u ovario. Por lo tanto, se hacen necesarios más estudios que expliquen la discordancia de resultados obtenidos en los diferentes trabajos publicados sobre la simultaneidad de las mutaciones en los genes PIK3CA y KRAS.

Resulta cierta la afirmación de que la asociación entre las mutaciones de los genes PIK3CA y RAS o BRAF tiene cierta implicación en la terapia contra el cáncer. Algunos experimentos han mostrado que la coexistencia de mutaciones en estos genes se encuentra asociada a la resistencia a inhibidores de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en algunos tipos de cáncer excepto en cáncer de ovario [239, 240]. Una posible razón a la gran heterogeneidad encontrada en cuanto a estos datos puede ser el hecho de que algunos estudios preclínicos sugieren que depende del tipo de mutación que haya sufrido el gen, podría estar afectando diferentes vías de señalización en la célula [241].

## **9. FGFR2 TIENE UNA FUNCIÓN INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO EN ENDOMETRIO NORMAL**

Las moléculas FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) comprenden un gran grupo de factores de crecimiento que incluye más de 20 ligandos diferentes. Los FGFs se expresan en casi todos los tejidos y ejercen importantes funciones en células normales y neoplásicas mediante la regulación del desarrollo embrionario, la reparación de tejidos y la angiogénesis. Los FGFs ejercen su función a través de cuatro receptores tirosina quinasa: FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 [107]. Cada receptor contiene tres dominios extracelulares de tipo Ig-like, una región transmembrana, un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa y una región carboxi-terminal. La unión de los FGFs a los dominios extracelulares del receptor resulta en la dimerización y cambio conformacional de la estructura del receptor, lo que permite la transducción de señal a través de múltiples vías de señalización que incluyen PLC $\gamma$  (*PhosphoLipase C gamma*), PI3K, MAPK y STAT-3, aunque la vía de señalización

predominantemente activada por FGFR es RAS-MAPK. A través de la activación de los FGFR, la vía de señalización MAPK induce la proliferación celular mediante la activación de ciclina D1. La vía de señalización FGF se encuentra bajo el control regulatorio de algunas proteínas, entre ellas, los miembros de la familia génica SPRY parecen tener un importante papel [140]. En general, las proteínas SPRY regulan numerosos RTKs y, por lo tanto, las señales derivadas como las de FGF y RAS-MAPK [211].

La vía de señalización FGF puede estar relacionada con el desarrollo o la progresión tumoral mediante mecanismos diferentes. En algunos escenarios, la activación del receptor por FGF puede jugar un papel oncogénico incrementando la proliferación celular, la supervivencia y la migración. Sin embargo, en otros contextos, la señal FGF puede también adoptar el papel de supresor tumoral [242]. De hecho, la pérdida de señal de FGFR2 puede inducir la transición epitelio-mesénquima en las células tumorales [243].

La sobre expresión de los FGFRs ha sido observada en tumores cerebrales, tiroides, mama, próstata y piel. La sobre expresión debida al aumento en el número de copias del gen ha sido relacionada con cáncer de mama y cáncer gástrico [116]. Se han descrito diversas mutaciones del gen FGFR2 en cáncer de ovario, mama, estómago y pulmón [113, 115]. Las mutaciones del gen FGFR2 alrededor del tercer dominio Ig-like resultan en la activación del receptor debido a la creación de una señal autocrina. Las mutaciones que afectan el dominio tirosina quinasa causan la activación del receptor por la falta de autoinhibición. Se ha visto que la importancia de la señal FGF en el desarrollo neoplásico puede relacionarse con la alta prevalencia de SNPs en el intrón 2 del gen FGFR2 en cáncer de mama [244].

Ya se ha mencionado que la vía RAS/MAPK es una vía de señalización que cobra protagonismo tras la activación a partir de las señales FGF. La activación de esta vía empieza cuando una señal se une al receptor FGFR, EGFR o PDGFR, aunque también puede ser activada por otros mecanismos que actúan por encima de los receptores. La desregulación de la vía de señalización RAS juega un papel importante en el carcinoma de endometrio [35]. La frecuencia de mutaciones del gen KRAS en carcinoma de endometrio varía entre el 10 y el 30%. En algunas series, las mutaciones de KRAS se han encontrado más frecuentemente en EEC con MI. La inactivación de RASSF1A, regulador negativo de la vía RAS-MAPK, es también un hecho frecuente en EC. En una parte del presente estudio encontramos una disminución en la expresión de RASSF1A en al menos el 50% de los casos. Esta disminución de expresión se encontró asociada a la hipermetilación del promotor de RASSF1A.

Existen muchas evidencias que sugieren que la vía de señalización FGF es importante en carcinoma de endometrio. Estudios recientes han mostrado que el carcinoma de endometrio presenta inactivación frecuente de SPRY2, proteína que participa en la regulación negativa de la vía FGF. La expresión de SPRY2 se encuentra disminuida en un gran número de tumores diferentes por mecanismos de hipermetilación del promotor. En otra parte de nuestro trabajo,

hemos encontrado una expresión reducida de SPRY2 en casi el 20% de los tumores de endometrio estudiados, lo cual se encontraba asociado a un aumento de la proliferación celular. En esta misma serie de casos, se detectó una frecuencia del 50% de hipermetilación del promotor del gen SPRY2. Además mutaciones somáticas en FGFR2, idénticas a las mutaciones hereditarias asociadas a craneosinostosis y síndromes de displasia esquelética, han sido detectadas recientemente en el 10-12% de carcinomas de endometrio, particularmente en EEC (16%) [114, 121, 245]. Las mutaciones somáticas incluyen los cambios S252W y P235R asociados al síndrome de Apert, los cambios N549K y K659M, asociados al síndrome Crouzon así como el cambio N550K [111]. Es interesante la observación de que las mutaciones en los genes FGFR2 y KRAS fueron eventos mutuamente excluyentes, mientras que las mutaciones de FGFR2 y PTEN coexistían de manera frecuente. La expresión ectópica de la mutación S252W en células NIH 3T3 confería crecimiento independiente de anclaje sugiriendo un rol oncogénico para FGFR2. Además la disminución de FGFR2 induce paro del ciclo celular y muerte independientemente del estatus de PTEN [121].

En este trabajo se ha evaluado la expresión de la proteína FGFR2 mediante marcaje inmunohistoquímico en endometrio normal y se ha estudiado la correlación entre muestras en fases diferentes del ciclo menstrual. Los resultados mostraron mayor expresión en endometrio secretor que en endometrio proliferativo, también se encontró una relación inversa entre dicha expresión y la expresión de receptores de estrógenos, de progesterona y el marcador Ki-67. Estos hechos permiten afirmar que en endometrio normal FGFR2 ejerce una función inhibitoria (supresor tumoral) diferente a la función oncogénica que se ha visto presente en EC.

Respecto a este suceso, ya se ha mencionado con anterioridad que el gen FGFR2 muestra esta actividad dual mediante la inhibición o la activación del crecimiento en diferentes tipos celulares y en diferentes contextos. Nuestro trabajo demuestra que estos dos roles pueden tener lugar en endometrio ya que la expresión de FGFR2 se encuentra asociada a la disminución de la proliferación en tejido no tumoral. Otros genes también exhiben diferentes funciones en tejido tumoral y no tumoral como es el caso del gen TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor- $\beta$ ) que durante las fases tempranas de génesis tumoral actúa como un supresor de tumores mientras que por el contrario y dependiendo del tipo celular, tipo de tumor y el contexto, TGF $\beta$  es capaz de promover procesos que apoyan la progresión tumoral, como la invasión de las células tumorales, la diseminación y la evasión inmunológica [246].



## **10. ROL ONCOGÉNICO DE FGFR2 EN CARCINOMA DE ENDOMETRIO**

En este estudio hemos comparado la expresión de FGFR2 entre carcinoma de endometrio y endometrio normal de pacientes en diferentes fases del ciclo menstrual y también con muestras correspondientes a endometrio atrófico adyacente al tejido neoplásico de los mismos pacientes de carcinoma de endometrio.

En nuestro estudio hemos identificado dos patrones diferentes de inmuno-tinción en FGFR2, una citoplásmica y otra nuclear. Aunque la expresión citoplásmica resultó ser mayor en carcinoma de endometrio comparado con endometrio atrófico adyacente del mismo paciente, la expresión nuclear fue mayor en endometrio atrófico. Estos resultados sugieren que un cambio de FGFR2 desde el citoplasma al núcleo puede estar asociada con la disminución de la actividad oncogénica. Existen publicaciones que marcan que FGFR2 puede estar localizado en el núcleo de algunos tipos celulares, por ejemplo en precursores de células de Sertoli mediante la activación por FGF9 [247].

Como se esperaba, la expresión de FGFR2 fue mayor en EEC que en NEEC y la diferencia resultó estadísticamente significativa. En carcinoma de endometrio la expresión de FGFR2 resultó significativamente asociada a la de los receptores de estrógenos y progesterona e inversamente asociada a la expresión de PTEN, aunque no se encontró relación con la expresión de SPRY2 [140]. Así mismo, no se encontró relación con la expresión de tres de las proteínas relacionadas con las vías de señalización por debajo de FGFR2 como son RASSF1A, ciclina D1 y STAT-3. Estos resultados fueron inesperados ya que al ser SPRY2 y RASSF1A reguladores negativos de las vías de señalización FGF y RAS-MAPK, habríamos esperado una relación inversa. Igualmente se esperaba una relación positiva entre la expresión de FGFR2 y la expresión de STAT-3 y ciclina D1, ya que son proteínas activadas como resultado de la transducción de señales por debajo de FGFR2. La falta de correlación entre estas proteínas refleja el hecho de que las diferentes vías de señalización se encuentran interconectadas siguiendo diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas y enfatiza las dificultades de la detección de buenas correlaciones entre alteraciones moleculares y las dianas esperadas en tejidos tumorales. Se dan casos de EC con presencia de MI en los que se observa la acumulación de ciclina D1 por inmuno-tinción debido a la presencia de mutaciones en el gen de la ciclina que previenen su degradación, siendo este hecho un fenómeno independiente de la activación de RAS-MAPK [248].

Cuando correlacionamos la tinción de FGFR2 y las características patológicas, vemos que en EEC de grado III hay una disminución de la expresión de FGFR2 comparado con EEC grado II. No se encontraron diferencias en la expresión de FGFR2 con respecto al estadio

patológico y no hubieron diferencias significativas comparando células tumorales de la parte superficial con aquellas en el frente de la invasión miometrial.

El análisis de mutaciones del gen FGFR2 demostró la presencia de mutaciones en dos de los 31 casos estudiados. Estos dos casos correspondían a EEC. Las mutaciones fueron halladas en los exones 6 y 11 (S252W y N540K, respectivamente). Por lo tanto, las mutaciones suponían el 6.45% de los casos y ninguno de los casos de NEEC mostraron ninguna mutación. Esta frecuencia encontrada en nuestro estudio resulta ser menor a las frecuencias publicadas en otros estudios (10-12%) [114, 121, 245]. Sin embargo, el número de casos incluidos en este estudio fue menor que en esas otras series. Es importante observar que nuestra serie tiene el valor adicional de haber sido testada para MI, mutaciones en KRAS, PTEN, PIK3CA y CTNNB1. Al igual que en otras series, ninguno de los tumores que tenían mutaciones en FGFR2 tenían mutaciones en KRAS mientras que coexistían frecuentemente con mutaciones en PTEN, PIK3CA y CTNNB1. Es interesante destacar que se encontró una alta frecuencia de polimorfismos en el exón 5 del gen en nuestra serie de casos.

## **11. FGFR2 COMO CANDIDATO A DIANA TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER**

La señal derivada de los FGFs parece jugar un papel crítico no solo en el desarrollo normal y la reparación de daños sino también en la formación y la progresión tumoral [249]. Mutaciones activadoras en la línea germinal han sido asociadas con desordenes del esqueleto como el síndrome de Pfeiffer, el síndrome de Apert, acondroplasia, etc. [115]. Mutaciones somáticas que resultan en la ganancia de función del gen se encuentran presentes en gran variedad de tumores como cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (escamoso) y enfermedades hematopoyéticas [114, 245]. Además de las mutaciones somáticas, otras alteraciones como la amplificación génica o la sobre expresión de los FGFRs, son también presentes en ciertos tipos de tumores como carcinoma de próstata, relacionándose con la génesis y la progresión de los tumores [250]. Por otro lado, dos estudios han asociado la presencia de ciertos SNPs en el gen FGFR2 con la susceptibilidad de desarrollo de cáncer de mama [244] y a la sobre regulación de la expresión del gen [251].

Recientemente las terapias dirigidas han atraído mucho la atención en el campo de la terapéutica contra el cáncer debido a la existencia de un gran repertorio de moléculas inhibitoras que se unen a quinasas activadas de forma aberrante. Uno de los procedimientos validados está relacionado con la unión a proteínas quinasas, particularmente receptores tirosina quinasa, justo en el vértice de las vías clave de transducción de señal.

