

Tesis Doctoral

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico

Clara Cieza Borrella

2013



Departamento de Medicina

Unidad de Medicina Molecular

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

CERTIFICA:

Que el trabajo “Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico” que presenta la Licenciada en Biología Dña. Clara Isabel Cieza Borrella, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y, reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el comité evaluador correspondiente y optar al título de “Doctora en Medicina” con mención de “Doctorado Europeo” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 30 de Julio de 2013.

FDO. Dr. D. Rogelio González Sarmiento

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido financiado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo.

Durante el transcurso de este trabajo, Clara Isabel Cieza Borrella ha sido beneficiaria de un contrato de Formación de Personal Investigador de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Orden EDU/1933/ 2008).

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS



Querría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, dar las gracias a mi director, Rogelio González Sarmiento, por la confianza depositada en mí desde el primer día, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por ser mi maestro durante todos estos años.

GRACIAS también a José Antonio Mirón Canelo por acogerme en su equipo, hacerme sentir una más colaborando día tras día con él y por mostrarme el lado más humano de la ciencia.

A Mercedes Núñez Lozano por todo el trabajo realizado y por hacer más fácil la continuación de este proyecto.

Agradecer a Magdalena Sancho (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca), Verónica Sancho y Ángel García (Servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca), Rebeca Lozano y Arantxa Amores (Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca) y a Juan Luis García y José M^a González (Laboratorio 12 del Centro de Investigación del Cáncer) su ayuda y colaboración. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Dar las gracias a Marta Fernández y Victoria Streinu por creer en este trabajo, por la ilusión mostrada desde el primer día y por su implicación en el mismo.

A Prof. Rosalind Eeles por permitirme realizar mi estancia de investigación en el grupo de Oncogenetics (Institute of Cancer Research, Sutton, UK) y a todo su equipo, liderado por Zsofia Kote-Jarai, por el buen trato recibido y por enseñarme otra forma de hacer ciencia. Malgorzata Tymrakiewicz, thank you for being my teacher, thank you for being my friend.

A todos los compañeros de la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y del laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer con los que he tenido el honor y el gusto de coincidir durante estos 5 años, por hacer del trabajo, un placer; de la ignorancia, un reto; y de la impaciencia, una virtud.

Dar las gracias a Nieves Mateos y Estrella Muñoz por su paciencia, su efectividad y su capacidad para encontrar solución a los problemas cuando parecen no tenerla.

A David Benito y Javier Bolaños por el diseño gráfico y a Hanna Stilwell y Suzanne Lindsay por su ayuda en las traducciones español-inglés.

A Andrés Castellanos y Pilar Armero por su disponibilidad para transmitir todos los conocimientos adquiridos en sus años de experiencia.

Agradecimientos

A todos los pacientes que han participado en este proyecto y a todas aquellas personas que entienden y valoran la importancia del trabajo que se realiza en el laboratorio. A todos los "clínicos" con los que he tenido la oportunidad de colaborar en estos años aprendiendo cosas nuevas cada día.

Dar las gracias a mis amigos, esos con los que siempre puedes contar independientemente de los kilómetros que nos separen o del tiempo que llevemos sin vernos. Gracias por haber estado ahí en los buenos y en los malos ratos, por las sonrisas y las lágrimas compartidas.

Y por último, a mis padres y hermano por vuestro apoyo, vuestros consejos, por estar ahí siempre que os necesito, porque todo lo que diga nunca podrá expresar todo lo que siento.

A TODOS, GRACIAS.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

- C. Cieza-Borrella, M. Fernández-Prieto, M. Núñez-Casado, V. Streinu, M. Sancho-de-Salas, V. Sancho-de-Salas, Á. García-Iglesias, R. González-Sarmiento: **“The importance of the P53, P16, CDH1 and PPP2R1A genes analysis in grade III endometrioid carcinoma”**. Comunicación-póster presentada en el European Society of Human Genetics (ESHG) 2013. París, 8-11 de Junio de 2013.

- M. Fernández-Prieto, C. Cieza-Borrella, M. Núñez-Casado, M. Sancho-de-Salas, V. Sancho-de-Salas, Á. García-Iglesias, R. González-Sarmiento: **“Mutation of the ARID1A gene in Endometrial Carcinoma in Spanish patients”**. Comunicación-póster presentada en el European Society of Human Genetics (ESHG) 2013. París, 8-11 de Junio de 2013.

- Clara Cieza Borrella, Marta Fernández Prieto, Rebeca Lozano Mejorada, M^a Arantxa Amores Martín, Magdalena Sancho de Salas, Verónica Sancho de Salas, Juan Jesús Cruz Hernández, Rogelio González Sarmiento: **“Estudio del gen ARID1A como pieza clave en la tumorigénesis del carcinoma de endometrio esporádico”** Presentación de comunicación póster en el V Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 23 y 24 de Mayo de 2013.

- V. Streinu, C. Cieza-Borrella, M. Nuñez-Lozano, M. Sancho-de-Salas, R. Lozano-Mejorada, A. Garcia-Iglesias, J.J. Cruz-Hernandez, R. Gonzalez-Sarmiento: **“Mutation of the PPP2R1A gene as part of the sporadic endometrial serous carcinoma genetic profile”**. Comunicación-póster presentada en el European Society of Human Genetics (ESHG) 2012. Nüremberg, 23-26 de Junio de 2012.