Durante la última década se han hecho verdaderos esfuerzos por descubrir pequeñas moléculas inhibitoras de los FGFR y se han descubierto numerosos inhibidores selectivos que se unen reversiblemente al lugar de unión a ATP en la molécula del receptor: SU5402, PD173074, NP603 [252, 253] e inhibidores irreversibles que forman uniones covalentes con FGFR como el FIIN-1 [254].

Los compuestos inhibidores de FGFR como el PD17304 bloquean la proliferación y la supervivencia de aquellas líneas celulares de endometrio (MFE280, AN3CA y MFE296) que contienen mutaciones en el gen FGFR2 [245]. La ocurrencia de mutaciones en el gen FGFR2 en diversidad de tumores sugiere la oportunidad de aplicar terapia dirigida utilizando como diana el propio receptor.

# *Conclusiones*

---



**Primera** RASSF1A, SPRY2 y FGFR2 se expresan de manera diferencial en endometrio normal en las diferentes fases del ciclo menstrual

**Segunda** La hipermetilación del promotor del gen RASSF1A se encuentra asociada a tumores que presentan inestabilidad de microsatélites pero no a tumores con mutaciones en el gen KRAS

**Tercera** La hipermetilación del promotor del gen RASSF1A constituye un mecanismo a través del cual los niveles de expresión de RASSF1A se reducen en carcinoma de endometrio

**Cuarta** La expresión del gen SPRY2 en carcinoma de endometrio se ve disminuida en asociación con la hipermetilación de su promotor

**Quinta** La hipermetilación del promotor de SPRY2 no presenta relación con la inestabilidad de microsatélites en tumores de carcinoma de endometrio

**Sexta** Las mutaciones en el gen PIK3CA son un hecho frecuente en carcinoma de endometrio y suelen coincidir con tumores portadores de mutaciones en el gen PTEN

**Séptima** Las mutaciones en los genes PIK3CA y KRAS son sucesos mutuamente excluyentes en carcinoma de endometrio

**Octava** Las mutaciones en el gen FGFR2 se encuentran a frecuencias bajas en los tumores de carcinoma de endometrio

**Novena** La expresión inmuno histoquímica de FGFR2 resulta mayor en tumores de carcinoma de endometrio de tipo endometrioide que en aquellos tumores de tipo no endometrioide



*Anexo*

---





## Review

# Loss of Heterozygosity in Endometrial Carcinoma

Ana Velasco, B.Sc., Judit Pallares, M.D., Ph.D., Maria Santacana, B.Sc., Andre Yeramian, Ph.D.,  
Xavier Dolcet, Ph.D., Nuria Eritja, B.Sc., Soraya Puente, M.D., Anabel Sorolla, B.Sc.,  
Nuria Llecha, M.D., Ph.D., and Xavier Matias-Guiu, M.D., Ph.D.

---

**Summary:** Inactivation of a tumor suppressor gene typically occurs in two steps, thus fulfilling Knudson hypothesis. One “hit” is frequently a point mutation or a small deletion. The other alteration is usually a large genomic loss of part of a gene, or even part of a chromosome, or the whole chromosome. However, it is not clear which of these two events occurs first. Loss of heterozygosity (LOH) analysis allows the identification of one of the 2 hits. Although microsatellite polymerase chain reaction is the technique most frequently used to assess LOH, other different approaches can also be used. The LOH can also be assessed by restriction fragment length polymorphism analysis, single strand conformation polymorphism analysis, oligonucleotide microarrays capable to simultaneously determine the genotype of thousands of single-nucleotide polymorphism (single-nucleotide polymorphism arrays), comparative genomic hybridization, multiplex amplification and probe hybridization, and multiplex ligation-dependent probe amplification. In this article, the authors review the results obtained with molecular analysis of LOH in the understanding of development and progression of endometrial carcinoma. Particular attention is given to: (1) the presence of widespread LOH in nonendometrioid carcinoma, probably reflecting the existence of chromosomal instability; and (2) specific LOH patterns associated with some clinicopathologic features. **Key Words:** endometrial carcinoma—LOH—PTEN—haploinsufficiency—molecular pathology.

---

## LOSS OF HETEROZYGOSITY

Cancer results from successive accumulation of alterations in essential genes that play important roles in cell signaling, proliferation, apoptosis, invasiveness, or angiogenesis. Some of these genes are

overexpressed, producing abundant supplies of their gene products, whereas others are suppressed or even deleted. The former genes in which alterations lead to gain of function are the so-called oncogenes (1). Oncogenes are variations of normal genes (proto-oncogenes) that play important roles in normal cells by activating cell signaling or proliferation. These genes become active because of specific abnormalities such as gene amplification, overexpression, point mutation, insertional mutation, or translocation.

A second group of genes involved in cancer development and progression are the tumor suppressor genes (TSGs) (2). Although these genes are also involved in cell signaling and proliferation, their role in normal cells is the negative regulation of these functions. The TSGs are usually inactivated in cancer cells. Although inactivation of TSGs may take place at the transcriptional and protein levels (enhanced

---

From the Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLLEIDA, Lleida, Spain

Address correspondence and reprint requests to Xavier Matias-Guiu, MD, PhD, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Av Alcalde Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain. E-mail: xmatias@arnau.scs.es

Supported by Grants FIS PI060577, FIS PI070276, SAF2002-10529-E, SAF2004-05250, Marató de TV3 2005-47, and programa de intensificació de la investigació, Instituto Carlos III. Xavier Dolcet holds a postdoctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028). Anabel Sorolla holds a fellowship from Asociación Española contra el Cancer (Lleida contra el cancer).

protein degradation or decreased expression by promoter hypermethylation), it usually results from partial loss of the gene or even loss of the entire gene. According to Knudson, the inactivation of a TSG takes place in 2 steps (3). The first one is usually a point mutation or a small deletion, whereas the second step typically consists of a large deletion of the part of a chromosome that involves a particular gene. However, the question of whether the mutation or the large deletion occurs first is still unresolved. According to Knudson, the 2 steps are required for the loss of gene function. Theoretically, 1 "hit" is not enough for TSG inactivation.

Deletion of genetic material is the most frequently observed genetic alteration in solid tumors and is the most common mechanism for TSG inactivation. Deletion can be detected by analysis of loss of heterozygosity (LOH) (4). Loss of heterozygosity may be defined as the loss of 1 allele at a constitutional (germline) heterozygous locus, and reflects the mechanism by which a TSG loses 1 of the 2 alleles (5). Loss of heterozygosity refers to change from a state of heterozygosity in a normal genome to a homozygous state in a paired tumor genome. Loss of heterozygosity is regarded as a mechanism for disabling TSGs during the course of oncogenesis. It usually reflects 1 of the 2 hits in inactivation of a TSG because localized double deletions (homozygous) targeting a specific gene or locus are very rare.

Searching for specific areas of the genome where LOH occurs commonly in a determinate type of tumor is important because it may lead to recognition of TSGs involved in the development or progression of such tumor. Thus, LOH analysis is frequently used to look for novel TSGs (6). That is, to identify genomic imbalance in tumors, indicating possible sites of TSG deletions. In addition, LOH analysis is commonly used to examine whether a known TSG is inactivated in a type of tumor and also to map unknown TSGs. Detection of LOH not only helps in understanding the molecular mechanisms underlying the development of cancer, but also provides important information useful for disease diagnosis and prognosis. Detection of LOH is commonly carried out by analysis of microsatellite markers (5).

It is worth mentioning that TSGs may be inactivated by mechanisms other than LOH, such as epigenetic promoter hypermethylation. Epigenetic inactivation is defined as a quantitative change imposed onto the functionality of a gene that does not involve an alteration of its coding sequence.

Promoters appear predominantly in CpG-rich DNA sequences termed CpG islands. In normal tissues, active promoters are unmethylated, and their hypermethylation in tumors leads to deactivation with the consequence of underexpression of the affected TSG (7).

## MECHANISMS OF LOH

Although LOH is often thought to result from copy loss events such as hemizygous deletions, a large proportion of LOH results from copy neutral. Thus, LOH may result from several different mechanisms (8) (Fig. 1):

1. Deletion
2. Gene conversion
3. Single or double homologous and nonhomologous mitotic recombinations
4. Translocation
5. Chromosome breakage and loss
6. Chromosomal fusion or telomeric end-to-end fusions
7. Whole chromosome loss with or without accompanying duplication of the retained chromosome

### Deletion

A deletion changes the number of DNA bases by removing a piece of DNA (9–11). Small deletions may remove one or a few base pairs within a gene, whereas larger deletions can remove an entire gene or several neighboring genes. The deleted DNA may alter the function of the resulting protein(s) (Fig. 1B).

### Gene Conversion

Gene conversion is a phenomenon that usually occurs during meiotic division but may take place during mitosis (12,13). It is a process by which DNA sequence information is transferred from 1 allele to another allele. The conversion of 1 allele into the other is caused by inappropriate base mismatch repair during recombination; mismatch repair can alter the sequence of 1 of the chromosomes to match identically that of the other (Fig. 1C).

### Single or Double Homologous and Nonhomologous Mitotic Recombination

Although segregation and recombination usually occurs during meiosis, they take place less frequently in mitosis (14,15). Mitotic recombination is the result of reciprocal exchange of genetic material between

nonsister chromatids of homologous or nonhomologous chromosomes in a mitotic cell. Segregation refers to the separation of 2 alleles constituting a heterozygous genotype into 2 different cells. The alleles of a heterozygote can be occasionally seen to segregate when the heterozygous cell undergoes mitotic division (Fig. 1A).

**Translocation**

A chromosome alteration in which a whole chromosome or segment of a chromosome becomes

attached to or interchanged with another whole chromosome or segment, resulting in a hybrid. Unbalanced translocations, in which there is loss or gain of chromosome material, can be associated with LOH (11,16) (Fig. 1D).

**Chromosome Breakage and Loss**

The repair of chromosomal double-strand breaks is necessary for genomic integrity in all organisms. Genetic consequences of misrepair include chromosomal loss, deletion, and duplication, resulting in LOH. Loss of heterozygosity may be an expected outcome of recombinational repair of chromosomal double-strand breaks by gene conversion mechanisms with a reduction to homozygosity initiated from the site of the break (11,16) (Fig. 1E).

**Chromosomal Fusion or Telomeric**

**End-to-End Fusions**

Occasionally, double-strand breaks may generate broken chromatids, which may acquire telomeric ends, resulting in loss of the DNA distal to the break. Sometimes an end of one chromosome breaks off and fuses to the end of another. In the example shown (Fig. 1E), the fragment fuses to the corresponding end of the twin chromatid.

**Whole Chromosome Loss With or Without Accompanying Duplication of the Retained Chromosome**

It consists of the failure of a chromosome to become incorporated into a daughter nucleus at cell division. One of the causes for loss of an entire chromosome is mitotic nondisjunction. Its mechanism has been uncovered by allelotyping and fluorescent *in situ* hybridization: abnormal mitotic division in which the 2 chromatids of 1 chromosome segregate to a single-daughter cell, whereas neither chromatid of the sister chromosome segregated to this daughter cell (11,16).

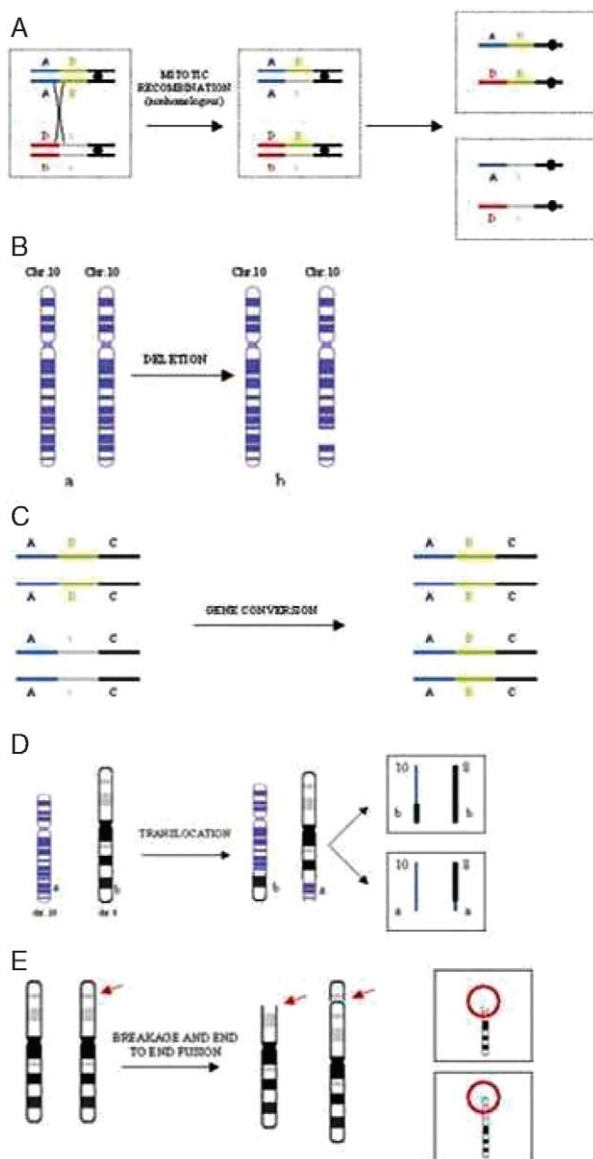


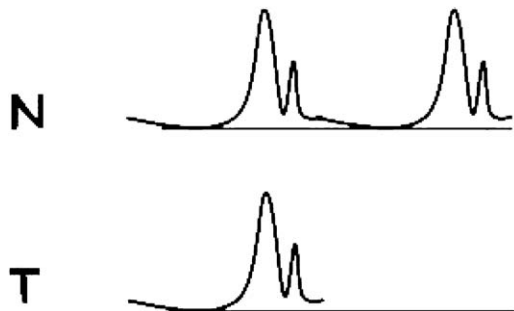
FIG. 1. Different mechanisms for LOH in tumors.

**METHODS FOR DETECTING LOH**

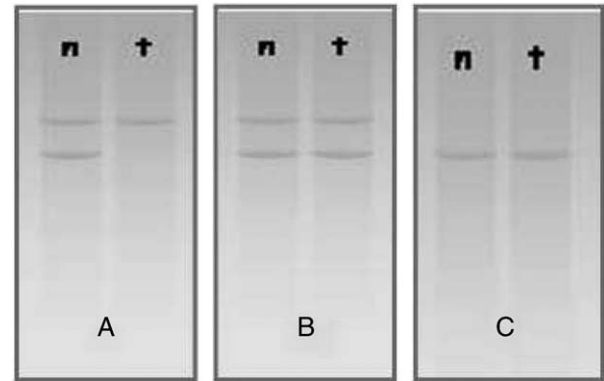
**Microsatellite Polymerase Chain Reaction**

Analysis of LOH requires identification of loss of polymorphic markers that flank a TSG. Loss of heterozygosity is frequently identified by microsatellite polymerase chain reaction (PCR) (17–19). Microsatellites are short tandem DNA repeats made of

dinucleotides or trinucleotides that are distributed throughout the genome. Because they are usually small and they are flanked by DNA with specific sequences, they can be amplified by PCR. It is important to select markers with a high rate of heterozygosity in the population to minimize the number of uninformative cases. The informative status of a sample with respect to individual microsatellite loci should be screened. If a patient is homozygous for a given microsatellite locus, then the microsatellite alleles are the same size after PCR, generating a single peak, and a loss of one of the two alleles cannot be detected, and the patient is designated as noninformative for that marker. Because of the risk of uninformative markers, a group of microsatellites (5,6) should be selected. Interpretation of LOH should be performed by following objective criteria. A double peak observed for the microsatellite marker amplified from normal DNA indicates a heterozygote. A single peak in tumor tissue DNA compared with normal tissue DNA indicates loss of 1 allele (Figs. 2 and 3). The ratio of DNA peaks obtained for pairs of alleles should be compared between normal and tumor tissue. A ratio greater than 1.5 is considered LOH of the shorter allele, and a ratio less than 0.5 is considered LOH of the longer allele. Ratios from 0.5 to 1.5 should be interpreted as no LOH. Correct interpretation of LOH in a sample usually requires absence of contamination by normal tissue because the presence of cells without LOH (normal cells) may alter the allelic peak height ratios. In tumor samples that have been obtained without using precise microdissection techniques, the samples may contain a mixture of intergrowing tumor and nontumor (stromal and inflammatory) tissue, so that LOH may show a decreased relative intensity (allelic



**FIG. 2.** Loss of heterozygosity as seen in capillary electrophoresis analysis after microsatellite PCR. Notice the presence of a single peak in tumor tissue DNA compared with normal tissue DNA. N indicates normal tissue; T, tumor tissue.



**FIG. 3.** Schematic representation of LOH patterns obtained by microsatellite analysis and gel electrophoresis. A, LOH. B, No LOH. C, Noninformative. N indicates normal tissue; T, tumor tissue.

imbalance) rather than total loss of the band from one allele. For that reason, tissue microdissection is recommended (20).

#### Karyotype Analysis

Karyotype analysis was the traditional method to assess gene deletions. It is a good method for detecting large deletions, but it is limited to cells in metaphase. It has limited value in detecting small deletions (21).

#### Fluorescent *In situ* Hybridization

Fluorescent *in situ* hybridization is also a good method to identify deletions in tumor cells, both in metaphasic or interphasic nuclei. It usually requires the identification of the deleted target gene with a locus-specific probe, in combination with preservation of the corresponding chromosomal centromere, with the appropriate centromeric probe. It has limited value in detecting small deletions (22).

#### Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis

In restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, the target gene is amplified by PCR with specific primers, and PCR products are subsequently digested with restriction enzymes that recognize specific DNA sequences. Loss of heterozygosity can be detected by RFLP when the gene under study contains in its coding sequence a DNA polymorphism that is recognized by a particular restriction enzyme. If the patient is heterozygous for such polymorphism, RFLP analysis in normal tissue will allow the recognition of the 2 alleles by their

specific RFLP pattern, and the case is informative for LOH at such locus. Thus, in tumor DNA, LOH is detected by the absence of the RFLP pattern of one of the 2 alleles (23,24).

#### **Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis**

Single strand conformation polymorphism analysis is the electrophoretic separation of single-stranded nucleic acids based on subtle differences in sequence (often a deletion of a single base pair) that results in a different secondary structure and a measurable difference in mobility through a gel. By comparing PCR products of tumor with matched normal tissue, single strand conformation polymorphism analysis can identify LOH in specific genes (25).

#### **Multiplex Amplification and Probe Hybridization**

In the multiplex amplification and probe hybridization technique, genomic DNA is fixed to a membrane and hybridized with a set of probes corresponding to the target sequences to be detected. The different probes must be of sufficient size difference to be resolved by electrophoresis. The membranes are then washed vigorously to remove unbound probe, and the remaining specifically bound probe will be present in an amount proportional to its target copy number. The probes are then stripped from the membrane and amplified simultaneously with the universal primer pair. Products are then separated by electrophoresis, and a relative comparison is made between the band intensities or peak heights, depending on the detection method. Reduced band intensities or peak heights compared with internal control probes indicate reduction in gene copy number (deletion), and an increase in gene copy number will result in increased band intensities or peak heights (26).

#### **Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification**

In the multiplex ligation-dependent probe amplification technique, genomic DNA is hybridized in solution to probe sets, each of which consists of 2 halves. One half consists of a target-specific sequence (20–30 bp) flanked by a universal primer sequence and can be generated synthetically. The other half also has a target-specific sequence at one end (25–43 bp) and a universal primer sequence at the other, but has a variable-length random fragment in-between (19–370 bp) to generate the size differences necessary in the probes to allow electrophoretic

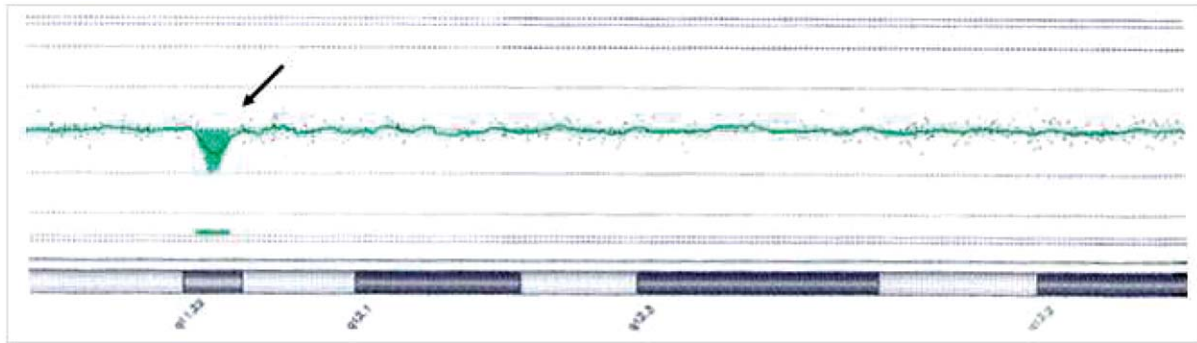
resolution. The 2 probe halves are designed in such way that the target-specific sequences bind adjacently to the target DNA and can then be joined by use of a ligase. This generates a contiguous probe flanked by universal primer binding sites that can then be amplified by PCR, whereas unbound probe halves cannot be amplified, and hence eliminates the need for removal of excess probe by washing. The amounts of ligated probe produced will be proportional to the target copy number, and after PCR amplification, the relative peak heights indicate deletion or duplication of target sequence (13,26,27).

#### **Comparative Genomic Hybridization and Comparative Genomic Hybridization Arrays**

Comparative genomic hybridization (CGH) is based on cohybridization of differentially labeled tumor and normal DNA to human metaphase chromosomes. Three images of the hybridization, representing both fluorescent labels and DNA counterstain (4',6-diamidino-2-phenylindole), are acquired using epifluorescence microscopy and a CCD camera interfaced to a computer. Subsequently, an image analysis software program is used to calculate green-red fluorescence intensity ratio profiles along all chromosomes. Regions of the genome that are either gained or lost in the tumor are indicated by the differences between binding of the 2 labeled DNAs, as evidenced by the fluorescence intensity ratio profiles. Thus, in a single hybridization, it is possible to screen all chromosomal sites that may contain genes that are either deleted or amplified in cancer. Comparative genomic hybridization allows much easier screening for large deletions but lacks the resolution required to detect small deletions; no less than 10 Mb for DNA losses. Using the CGH principle of competitive hybridization, but to DNA microarrays rather than chromosome spreads, may solve this problem (Fig. 4). Array comparative genomic hybridization enables genome-wide gene copy number measurements and amplification detection at molecular genetic resolution of around 150 Kb. Similarly, cloning and sequencing of fragile sites produce mapping information of vastly improved resolution (28–31).

#### **Oligonucleotide Microarrays**

In addition to their application in messenger RNA expression profiling, oligonucleotide microarrays have also been applied to single-nucleotide



**FIG. 4.** Example of individual chromosome profile obtained by array CGH. Arrow shows a deletion in q11.22 locus.

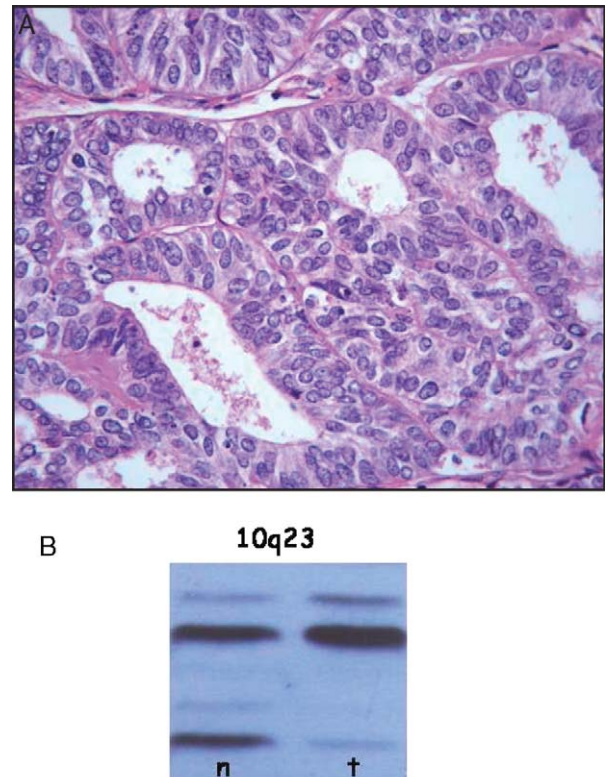
polymorphism (SNP) and LOH. Oligonucleotide microarrays are capable of simultaneously determining the genotype of thousands of SNPs. There are more than 1.4 million SNPs distributed throughout the human genome, at an average density of one SNP per Kb of DNA sequence. Single-nucleotide polymorphism arrays provide a high-throughput high-resolution approach to genotypic analysis that includes assessment of LOH of chromosomal regions based on paired normal and tumor samples from the same patients. The application of informatics tools to this technique may allow the identification of LOH in many loci, and also to perform hierarchical clustering of cancers based on shared LOH patterns (19,32). Resolution varies according to the type of array, but LOH may be resolved at least to about 3 Mb, or 100 SNPs, in 100K arrays.

#### LOH REFLECTS CHROMOSOMAL INSTABILITY IN NONENDOMETRIOID CARCINOMA

Endometrial carcinomas are heterogeneous (33). They can be classified into 2 main clinicopathologic variants: Type I, endometrioid adenocarcinoma (EEC) and their variants (Fig. 5); and Type II, non-EEC (NEEC) (Fig. 6). Type I tumors are low-grade and estrogen-related EECs that usually develop in perimenopausal women and coexist with or are preceded by complex and atypical endometrial hyperplasia. In contrast, Type II tumors are NEECs (mainly papillary serous and clear cell carcinomas). They are aggressive tumors, unrelated to estrogen stimulation, and arises occasionally in endometrial polyps or from precancerous lesions developing in atrophic endometrium (so-called intraepithelial carcinoma) that mainly occur in older women.

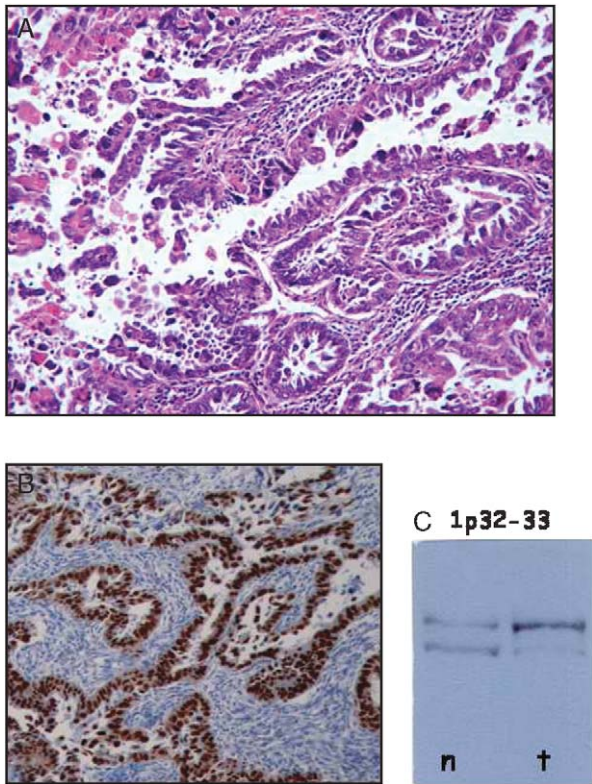
The molecular alterations involved in these 2 types of tumors are different. It has been shown that Type I, EEC, characteristically shows 5 different molecular alterations that may coexist in some cases: microsatellite instability and mutations of *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA*, and *CTNNB1* genes. In contrast, NEEC is usually associated with mutations in the p53 TSG and some other genes (34–36).

Several studies have compared the LOH profile of Type I with that of Type II EC (37–39). In 1997,



**FIG. 5.** Representative picture of an EEC (A). The tumor is frequently associated to LOH at 10q23, in the region of *PTEN* (B). N indicates normal tissue; T, tumor tissue.





**FIG. 6.** Representative appearance of a NEEC of the papillary serous type (A). The tumor frequently shows p53 alterations (B), and LOH at 1p32-33 (C). N indicates normal tissue; T, tumor tissue.

Tritz et al. (37) analyzed the presence of LOH in 18 EECs (the “estrogen-dependent usual type of endometrial carcinomas”), and 13 NEECs (the “estrogen-independent special variants of endometrial carcinomas”). They evaluated 26 polymorphic loci in different chromosomes and found LOH in all NEECs, which were particularly common on chromosomes 17p, 14, and 12, with frequencies of losses in informative cases at 83%, 77%, and 40%, respectively. Among the 18 EECs, only 28% showed allelic loss on at least 2 loci. In EECs, LOH was more frequent on chromosomes 17, 13, and 2 (2%, 20%, and 19%, respectively). The EECs showed an average LOH of 11% among 23 chromosomes analyzed, whereas NEECs had an average LOH of 24%. Conversely, NEECs showed a higher frequency of LOH on the short arm of the chromosome 17p than on the long arm 17q (87% vs. 62%), never showed LOH confined to 17q, and did not undergo total chromosome 17 loss. The authors suggested that this could reflect the preferential involvement in endometrial tumorigenesis of genes on 17p, such as p53, but

not of those on 17q, such as *BRCA1*. Pere et al. (38) performed a CGH study in 24 serous and 24 endometrioid carcinomas. The most common losses in serous carcinomas were located at 4q (17%), 15q (17%), and 18q (17%). In contrast, losses were rarely observed in EECs. In a different study, Micci et al. (39) evaluated a series of 67 endometrial carcinomas by karyotyping and CGH. Moderately differentiated, EECs showed losses at 9p, 9q, 17p, 19p, 19q, and Xp, whereas poorly differentiated EECs exhibited LOH at 5q, 9p, 9q, 17p, 17q, Xp, and Xq. Serous tumors showed frequent LOH at 17p, whereas clear cell carcinomas had losses at 6q.

It seems that the patterns of LOH are different in these 2 types of tumors. In Type I EECs, there is frequent LOH in regions that correspond to specific TSGs involved in the pathogenesis of the tumor; for example, the region 10q23.3, where the *PTEN* gene is located (see later). Some other loci show LOH in both EECs and NEECs, but with significantly different frequencies. This is the case of the region 16q22.1, where the *CDH1* gene is present (see later), that shows LOH in 57% of NEECs and in 22% of EECs. In addition, LOH at 1p32-33 is more frequent among NEECs (63.2%) than in EECs (18%) (see later) (40). In NEECs, there is widespread LOH probably reflecting a more generalized aneuploidy rate typical of high-grade tumors. In other words, it probably reflects chromosomal instability. In fact, complementary DNA arrays have demonstrated that NEECs usually show upregulation of genes (*STK-15*, *BUB1*, *CCNB2*) that are involved in the regulation of the mitotic spindle checkpoint. One of them, *STK-15*, which is essential for chromosome segregation and centrosome functions, is frequently amplified in NEECs (41).

#### SPECIFIC LOH PATTERNS ASSOCIATED WITH CLINICOPATHOLOGIC FEATURES

Studies on LOH in endometrial cancer have found high rates of LOH in several chromosomes, including 1p, 3p, 5q, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 14q, 16q, 17p, and 18q. The reported frequency for LOH in endometrial carcinomas is shown in the Table 1. The text that follows describes the association between several of these loci and some clinicopathologic features. However, it is worth mentioning that most studies correlate LOH data with clinical findings such as stage or survival. Only a few studies correlate allelic losses with pathological data.



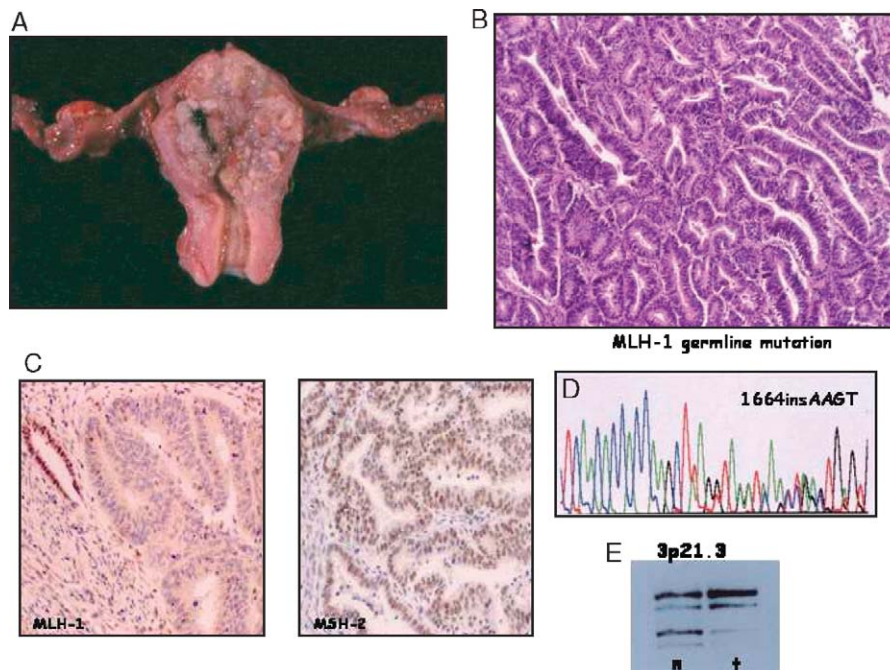
TABLE 1. LOH studies in endometrial cancer

Locus	EC (%)	EEC (%)	NEEC (%)	Reference	Locus	EC (%)	EEC (%)	NEEC (%)	Reference
1p32-p33	12	12		Arlt et al. (43)	11p15.5	13			Fujino et al. (47)
	8	10	57	Arlt et al. (42)	11q13	44			Sirchia et al. (44)
	5			Fujino et al. (47)	11q14.3	20	15	28	Tritz et al. (37)
1p36	11			Peiffer et al. (48)	11q22.1-q22.3	12			Fujino et al. (47)
1q21	8			Fujino et al. (47)	12p12	20	13	40	Tritz et al. (37)
2p14	13	19		Tritz et al. (37)	13q14.1-q14.2	15	20	9	Tritz et al. (37)
2q14	33			Sirchia et al. (44)		18			Semczuk et al. (62)
3p13	7			Tritz et al. (37)	13q31.3	11			Fujino et al. (47)
3p14.2	37			Hadaczek et al. (45)	14q11	26			Niederacher et al. (68)
	24			Ozaki et al. (46)		19			Fujino et al. (47)
3p21	12			Fujino et al. (47)	14q32.1	40	7	77	Tritz et al. (37)
	12			Peiffer et al. (48)	15q11	21			Peiffer et al. (48)
3p25	12			Fujino et al. (47)	15qcen-q15	8		17	Pere et al. (38)
3q27	9			Fujino et al. (47)	15q26	14	9	20	Tritz et al. (37)
4p14	15		36	Tritz et al. (37)		14			Fujino et al. (47)
4p16	4			Fujino et al. (47)		40			Sirchia et al. (44)
4q12	5			Fujino et al. (47)	16q21	23	13	36	Tritz et al. (37)
4q22-qter	8		8	Levan et al. (51)		27			Niederacher et al. (68)
4q32-qter	8		17	Pere et al. (38)		8		8	Levan et al. (51)
5p15	5			Fujino et al. (47)	16q22.1-q23.1	40			Kihana et al. (63)
5q11	3			Fujino et al. (47)		22			Fujino et al. (47)
5q14.3	19	15	25	Tritz et al. (37)		31	22	57	Moreno-Bueno et al. (40)
	17			Peiffer et al. (48)	16q23.1-q24	23			Fujino et al. (47)
5q21-q22	24			Moreno-Bueno et al. (36)	17p12	47	22	83	Tritz et al. (37)
	5			Fujino et al. (47)		29			Peiffer et al. (48)
	16			Peiffer et al. (48)	17p13.1	32			Kihana et al. (67)
6p25.3	20			Peiffer et al. (48)		11			Fujino et al. (47)
6q21.3	15			Fujino et al. (47)		27			Niederacher et al. (68)
6q25.1	20			Fujino et al. (47)		25			Sirchia et al. (44)
7p12	13			Fujino et al. (47)		19			Semczuk et al. (69)
7q31	14	15	12	Tritz et al. (37)	17q21	18			Niederacher et al. (68)
	15			Fujino et al. (47)		37			Sirchia et al. (44)
7q35-qter	16			Peiffer et al. (48)	17q23	32	17	54	Tritz et al. (37)
	24			Sirchia et al. (44)	18p11	12			Fujino et al. (47)
8p12	20			Fujino et al. (47)	18q21.1	33			Fujino et al. (47)
8p22	11			Fujino et al. (47)		8		8	Levan et al. (51)
8q23.3	16	11	20	Tritz et al. (37)	18q21.3	13	11	17	Tritz et al. (37)
9p21	21			Fujino et al. (47)		26			Gima et al. (70)
	24			Semczuk et al. (52)	18q22-qter	8		17	Pere et al. (38)
9q31.1	17	7	33	Tritz et al. (37)	19p13	15			Peiffer et al. (48)
10q22.1	37			Sirchia et al. (44)	19q12	5	7	0	Tritz et al. (37)
10q23.31	18			Sirchia et al. (44)	20p12.1	41	8	33	Tritz et al. (37)
	55			Liu et al. (73)	21q22.3	16	6	14	Tritz et al. (37)
	23			Matter et al. (74)	22q11.23	8	0	25	Tritz et al. (37)
	40			Bussaglia et al. (55)		7			Fujino et al. (47)
10q25.2	40			Peiffer et al. (48)	Xp11.3	17	6	11	Tritz et al. (37)
	40			Baldinuet al. (54)	Xp22	11			Fujino et al. (47)
10q26.3	10	8	14	Tritz et al. (37)	Xq11.2	14			Fujino et al. (47)

Deletions in 1p32-33 have been frequently identified in ECs and seem to be closely related to histologic type, particularly a serous phenotype (Fig. 6). In 1 study, the authors used 17 microsatellite repeat polymorphisms from the short arm of chromosome 1. Loss of heterozygosity at the critical region (1p32-33) was seen in 18% of EECs in comparison with 63.2% of NEECs (42,43).

Loss of heterozygosity at 2q14 was identified in 33% of ECs in 1 study (44). Loss of expression

of the fragile histidine triad transcription protein was identified in 37% of ECs in 1 study (45). The *FHIT* gene, located in 3p14.2, has been identified as a possible TSG in tumors of diverse sites, such as carcinomas of the head and neck, lung, or uterine cervix. Loss of expression was associated with deletions in several exons of the gene in some cases. In 1 study, LOH at D3S1300 and D3S403, both located within exon 5 of *FHIT*, were detected in 24% of cases (46). Other loci in chromosome 3p that are



**FIG. 7.** Representative pictures of the gross (A) and microscopical appearance (B) of an EEC in a patient with hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. The tumor shows negative immunostaining for *MLH1* (C), the presence of a germline mutation in *MLH1* (first hit) (D), and a somatic LOH at 3p21.3 (second hit) (E). N indicates normal tissue; T, tumor tissue.

involved in ECs are 3p25 and 3p21.1-14.2 (12%) (47,48). An association between LOH at 3p and 13q (regions of *MLH-1* and *BRCA2* genes) and response of EC to radiotherapy was also reported (49). Loss of heterozygosity at 2p16 and 3p21.3, in the regions of *MSH2* and *MLH-1*, are found in ECs of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. Interestingly, the tumors that occur in this setting usually have an endometrioid morphology and exhibit microsatellite instability. Loss of heterozygosity at these loci are the second hit in the inactivation of these genes. The first hit is an *MSH2* or *MLH-1* germline mutation (Fig. 7). In contrast, sporadic EECs with microsatellite instability do not show LOH at these loci, but promoter hypermethylation of *MLH1* (50).

Levan et al. (51) performed a CGH study in 98 EECs and found frequent losses in 4q22-qter, 16q21-qter, and 18q21-qter, all of which were detected in 8% of the tumors. Moreover, LOH at the *APC* locus, on 5q21, was also identified in 24.3% of the informative ECs with no associations with clinicopathologic features (36). Loss of heterozygosity at 7q35 was identified in 24% of ECs in one study (44). Some loci in chromosome 8p that show LOH in ECs are 8p22 (11%) and 8p12 (20%) (47). Loss

of heterozygosity on 9p21, at the locus of p16/INK4A, was also detected in 20% to 25% of ECs in several series (52). Interestingly, inactivation of p16 by either LOH or promoter hypermethylation is more frequent in NEECs (40%) than that in EECs (10%) (53).

Loss of heterozygosity at 10q25-q26 was shown to be present in ECs from Sardinian patients, suggesting the presence of a TSG in the region that could correspond to the *CASC-2* gene (54).

Loss of heterozygosity at chromosome 10q23 occurs in 40% of EECs and corresponds to the region of *PTEN*, which is an important gene in the development and progression of endometrial carcinoma. In agreement with Knudson's proposal, LOH at 10q23 frequently coexists with somatic *PTEN* mutations that are also found in 37% to 61% of EECs (55). Both genetic alterations are almost exclusively restricted to endometrioid endometrial carcinomas (Fig. 5) and in its precursor lesion, endometrial hyperplasia. The coexistence of LOH at 10q23 and a *PTEN* point mutation leads to activation of the phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT) pathway, which plays a key role in the regulation of cellular homeostasis (56). Activated AKT modulates the expression of several genes involved in suppression

of apoptosis and cell cycle progression. However, evaluation of *PTEN* mutations and LOH at 10q23 in a series of endometrial carcinoma has shown that they do not necessarily coexist in the same tumors, challenging the "2-hit" hypothesis for TSG for phosphatase and tensin homolog (PTEN) in ECs. In a recent study of our group, we have detected any of these 2 genetic alterations in 57.7% of the tumors, but coexistence of 2 genetic alterations (mutation and LOH or double mutations) was seen in only one third of the cases (57). In such study, the tumors that exhibited only 1 of these 2 alterations (mutation or LOH) were interpreted as having monoallelic inactivation of PTEN. Interestingly, the tumors with monoallelic inactivation of PTEN presented frequent mutations in the *PIK3CA* gene, which codes for the p110 $\alpha$  catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase (58). Haploinsufficiency may explain the presence of PTEN monoallelic inactivation. The hypothesis that alterations in TSGs can cause haploinsufficiency has led to a reevaluation of the classical 2-hit model of TSG inactivation. It has been suggested that under certain circumstances, 1 hit may be sufficient for inactivation of TSGs such as *PTEN*. Even more, it has been demonstrated that double heterozygosity for functionally related proteins (for example *PTEN* and *PIK3CA*) could have an additive effect on tumor development and progression (59,60).

Suehiro et al. (61) evaluated 51 EECs by CGH. The average number of genetic alterations (copy number gains and losses) was significantly greater in non-surviving patients than in disease-free patients. In multivariate analysis, there was a statistically significant association between 1 or more copy number losses at 9q32-q34, 11q23, or Xq12-q24 and death from the disease. Loss of 11q23 was also correlated with cervical involvement. A different study showed frequent LOH at 11q13-q14, with a positive correlation with some clinicopathologic features, such as stage and grade (44).

Loss of heterozygosity in the region of *RBI* gene at 13q has been detected in 18% of endometrial carcinomas, without any significant correlation with patient's age, stage, histological grade, or myometrial invasion. The presence of LOH at this locus in early-stage tumors suggests that it takes place before the clonal expansion of the neoplasm (62).

A strong correlation between LOH at 14q and death from disease was obtained in an allelotyping analysis of 70 highly polymorphic microsatellite markers distributed among all nonacrocentric chromosome arms of 21 ECs. Frequent involvement

of 3p, 8p, 9p, 14q, 16q, and 18q was also detected. The region 14q11.2 showed LOH in 19% of ECs in 1 series (47). Loss of heterozygosity at 15q26 was identified in 40% of ECs in 1 study (44).

Loss of heterozygosity at 16q is frequent in ECs. In 1 study, LOH in this chromosome was identified in 40% of patients, but not in any of the 8 cases of endometrial hyperplasia (63). Total loss of 16q was seen in 45%, whereas the remaining 55% of the cases showed partial deletion. Two regions of chromosome 16 were frequently involved: 16q22.1 and 16q22.2-23.1. Loss of heterozygosity at 16q22.1 was associated with poorer prognosis. In fact, the region 16q22.1 contains the *CDH1* gene that codes for E-cadherin. Reduced expression of E-cadherin is frequent in endometrial carcinoma and may be caused by promoter hypermethylation or LOH. Moreno-Bueno et al. (40) identified LOH at 16q22.1 in 57% of NEECs, but only in 22% of EECs. The authors found a trend toward association between LOH at that region and reduced E-cadherin expression. It is worth mentioning that downregulation of E-cadherin in cancer cells plays a significant role in local tumor invasion by instauration of cell properties that are reminiscent of developmental epithelial-mesenchymal transition. E-cadherin inactivation may be accomplished by LOH, promoter hypermethylation, or by repression by some genes such as *SNAIL2*. Interestingly, it has been suggested that mixed müllerian malignant tumors may develop from preexisting ECs by the induction of epithelial-mesenchymal transition features (64). In agreement with such interpretation, mixed müllerian malignant tumors show occasional LOH at 16q, E-cadherin downregulation, and an overexpression of *SNAIL2* (65,66).

Loss of heterozygosity at 17p13.1 represents 1 of the 2 hits of gene inactivation of p53 (67). In a study from Germany, LOH of *BRCA1* (17q21), *p53* (17p13), and *TCRD* (14q11) was assessed in a series of 113 sporadic ECs (68). The reported frequencies of LOH were 18.1%, 26.9%, and 26.3% of informative cases, respectively. Interestingly, LOH at these 3 loci correlated with histological grade and family history. In 1 series (69), LOH at 17p13 did not correlate with p53 nuclear immunostaining and did not correlate with LOH at Rb1. Loss of heterozygosity at 17q21.3 was detected in 37% of ECs in 1 study (44). Allelic losses at this region have been associated with NEECs and also with a subset of endometrial carcinomas with unfavorable prognosis. The association between p53 alterations and NEECs, particularly serous

carcinoma, is strong. P53 abnormalities are seen in 80% to 90% of serous carcinomas (Fig. 6). They are early events because they are also frequent in the precursor lesion called endometrial intraepithelial carcinoma. The study of Kihana et al. (59) is particularly interesting because it evaluates p53 in a series of tumors that is predominantly composed of EECs (89 EECs and 3 NEECs). In this study, LOH at the region of p53 was seen in 35% of EECs. There was a good correlation between LOH and p53 mutation. Both p53 LOH and mutation were more frequent in grade 3 tumors than grades 1 and 2 tumors. Patients with LOH at such a region had a poorer postoperative survival and worst prognosis. It has been suggested that p53 alterations may be an early event in NEEC, but a late alteration in EEC. According to that viewpoint, p53 alterations would occur as a result of tumor progression in EECs and would explain the occasional presence of foci of NEECs in tumors that are predominantly composed of EECs.

Allele losses at 18q.21 are also frequent (14%–33%), and they probably involve partial or interstitial deletions confined to a relatively small region of chromosome 18 that contains the *DCC* gene because LOH for markers distal to *DCC* is rarely seen (47,70).

Some studies have addressed the presence of gains and losses of some chromosomal loci in the transition from endometrial hyperplasia to carcinoma (71,72). For example, Kiechle et al. (71) studied a model of stepwise accumulation of genetic alterations in the carcinogenesis of EECs of the endometrium. According to these authors, progression from simple to complex hyperplasia involved loss of genetic material at 16p and 20q. On the other hand, deletions in 1p seemed to be associated with the presence of atypical cells. In contrast, the gain of chromosome arms 1q and 8q may define the transition from complex atypical hyperplasia to invasive EEC of the endometrium. Muslumanoglu et al. (72) also addressed the sequential genomic copy alterations in the development of endometrial precancers and EECs. Deletions at 1p36-pter and 20q were the most prevalent imbalances detected in both complex hyperplasia and complex atypical hyperplasia, and deletion at 17q22 was only seen in atypical hyperplasia. Losses of heterozygosity at 1p36-pter and 10q were the most frequent aberrations in EECs.

## CONCLUSIONS

We have reviewed the concept and the mechanisms of LOH and the methods that can be used to assess

LOH in tumor samples. Afterward, we have reviewed the significance of some LOH patterns in endometrial carcinoma, with particular emphasis in the LOH profile of nonendometrioid carcinoma, specific LOH patterns that correlate with clinical and pathological features, including the role of LOH at 10q23 (*PTEN*) in endometrioid carcinomas of the endometrium, with some comments on the possible role of *PTEN* haploinsufficiency, and LOH at 17p13 in the region of p53, in NEECs. Analysis of LOH is a very good tool to identify TSGs, which play a role in different steps of the development and progression of endometrial carcinoma, such as myometrial invasion and metastasis.

## REFERENCES

- Weinberg RA. The genetic origins of human cancer. *Cancer* 1988;61:1963–8.
- Stanbridge EJ. The evidence for human tumor suppressor genes. *Princess Takamatsu Symp* 1989;20:3–13.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820–3.
- Cox C, Bignell G, Greenman C, et al. A survey of homozygous deletions in human cancer genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4542–7.
- Beroukhim R, Lin M, Park Y, et al. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol* 2006;2:e41.
- Hamoudi RA, El-Hamidi A, Du MQ. Identification of novel prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia using LDMAS (LOH Data Management and Analysis Software). *BMC Bioinformatics* 2005;6:18.
- Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006; 94:179–83.
- Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, et al. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr Opin Oncol* 2002;14:65–72.
- Couture J, Mitri A, Lagace R, et al. A germline mutation at the extreme 3' end of the APC gene results in a severe desmoid phenotype and is associated with overexpression of beta-catenin in the desmoid tumor. *Clin Genet* 2000;57:205–12.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589–600.
- Raptis S, Bapat B. Genetic instability in human tumors. *EXS* 2006;303–20.
- Wang YP, Zhu M, Sun MH, et al. Large deletion in mismatch repair genes uncovered by quantitative multiplex PCR-high performance liquid chromatography system. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003;20:517–21.
- Zhang J, Lindroos A, Ollila S, et al. Gene conversion is a frequent mechanism of inactivation of the wild-type allele in cancers from MLH1/MSH2 deletion carriers. *Cancer Res* 2006; 66:659–64.
- Gisselsson D. Mitotic instability in cancer: is there method in the madness? *Cell Cycle* 2005;4:1007–10.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007;7:233–45.

16. Struski S, Helias C, Gervais C, et al. 13q deletions in B-cell lymphoproliferative disorders: frequent association with translocation. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;174:151–60.
17. Gruis NA, Abeln EC, Bardoel AF, et al. PCR-based microsatellite polymorphisms in the detection of loss of heterozygosity in fresh and archival tumour tissue. *Br J Cancer* 1993;68:308–13.
18. Lasota J, Wozniak A, Kopczyński J, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 22q in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a study on 50 cases. *Lab Invest* 2005;85:237–47.
19. Zheng HT, Peng ZH, Li S, et al. Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:6740–4.
20. Hahn M, Matzen SE, Serth J, et al. Semiautomated quantitative detection of loss of heterozygosity in the tumor suppressor gene p53. *Biotechniques* 1995;18:1040–7.
21. Nestor AL, Hoppeter SL, Matsui SI, et al. A model for genetic complementation controlling the chromosomal abnormalities and loss of heterozygosity formation in cancer. *Cytogenet Genome Res* 2007;116:235–47.
22. Amare PS, Baisane C, Saikia T, et al. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;131:125–34.
23. Angelini G, Fossati G, Radice P, et al. Loss of polymorphic restriction fragments of class I and class II MHC genes in a malignant melanoma. *J Immunogenet* 1986;13:241–6.
24. Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, et al. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probes* 2001;15:243–7.
25. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations in early pulmonary adenocarcinomas. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007;13:87–92.
26. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 2004;23:413–9.
27. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaij R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
28. NCI and NCBI's SKY/M-FISH and CGH Database, 2001.
29. Baudis M. Progenetix Cytogenetic [database online]. 2000–2006.
30. Baudis M. Online database and bioinformatics toolbox to support data mining in cancer cytogenetics. *Biotechniques* 2006;40:269–70, 272.
31. Baudis M, Cleary ML. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 2001;17:1228–9.
32. Lieberfarb ME, Lin M, Lechpammer M, et al. Genome-wide loss of heterozygosity analysis from laser capture microdissected prostate cancer using single nucleotide polymorphic allele (SNP) arrays and a novel bioinformatics platform dChipSNP. *Cancer Res* 2003;63:4781–5.
33. Matias-Guiu X, Catusas L, Bussaglia E, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:569–77.
34. Irving JA, Catusas L, Gallardo A, et al. Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis. *Hum Pathol* 2005;36:605–19.
35. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, et al. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 2000;88:814–24.
36. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002;21:7981–90.
37. Tritz D, Pieretti M, Turner S, et al. Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol* 1997;28:607–12.
38. Pere H, Tapper J, Wahlstrom T, et al. Distinct chromosomal imbalances in uterine serous and endometrioid carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:892–5.
39. Micci F, Teixeira MR, Haugom L, et al. Genomic aberrations in carcinomas of the uterine corpus. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:229–46.
40. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrio D, et al. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003;199:471–8.
41. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, Cassia R, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697–702.
42. Arlt MF, Herzog TJ, Mutch DG, et al. Frequent deletion of chromosome 1p sequences in an aggressive histologic subtype of endometrial cancer. *Hum Mol Genet* 1996;5:1017–21.
43. Arlt MF, Li M, Herzog TJ, et al. A 1-Mb bacterial clone contig spanning the endometrial cancer deletion region at 1p32-p33. *Genomics* 1999;57:62–9.
44. Sirchia SM, Sironi E, Grati FR, et al. Losses of heterozygosity in endometrial adenocarcinomas: positive correlations with histopathological parameters. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:156–62.
45. Hadaczek P, Gronwald J, Chosia M, et al. Fhit protein expression in endometrial cancers: no correlation with histological grade. *Pol J Pathol* 2001;52:199–203.
46. Ozaki K, Enomoto T, Yoshino K, et al. Fhit alterations in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Int J Cancer* 2000;85:306–12.
47. Fujino T, Risinger JI, Collins NK, et al. Allelotyping of endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4294–8.
48. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, et al. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 1995;55:1922–6.
49. Arvanitis DA, Angelakis E, Koumantakis EE, et al. Allelic imbalance in hMLH1 or BRCA2 loci associated with response of cervical and endometrial cancer to radiotherapy. *Int J Mol Med* 2002;10:55–63.
50. Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998;17:2413–7.
51. Levan K, Partheen K, Osterberg L, et al. Chromosomal alterations in 98 endometrioid adenocarcinomas analyzed with comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2006;115:16–22.
52. Senczuk A, Boltze C, Marzec B, et al. p16INK4A alterations are accompanied by aberrant protein immunostaining in endometrial carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:589–96.
53. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004;444:213–23.
54. Balduin P, Cossu A, Manca A, et al. Identification of a novel candidate gene, CASC2, in a region of common allelic loss at chromosome 10q26 in human endometrial cancer. *Hum Mutat* 2004;23:318–26.
55. Bussaglia E, del Rio E, Matias-Guiu X, et al. PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum Pathol* 2000;31:312–7.

56. Downes CP, Bennett D, McConnachie G, et al. Antagonism of PI 3-kinase-dependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN. *Biochem Soc Trans* 2001;29:846–51.
57. Lagarda H, Catusas L, Arguelles R, et al. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193–9.
58. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol* 2006;37:1465–72.
59. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, et al. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11563–8.
60. Santarosa M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654:105–22.
61. Suehiro Y, Umayahara K, Ogata H, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with endometrioid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:75–82.
62. Semczuk A, Marzec B, Roessner A, et al. Loss of heterozygosity of the retinoblastoma gene is correlated with the altered pRb expression in human endometrial cancer. *Virchows Arch* 2002;441:577–83.
63. Kihana T, Yano N, Murao S, et al. Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1184–90.
64. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 2005;65:5996–6000; discussion 5991–6000.
65. Guarino M, Giordano F, Pallotti F, et al. Malignant mixed mullerian tumor of the uterus. Features favoring its origin from a common cell clone and an epithelial-to-mesenchymal transformation mechanism of histogenesis. *Tumori* 1998;84:391–7.
66. Robinson-Bennett B, Belch RZ, Han AC. Loss of p16 in recurrent malignant mixed mullerian tumors of the uterus. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1354–7.
67. Kihana T, Hamada K, Inoue Y, et al. Mutation and allelic loss of the p53 gene in endometrial carcinoma. Incidence and outcome in 92 surgical patients. *Cancer* 1995;76:72–8.
68. Niederacher D, An HX, Camrath S, et al. Loss of heterozygosity of BRCA1, TP53 and TCRD markers analysed in sporadic endometrial cancer. *Eur J Cancer* 1998;34:1770–6.
69. Semczuk A, Marzec B, Skomra D, et al. Allelic loss at TP53 is not related to p53 protein overexpression in primary human endometrial carcinomas. *Oncology* 2005;69:317–25.
70. Gima T, Kato H, Honda T, et al. DCC gene alteration in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1994;57:480–5.
71. Kiechle M, Hinrichs M, Jacobsen A, et al. Genetic imbalances in precursor lesions of endometrial cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 2000;156:1827–33.
72. Muslumanoglu HM, Oner U, Ozalp S, et al. Genetic imbalances in endometrial hyperplasia and endometrioid carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;120:107–14.
73. Lin WM, Forgas E, Warshal DP, et al. Loss of heterozygosity and mutational analysis of the *PTEN/MMAC1* gene in synchronous endometrial and ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998;4:2577–83.
74. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Altered *PTEN* expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:924–30.



# ***Bibliografía***

---





1. Bokhman JV: **Two pathogenetic types of endometrial carcinoma.** *Gynecol Oncol* 1983, **15**(1):10-17.
2. Liu FS: **Molecular carcinogenesis of endometrial cancer.** *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007, **46**(1):26-32.
3. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Dolcet X, Matias-Guiu X: **Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints.** *J Clin Pathol* 2009, **62**(9):777-785.
4. Zalewski K, Doniec J, Baranowski W, Bidzinski M: **[Revised FIGO staging systems for gynecologic malignancies--2009 update].** *Ginekolog Pol* 2010, **81**(10):778-782.
5. Berchuck A, Iversen ES, Luo J, Clarke JP, Horne H, Levine DA, Boyd J, Alonso MA, Secord AA, Bernardini MQ *et al*: **Microarray analysis of early stage serous ovarian cancers shows profiles predictive of favorable outcome.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(7):2448-2455.
6. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, Okai T: **Genetics of endometrial cancers.** *Obstet Gynecol Int* 2010, **2010**:984013.
7. Sasano H, Watanabe K, Ito K, Sato S, Yajima A: **New concepts in the diagnosis and prognosis of endometrial carcinoma.** *Pathol Annu* 1994, **29 ( Pt 2)**:31-49.
8. Turbiner J, Moreno-Bueno G, Dahiya S, Sanchez-Estevez C, Hardisson D, Prat J, Oliva E, Palacios J: **Clinicopathological and molecular analysis of endometrial carcinoma associated with tamoxifen.** *Mod Pathol* 2008, **21**(8):925-936.
9. Bishop JM: **Oncogenes and proto-oncogenes.** *Hosp Pract (Off Ed)* 1983, **18**(8):67-74.
10. Rous P: **A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells.** *J Exp Med* 1911, **13**(4):397-411.
11. Barbacid M: **ras genes.** *Annu Rev Biochem* 1987, **56**:779-827.
12. Evans HJ: **Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture.** *Br J Cancer* 1993, **68**(6):1051-1060.
13. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA: **erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells.** *Science* 1987, **237**(4811):178-182.
14. Limoli CL, Kaplan MI, Corcoran J, Meyers M, Boothman DA, Morgan WF: **Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability.** *Cancer Res* 1997, **57**(24):5557-5563.
15. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W *et al*: **Global variation in copy number in the human genome.** *Nature* 2006, **444**(7118):444-454.
16. Korbel JO, Urban AE, Grubert F, Du J, Royce TE, Starr P, Zhong G, Emanuel BS, Weissman SM, Snyder M *et al*: **Systematic prediction and validation of breakpoints associated with copy-number variants in the human genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(24):10110-10115.
17. Barandier C, Ming XF, Yang Z: **Small G proteins as novel therapeutic targets in cardiovascular medicine.** *News Physiol Sci* 2003, **18**:18-22.
18. Boguski MS, McCormick F: **Proteins regulating Ras and its relatives.** *Nature* 1993, **366**(6456):643-654.
19. McCormick F: **ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator.** *Cell* 1989, **56**(1):5-8.
20. Ma J, Karplus M: **Ligand-induced conformational changes in ras p21: a normal mode and energy minimization analysis.** *J Mol Biol* 1997, **274**(1):114-131.
21. Malumbres M, Pellicer A: **RAS pathways to cell cycle control and cell transformation.** *Front Biosci* 1998, **3**:d887-912.

22. Harvey JJ: **An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice.** *Nature* 1964, **204**:1104-1105.
23. Kirsten WH, Mayer LA: **Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus.** *J Natl Cancer Inst* 1967, **39**(2):311-335.
24. Ellis RW, Defeo D, Shih TY, Gonda MA, Young HA, Tsuchida N, Lowy DR, Scolnick EM: **The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes.** *Nature* 1981, **292**(5823):506-511.
25. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M: **T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes.** *Nature* 1982, **298**(5872):343-347.
26. Lowy DR, Willumsen BM: **Function and regulation of ras.** *Annu Rev Biochem* 1993, **62**:851-891.
27. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, Digilio C, Palleschi A, Pizzuti A, Grammatico P *et al*: **Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**(1):129-135.
28. Kranenburg O: **The KRAS oncogene: past, present, and future.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1756**(2):81-82.
29. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B: **Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers.** *Nature* 1987, **327**(6120):293-297.
30. Downward J: **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(1):11-22.
31. Schubert S, Shannon K, Bollag G: **Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(4):295-308.
32. Grimmond SM, Raghavan D, Russell PJ: **Detection of a rare point mutation in Ki-ras of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing.** *Urol Res* 1992, **20**(2):121-126.
33. Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, Korinthenberg R, Kreiss-Nachtsheim M, Meinecke P, Morlot S *et al*: **Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations.** *J Med Genet* 2007, **44**(2):131-135.
34. Engelsens IB, Akslen LA, Salvesen HB: **Biologic markers in endometrial cancer treatment.** *APMIS* 2009, **117**(10):693-707.
35. Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J: **K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability.** *J Pathol* 2001, **193**(2):193-199.
36. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kohler MF, Berchuck A *et al*: **Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma.** *Cancer Res* 1993, **53**(8):1906-1910.
37. Koul A, Willen R, Bendahl PO, Nilbert M, Borg A: **Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis.** *Cancer* 2002, **94**(9):2369-2379.
38. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J: **The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer.** *Eur J Cancer* 1997, **33**(10):1572-1577.
39. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A: **alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to**

- phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity.** *J Biol Chem* 2001, **276**(17):13541-13546.
40. Vieira OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S: **Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation.** *J Cell Biol* 2001, **155**(1):19-25.
41. Leslie NR, Downes CP: **PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling.** *Cell Signal* 2002, **14**(4):285-295.
42. Vazquez F, Sellers WR: **The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1470**(1):M21-35.
43. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H *et al*: **DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies.** *Am J Pathol* 1998, **152**(5):1107-1123.
44. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY: **PIK3CA as an oncogene in cervical cancer.** *Oncogene* 2000, **19**(23):2739-2744.
45. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ *et al*: **High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.** *Science* 2004, **304**(5670):554.
46. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, Ohta M, Jazag A, Guleng B, Tateishi K *et al*: **Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(11):4562-4567.
47. Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S *et al*: **Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(5):R609-616.
48. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA: **Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**(21):7678-7681.
49. Li VS, Wong CW, Chan TL, Chan AS, Zhao W, Chu KM, So S, Chen X, Yuen ST, Leung SY: **Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma.** *BMC Cancer* 2005, **5**:29.
50. 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.
51. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R, Terakawa N: **Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(4):892-895.
52. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R *et al*: **PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.** *Science* 1997, **275**(5308):1943-1947.
53. Maehama T, Dixon JE: **PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase.** *Trends Cell Biol* 1999, **9**(4):125-128.
54. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J: **PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic**

- parameters. *Mod Pathol* 2008, **21**(2):131-139.
55. Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM, Raeder MB, Sos ML, Engelsen IB, Trovik J *et al*: **Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(12):4834-4839.
  56. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, Bell DW: **A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(6):1331-1340.
  57. 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.
  58. Schulz AL, Albrecht B, Arici C, van der Burgt I, Buske A, Gillissen-Kaesbach G, Heller R, Horn D, Hubner CA, Korenke GC *et al*: **Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome.** *Clin Genet* 2008, **73**(1):62-70.
  59. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: **Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status.** *Nature* 2002, **418**(6901):934.
  60. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W *et al*: **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** *Nature* 2002, **417**(6892):949-954.
  61. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S: **Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(9):4393-4397.
  62. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I: **BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(17):6133-6138.
  63. Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonald N, Smeds J, Jacobs IJ, Hemminki K, Das S, Akslen LA: **Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer.** *Int J Cancer* 2005, **115**(6):930-934.
  64. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, Palacios J, Hardisson D, Shiozawa T: **Low frequency of BRAF mutations in endometrial and in cervical carcinomas.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(12):3865; author reply 3865-3866.
  65. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T: **The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity.** *Science* 1986, **232**(4758):1644-1646.
  66. Popescu NC, King CR, Kraus MH: **Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32.** *Genomics* 1989, **4**(3):362-366.
  67. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, Stevens C, O'Meara S, Smith R, Parker A *et al*: **Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours.** *Nature* 2004, **431**(7008):525-526.
  68. Uharcek P: **Prognostic factors in endometrial carcinoma.** *J Obstet Gynaecol Res* 2008, **34**(5):776-783.
  69. Grushko TA, Filiaci VL, Mundt AJ, Ridderstrale K, Olopade OI, Fleming GF, Gynecologic Oncology G: **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.**
70. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P: **Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.** *Science* 1996, **272**(5264):1023-1026.
71. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH: **PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma.** *Cancer Res* 1998, **58**(15):3254-3258.
72. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: **Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.** *Science* 1997, **275**(5307):1787-1790.
73. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P: **Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene.** *Cancer Res* 1997, **57**(20):4624-4630.
74. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF: **Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(19):10330-10334.
75. Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y: **Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations.** *Cancer Res* 1998, **58**(5):1021-1026.
76. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR: **Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors.** *Cancer Res* 1997, **57**(20):4478-4481.
77. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: **Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer.** *Cancer Res* 1998, **58**(6):1130-1134.
78. Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C: **Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations.** *Cancer Res* 1998, **58**(5):896-899.
79. Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP: **Beta-catenin mutations in human prostate cancer.** *Cancer Res* 1998, **58**(12):2520-2523.
80. Palacios J, Gamallo C: **Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas.** *Cancer Res* 1998, **58**(7):1344-1347.
81. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S: **Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium.** *Cancer Res* 1998, **58**(16):3526-3528.
82. Kobayashi K, Sagae S, Nishioka Y, Tokino T, Kudo R: **Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas.** *Jpn J Cancer Res* 1999, **90**(1):55-59.
83. Palacios J, Catusus L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Gamallo C: **Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability.** *Virchows Arch* 2001, **438**(5):464-469.
84. Moreno-Bueno G, Gamallo C, Perez-Gallego L, de Mora JC, Suarez A, Palacios J: **beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial**

- carcinomas.** *Diagn Mol Pathol* 2001, **10**(2):116-122.
85. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matias-Guiu X *et al*: **Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer.** *Oncogene* 2002, **21**(52):7981-7990.
86. Nei H, Saito T, Yamasaki H, Mizumoto H, Ito E, Kudo R: **Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium.** *Mol Carcinog* 1999, **25**(3):207-218.
87. Llobet D, Eritja N, Yeramian A, Pallares J, Sorolla A, Domingo M, Santacana M, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X, Dolcet X: **The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms.** *Eur J Cancer* 2010, **46**(4):836-850.
88. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA: **Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts.** *Trends Biochem Sci* 2004, **29**(5):233-242.
89. Hanada M, Feng J, Hemmings BA: **Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1697**(1-2):3-16.
90. Bayascas JR, Alessi DR: **Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation.** *Mol Cell* 2005, **18**(2):143-145.
91. Ehrhardt C, Ludwig S: **A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway.** *Cell Microbiol* 2009, **11**(6):863-871.
92. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA: **Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.** *J Biol Chem* 1997, **272**(50):31515-31524.
93. Walker TR, Moore SM, Lawson MF, Panettieri RA, Jr., Chilvers ER: **Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation.** *Mol Pharmacol* 1998, **54**(6):1007-1015.
94. Bayascas JR, Wullschleger S, Sakamoto K, Garcia-Martinez JM, Clacher C, Komander D, van Aalten DM, Boini KM, Lang F, Lipina C *et al*: **Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(10):3258-3272.
95. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** *Science* 2005, **307**(5712):1098-1101.
96. Toker A, Newton AC: **Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site.** *J Biol Chem* 2000, **275**(12):8271-8274.
97. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S *et al*: **A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.** *Nature* 2007, **448**(7152):439-444.
98. Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, De Gisi S, Malara N, Savino R, Rocco G, Chiappetta G *et al*: **Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung.** *Cell Cycle* 2008, **7**(5):665-669.
99. Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O *et al*: **The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas.** *Br J Cancer* 2009, **101**(1):145-148.

100. Cohen Y, Shalmon B, Korach J, Barshack I, Fridman E, Rechavi G: **AKT1 pleckstrin homology domain E17K activating mutation in endometrial carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2010, **116**(1):88-91.
101. Dutt A, Salvesen HB, Greulich H, Sellers WR, Beroukhim R, Meyerson M: **Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma.** *Br J Cancer* 2009, **101**(7):1218-1219; author reply 1220-1211.
102. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J: **Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(2):139-149.
103. Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, Williams ED: **Aberrant fibroblast growth factor receptor signaling in bladder and other cancers.** *Differentiation* 2007, **75**(9):831-842.
104. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA: **Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(2):107-137.
105. Luo Y, Ye S, Kan M, McKeehan WL: **Structural specificity in a FGF7-affinity purified heparin octasaccharide required for formation of a complex with FGF7 and FGFR2IIIb.** *J Cell Biochem* 2006, **97**(6):1241-1258.
106. Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J: **Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors.** *EMBO J* 1990, **9**(9):2685-2692.
107. Katoh M: **Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review).** *Int J Oncol* 2008, **33**(2):233-237.
108. Grose R, Dickson C: **Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(2):179-186.
109. Wilkie AO: **Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(2):187-203.
110. Katoh Y, Katoh M: **FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review).** *Int J Mol Med* 2009, **23**(3):307-311.
111. Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H: **Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations.** *Hum Mutat* 1999, **14**(2):115-125.
112. Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S *et al*: **Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis.** *Am J Hum Genet* 2002, **70**(2):472-486.
113. Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Greenman C, Bignell G, Teague J, Butler A, Edkins S, Stevens C *et al*: **Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(17):7591-7595.
114. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, Mohammadi M, Futreal PA, Stratton MR, Trent JM *et al*: **Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes.** *Oncogene* 2007, **26**(50):7158-7162.
115. Jang JH, Shin KH, Park JG: **Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers.** *Cancer Res* 2001, **61**(9):3541-3543.
116. Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J,



- Jeanteur P, Birnbaum D, Theillet C: **BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers.** *Oncogene* 1991, **6**(4):659-663.
117. Stephens P, Edkins S, Davies H, Greenman C, Cox C, Hunter C, Bignell G, Teague J, Smith R, Stevens C *et al*: **A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer.** *Nat Genet* 2005, **37**(6):590-592.
118. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Thorlacius S, Gudjonsson SA, Jonsson GF, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Gudmundsson J, Aben KK *et al*: **Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer.** *Nat Genet* 2008, **40**(6):703-706.
119. Nakatani H, Sakamoto H, Yoshida T, Yokota J, Tahara E, Sugimura T, Terada M: **Isolation of an amplified DNA sequence in stomach cancer.** *Jpn J Cancer Res* 1990, **81**(8):707-710.
120. Gartside MG, Chen H, Ibrahimi OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, Bengston A, Yudit LM, Eliseenkova AV, Ma J *et al*: **Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma.** *Mol Cancer Res* 2009, **7**(1):41-54.
121. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA, Goodfellow PJ, Pollock PM: **Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation.** *Cancer Res* 2008, **68**(17):6902-6907.
122. Byron SA, Pollock PM: **FGFR2 as a molecular target in endometrial cancer.** *Future Oncol* 2009, **5**(1):27-32.
123. 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.
124. Versteeg R: **Aberrant methylation in cancer.** *Am J Hum Genet* 1997, **60**(4):751-754.
125. Jones PA, Laird PW: **Cancer epigenetics comes of age.** *Nat Genet* 1999, **21**(2):163-167.
126. Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF: **Identification of Nore1 as a potential Ras effector.** *J Biol Chem* 1998, **273**(10):5439-5442.
127. Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L, Tommasi S, Pfeifer GP: **Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis.** *Histol Histopathol* 2003, **18**(2):665-677.
128. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F: **Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers.** *Cancer Res* 2005, **65**(9):3497-3508.
129. Donniger H, Vos MD, Clark GJ: **The RASSF1A tumor suppressor.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 18):3163-3172.
130. Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC: **Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development.** *Cancer Res* 2002, **62**(20):5906-5911.
131. Pan ZG, Kashuba VI, Liu XQ, Shao JY, Zhang RH, Jiang JH, Guo C, Zabarovsky E, Ernberg I, Zeng YX: **High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2005, **4**(10):1116-1122.
132. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M: **Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer.** *Cancer* 2006, **108**(2):129-134.

133. Yeo W, Wong N, Wong WL, Lai PB, Zhong S, Johnson PJ: **High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma.** *Liver Int* 2005, **25**(2):266-272.
134. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, Oliveira J, Teixeira MR, Lopes C, Sidransky D: **A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(24):8472-8478.
135. Kang S, Lee JM, Jeon ES, Lee S, Kim H, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM: **RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma.** *Int J Cancer* 2006, **119**(6):1316-1321.
136. Kang S, Kim JW, Kang GH, Lee S, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP: **Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma.** *Int J Cancer* 2006, **118**(9):2168-2171.
137. Pijnenborg JM, Dam-de Veen GC, Kisters N, Delvoux B, van Engeland M, Herman JG, Groothuis PG: **RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutations and recurrent endometrial cancer.** *Ann Oncol* 2007, **18**(3):491-497.
138. Hacoen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA: **sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways.** *Cell* 1998, **92**(2):253-263.
139. Minowada G, Jarvis LA, Chi CL, Neubuser A, Sun X, Hacoen N, Krasnow MA, Martin GR: **Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed.** *Development* 1999, **126**(20):4465-4475.
140. Lo TL, Fong CW, Yusoff P, McKie AB, Chua MS, Leung HY, Guy GR: **Sprouty and cancer: the first terms report.** *Cancer Lett* 2006, **242**(2):141-150.
141. Miyake S, Lupher ML, Jr., Druker B, Band H: **The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(14):7927-7932.
142. Wong ES, Lim J, Low BC, Chen Q, Guy GR: **Evidence for direct interaction between Sprouty and Cbl.** *J Biol Chem* 2001, **276**(8):5866-5875.
143. Ozaki K, Kadomoto R, Asato K, Tanimura S, Itoh N, Kohno M: **ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**(5):1084-1088.
144. Lo TL, Yusoff P, Fong CW, Guo K, McCaw BJ, Phillips WA, Yang H, Wong ES, Leong HF, Zeng Q *et al*: **The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**(17):6127-6136.
145. Fong CW, Chua MS, McKie AB, Ling SH, Mason V, Li R, Yusoff P, Lo TL, Leung HY, So SK *et al*: **Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2006, **66**(4):2048-2058.
146. Sutterluty H, Mayer CE, Setinek U, Attems J, Ovtcharov S, Mikula M, Mikulits W, Micksche M, Berger W: **Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms.** *Mol Cancer Res* 2007, **5**(5):509-520.

147. Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Muller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, Kumar R: **Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines.** *Carcinogenesis* 2005, **26**(7):1224-1232.
148. Lito P, Mets BD, Kleff S, O'Reilly S, Maher VM, McCormick JJ: **Evidence that sprouty 2 is necessary for sarcoma formation by H-Ras oncogene-transformed human fibroblasts.** *J Biol Chem* 2008, **283**(4):2002-2009.
149. Edwin F, Anderson K, Ying C, Patel TB: **Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease.** *Mol Pharmacol* 2009, **76**(4):679-691.
150. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT: **Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(22):8458-8467.
151. Hainaut P, Wiman KG: **30 years and a long way into p53 research.** *Lancet Oncol* 2009, **10**(9):913-919.
152. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC: **p53: 25 years after its discovery.** *Trends Pharmacol Sci* 2004, **25**(4):177-181.
153. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC: **TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer.** *IARC Sci Publ* 2004(157):247-270.
154. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M: **TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes.** *Oncogene* 2007, **26**(15):2157-2165.
155. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: **Surfing the p53 network.** *Nature* 2000, **408**(6810):307-310.
156. Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, Greenblatt MS: **Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features.** *Oncogene* 1999, **18**(1):211-218.
157. Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF: **The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer.** *Hum Mutat* 2003, **21**(3):229-239.
158. Kaku T, Kamura T, Hirakawa T, Sakai K, Amada S, Kobayashi H, Nakano H: **Endometrial carcinoma associated with hyperplasia--immunohistochemical study of angiogenesis and p53 expression.** *Gynecol Oncol* 1999, **72**(1):51-55.
159. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L: **p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis.** *Am J Pathol* 1997, **150**(1):177-185.
160. Okuda T, Otsuka J, Sekizawa A, Saito H, Makino R, Kushima M, Farina A, Kuwano Y, Okai T: **p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer.** *Gynecol Oncol* 2003, **88**(3):318-325.
161. Lee EJ, Kim TJ, Kim DS, Choi CH, Lee JW, Lee JH, Bae DS, Kim BG: **p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review.** *Gynecol Oncol* 2010, **116**(3):533-538.
162. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L: **The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways.** *Cancer* 2000, **88**(4):814-824.
163. Mutter GL: **Pten, a protean tumor suppressor.** *Am J Pathol* 2001, **158**(6):1895-1898.
164. 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.**
165. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C: **Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas.** *Am J Pathol* 2001, **158**(6):2097-2106.
166. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal PA: **Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias.** *Cancer Res* 1998, **58**(12):2500-2503.
167. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(7):489-501.
168. Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK *et al*: **Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway.** *Nature* 2005, **436**(7052):792.
169. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA, Das S: **PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma.** *Int J Cancer* 2001, **91**(1):22-26.
170. Doxsey SJ: **Centrosomes as command centres for cellular control.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(5):E105-108.
171. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL: **Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(4):1978-1983.
172. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: **Genetic instability in colorectal cancers.** *Nature* 1997, **386**(6625):623-627.
173. Loeb KR, Loeb LA: **Significance of multiple mutations in cancer.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):379-385.
174. Friberg LG, Noren H, Delle U: **Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in endometrial cancer stage I and II: a prospective 5-year survival study.** *Gynecol Oncol* 1994, **53**(1):64-69.
175. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: **Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis.** *Nature* 1993, **363**(6429):558-561.
176. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon.** *Science* 1993, **260**(5109):816-819.
177. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: **The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer.** *Cell* 1993, **75**(5):1027-1038.
178. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M *et al*: **Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.** *Cell* 1993, **75**(6):1215-1225.
179. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS: **Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma.** *Am J Pathol* 1996, **148**(5):1671-1678.
180. Catasus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J: **Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases.** *Hum Pathol* 1998, **29**(10):1160-1164.
181. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG: **MLH1 promoter hypermethylation is**

- associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas.** *Oncogene* 1998, **17**(18):2413-2417.
182. Esteller M, Catusas 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.
183. Khorasanizadeh S: **The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation.** *Cell* 2004, **116**(2):259-272.
184. Laird PW: **The power and the promise of DNA methylation markers.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(4):253-266.
185. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C: **Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.** *Nucleic Acids Res* 1982, **10**(8):2709-2721.
186. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes Dev* 2002, **16**(1):6-21.
187. Jaenisch R, Bird A: **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nat Genet* 2003, **33** Suppl:245-254.
188. Li E: **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**(9):662-673.
189. Mancini DN, Singh SM, Archer TK, Rodenhiser DI: **Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors.** *Oncogene* 1999, **18**(28):4108-4119.
190. Klenova EM, Morse HC, 3rd, Ohlsson R, Lobanenkova VV: **The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**(5):399-414.
191. Lewis A, Murrell A: **Genomic imprinting: CTCF protects the boundaries.** *Curr Biol* 2004, **14**(7):R284-286.
192. Voo KS, Carlone DL, Jacobsen BM, Flodin A, Skalnik DG: **Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(6):2108-2121.
193. Feinberg AP, Tycko B: **The history of cancer epigenetics.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(2):143-153.
194. Esteller M: **DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations.** *Curr Opin Oncol* 2005, **17**(1):55-60.
195. Zhou XC, Dowdy SC, Podratz KC, Jiang SW: **Epigenetic considerations for endometrial cancer prevention, diagnosis and treatment.** *Gynecol Oncol* 2007, **107**(1):143-153.
196. Risinger JI, Maxwell GL, Berchuck A, Barrett JC: **Promoter hypermethylation as an epigenetic component in Type I and Type II endometrial cancers.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **983**:208-212.
197. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D: **Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer.** *Oncol Rep* 2006, **16**(6):1189-1196.
198. Ghabreau L, Roux JP, Niveleau A, Fontaniere B, Mahe C, Mokni M, Frappart L: **Correlation between the DNA global methylation status and progesterone receptor expression in normal endometrium, endometrioid adenocarcinoma and precursors.**

- Virchows Arch* 2004, **445**(2):129-134.
199. Whitcomb BP, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Goodfellow PJ: **Frequent HOXA11 and THBS2 promoter methylation, and a methylator phenotype in endometrial adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(6):2277-2287.
200. Dowdy SC, Gostout BS, Shridhar V, Wu X, Smith DI, Podratz KC, Jiang SW: **Biallelic methylation and silencing of paternally expressed gene 3 (PEG3) in gynecologic cancer cell lines.** *Gynecol Oncol* 2005, **99**(1):126-134.
201. Chan QK, Khoo US, Chan KY, Ngan HY, Li SS, Chiu PM, Man LS, Ip PP, Xue WC, Cheung AN: **Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma.** *J Mol Diagn* 2005, **7**(1):8-16.
202. Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C, Fiedler E, Marsch W, Dammann R, Helmbold P: **Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma.** *Histol Histopathol* 2007, **22**(9):1005-1015.
203. van Engeland M, Roemen GM, Brink M, Pachen MM, Weijenberg MP, de Bruine AP, Arends JW, van den Brandt PA, de Goeij AF, Herman JG: **K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer.** *Oncogene* 2002, **21**(23):3792-3795.
204. Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C: **Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma.** *Oncogene* 2003, **22**(24):3806-3812.
205. Kim DH, Kim JS, Park JH, Lee SK, Ji YI, Kwon YM, Shim YM, Han J, Park J: **Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**(19):6206-6211.
206. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, Sidransky D: **Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis.** *Cancer Res* 2004, **64**(5):1664-1668.
207. Jo H, Kim JW, Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP: **Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer.** *Oncol Res* 2006, **16**(4):205-209.
208. Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP: **Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor.** *Oncogene* 2003, **22**(50):8125-8136.
209. Song MS, Lim DS: **Control of APC-Cdc20 by the tumor suppressor RASSF1A.** *Cell Cycle* 2004, **3**(5):574-576.
210. Fajas L, Paul C, Vie A, Estrach S, Medema R, Blanchard JM, Sardet C, Vignais ML: **Cyclin A is a mediator of p120E4F-dependent cell cycle arrest in G1.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(8):2956-2966.
211. Kim HJ, Bar-Sagi D: **Modulation of signalling by Sprouty: a developing story.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(6):441-450.
212. Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A *et al*: **Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(7):4465-4470.
213. Abe M, Naski MC: **Regulation of sprouty expression by PLCgamma and calcium-dependent signals.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **323**(3):1040-1047.
214. Ding W, Bellusci S, Shi W, Warburton D: **Functional analysis of the human Sprouty2 gene**

- promoter.** *Gene* 2003, **322**:175-185.
215. Fujino T, Risinger JI, Collins NK, Liu FS, Nishii H, Takahashi H, Westphal EM, Barrett JC, Sasaki H, Kohler MF *et al*: **Allelotype of endometrial carcinoma.** *Cancer Res* 1994, **54**(16):4294-4298.
216. Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Nappi C, Pannone G: **Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions.** *Eur J Gynaecol Oncol* 2009, **30**(3):267-270.
217. Pallares J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catusus L, Prat J, Matias-Guiu X: **Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma.** *Mod Pathol* 2008, **21**(6):691-699.
218. Arafa M, Kridelka F, Mathias V, Vanbellinghen JF, Renard I, Foidart JM, Boniver J, Delvenne P: **High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma.** *Histopathology* 2008, **53**(5):525-532.
219. McKie AB, Douglas DA, Olijslagers S, Graham J, Omar MM, Heer R, Gnanapragasam VJ, Robson CN, Leung HY: **Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer.** *Oncogene* 2005, **24**(13):2166-2174.
220. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW *et al*: **Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells.** *Cancer Cell* 2005, **7**(6):561-573.
221. Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, Hennessy BT, Tseng H, Pochanard P, Kim SY *et al*: **AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer.** *Cancer Cell* 2009, **16**(1):21-32.
222. Kang S, Bader AG, Vogt PK: **Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(3):802-807.
223. Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL: **PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas.** *Hum Mutat* 2005, **25**(3):322.
224. Mori N, Kyo S, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Ohno S, Maida Y, Hashimoto M, Takakura M, Inoue M: **Concomitant activation of AKT with extracellular-regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis.** *Cancer Sci* 2007, **98**(12):1881-1888.
225. Hayes MP, Douglas W, Ellenson LH: **Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2009, **113**(3):370-373.
226. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J: **Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis.** *Mod Pathol* 2009, **22**(4):522-529.
227. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM: **The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations.** *Science* 2007, **318**(5857):1744-1748.
228. Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, von Deimling A, Haluska FG, Haber DA, Eng C: **A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on**

- chromosome band 9p21.** *Oncogene* 1998, **16**(18):2403-2406.
229. Zysman MA, Chapman WB, Bapat B: **Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene.** *Am J Pathol* 2002, **160**(3):795-800.
230. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH: **Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25.** *Oncogene* 1995, **10**(11):2243-2246.
231. Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK: **Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer.** *Cancer Res* 1995, **55**(21):4800-4803.
232. Nagase S, Sato S, Tezuka F, Wada Y, Yajima A, Horii A: **Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer.** *Br J Cancer* 1996, **74**(12):1979-1983.
233. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ: **Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers.** *Cancer Res* 1995, **55**(9):1922-1926.
234. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC: **PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers.** *Cancer Res* 1997, **57**(21):4736-4738.
235. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Matsumoto K, Kawana K, Taketani Y: **PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(9):2636-2642.
236. Santarosa M, Ashworth A: **Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1654**(2):105-122.
237. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M: **Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(20):11563-11568.
238. Konopka B, Janiec-Jankowska A, Kwiatkowska E, Najmola U, Bidzinski M, Olszewski W, Goluda C: **PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors.** *Hum Pathol* 2011, **42**(11):1710-1719.
239. Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R: **PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers.** *PLoS One* 2011, **6**(7):e22769.
240. Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R: **Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality?** *Nat Rev Clin Oncol* 2010, **7**(7):401-414.
241. Ihle NT, Powis G, Kopetz S: **PI-3-Kinase inhibitors in colorectal cancer.** *Curr Cancer Drug Targets* 2011, **11**(2):190-198.
242. Turner N, Grose R: **Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(2):116-129.
243. Savagner P, Valles AM, Jouanneau J, Yamada KM, Thiery JP: **Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells.** *Mol Biol Cell* 1994, **5**(8):851-862.
244. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A *et al*: **A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal**



- breast cancer. *Nat Genet* 2007, **39**(7):870-874.**
245. 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.
246. Meulmeester E, Ten Dijke P: **The dynamic roles of TGF-beta in cancer.** *J Pathol* 2011, **223**(2):205-218.
247. Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B: **Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination.** *Development* 2004, **131**(15):3627-3636.
248. Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez-Estevez C, Hardisson D, Sarrio D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu X, Palacios J: **Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer.** *Oncogene* 2003, **22**(38):6115-6118.
249. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: **Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.** *Endocr Relat Cancer* 2000, **7**(3):165-197.
250. Devilard E, Bladou F, Ramuz O, Karsenty G, Dales JP, Gravis G, Nguyen C, Bertucci F, Xerri L, Birnbaum D: **FGFR1 and WT1 are markers of human prostate cancer progression.** *BMC Cancer* 2006, **6**:272.
251. Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, Teschendorff AE, Chin SF, Caldas C, Ponder BA: **Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer.** *PLoS Biol* 2008, **6**(5):e108.
252. Mohammadi F, Nosek D, Digenis GA: **Synthetic macromolecular inhibitors of human leukocyte elastase. 2. Effect of loading of a peptidyl carbamate inhibitor and molecular size of polymer backbone on its inhibitory capacity.** *J Enzyme Inhib* 1997, **11**(3):183-198.
253. Kammasud N, Boonyarat C, Tsunoda S, Sakurai H, Saiki I, Grierson DS, Vajragupta O: **Novel inhibitor for fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase.** *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17**(17):4812-4818.
254. Zhou W, Hur W, McDermott U, Dutt A, Xian W, Ficarro SB, Zhang J, Sharma SV, Brugge J, Meyerson M *et al*: **A structure-guided approach to creating covalent FGFR inhibitors.** *Chem Biol* 2010, **17**(3):285-29