- Clara Cieza Borrella, Victoria Streinu, Magdalena Sancho de Salas, Ángel García Iglesias, Juan Jesús Cruz Hernández, Rogelio González Sarmiento: **“PPP2R1A: una posible nueva diana para el tratamiento del carcinoma de endometrio esporádico”**. Presentación de comunicación póster en el IV Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 24 y 25 de Mayo de 2012. **Otorgado con el primer premio a la mejor comunicación póster.**

- Clara Cieza Borrella, Victoria Streinu, Magdalena Sancho de Salas, Mercedes Núñez Casado, Ángel García Iglesias, Juan Jesús Cruz Hernández, Rogelio González Sarmiento: **“Nuevos mecanismos patogénicos del carcinoma endometrioide grado 3: implicación de los genes P53, P16, CDH1 y PPP2R1A”**. Presentación de comunicación póster en el IV Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 24 y 25 de Mayo de 2012.

- Arántzazu Amores Martín, Clara Cieza Borrella, José M^a González Valero, Mercedes Núñez Lozano, Magdalena Sancho de Salas, Juan L. García Hernández, Ángel García Iglesias, César A. Rodríguez Sánchez, Rogelio González Sarmiento, Juan J. Cruz Hernández: **“Asociación entre mutaciones somáticas en el gen PTEN e hipermetilación de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6 en carcinoma de endometrio.”** Presentación de comunicación oral en el XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Málaga, 19-21 de Octubre de 2011.

- Cieza-Borrella, C.; Núñez-Lozano, M.; Sancho-de-Salas, M.; González-Valero, JM.; García-Hernández, JL.; García-Iglesias, A.; Amores-Martín, MA.; González-Sarmiento, R.: **“Association between somatic mutations in PTEN gene and hypermethylation of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 genes in endometrial carcinoma.”** Presentación de comunicación-póster en el XIII Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA). Salamanca, 21-23 de Septiembre de 2011.

- JM González Valero, C Cieza Borrella, M Núñez Lozano, M Sancho de Salas, JL García Hernández, A García Iglesias, MA Amores Martín, R González Sarmiento: **“Asociación entre mutaciones somáticas en el gen PTEN e hipermetilación de los promotores de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6 en carcinoma de endometrio”**. Presentación de comunicación póster en el III Simposium Bases Biológicas del Cáncer y Terapias Personalizadas. Universidad de Salamanca-Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Salamanca, 26 y 27 de Mayo de 2011.

SUMMARY



Endometrial carcinoma is the most frequent gynaecological tumour in developed countries. The origin is sporadic in 95% of them and its main risk factor is hormone exposure.

It has been proposed several classifications depending on the followed criteria to characterize sporadic endometrial carcinomas. Bearing in mind clinical-pathological characteristics, Bokhman et al., in 1983, proposed a dualistic model in which endometrial carcinomas were classified in two groups: type 1 or endometrioid carcinomas (with a good prognosis and estrogens-dependent) and type 2 or non-endometrioid carcinomas (with a poor prognosis and non-estrogens-dependent). Later, Vogelstein in 1988, developed a theory for colorectal cancer, embraced and adapted for endometrial carcinoma, which said that tumours are a consequence of an accumulation of genetic and epigenetic alterations. According to this fact, it has been observed that type 1 and type 2 endometrial carcinomas have specific molecular profiles. Type 1 carcinomas are mainly associated with MSI and mutations in *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, *CTNNB1*, *FGFR2* and MMR genes and type 2 carcinomas are associated with mutations in *TP53*, *CDKN2A*, and *CDH1* genes, loss of expression of HER2/ERBB2 and EGFR/ERBB1 proteins and loss of heterozygosity (LOH) in different chromosomes.

Currently, whole exome sequencing studies are being carried out in order to look for new target genes in different types of tumours. Two of them are *ARID1A* and *PPP2R1A* genes that are highly mutated in endometrioid and non-endometrioid carcinomas respectively. On the other hand, telomere length variations have been associated with a susceptibility of developing different kind of tumours. However, it has not been yet clarified if the telomere shortening is a cause or a consequence of tumour development and the exact role of telomerase.

Moreover, new criteria are being established with the aim of elaborate a more accurate classification that would help to better identify, characterize and treat the different types of endometrial carcinomas.

The aim of the present work has been the analysis of 14 genes implicated in tumorigenesis (including *PPP2R1A* and *ARID1A* genes); MSI; LOH; as well as the methylation of the MMR genes promoter and HDACs expression; the telomere length and *TERT-1327C>T* and *TERC-63G>A* polymorphisms analysis in a cohort of 86 sporadic endometrial carcinomas and 23 blood samples.

We have used a wide variety of techniques for the realization of our study. We have extracted DNA from tumour and blood samples, and RNA and total proteins from tumour samples. The analysis of different genes has been carried out by PCR, CSGE-Heteroduplex and Sanger sequencing using several databases in order to check if the mutations found had been previously described. For the characterization of the new mutations, we have performed RT-PCR and Western blot assays (as well as for HDAC protein expression analysis). Several prediction programs have helped us to determine the mutations pathogenicity. We also have studied LOH by qPCR and RFLP; gross alterations in MMR genes by MLPA; MMR promoter methylation by MS-MLPA; and telomere length and telomerase polymorphisms by real time

PCR. Statistical analysis has been carried out with SPSS v18.0, GenEx 5.3.6 Enterprise, and MULTBiplot programs.

We have found 213 mutations: 99 described mutations and other 114 non-previously described mutations that have been characterized in our work. The most mutated genes have been *PTEN* and *ARID1A*.

MSI has been carried out when we have obtained DNA from both tumour and blood samples of the same patient observing that it is a frequent event in our patients. In contrast with Lynch syndrome, D17S250 was the most altered marked in our population. On the other hand, we have observed that the gross alterations and the punctual mutations don't explain the MSI and loss of expression of MMR genes.

The most methylated gene has been *hMLH1*, but methylation of MMR genes has not been consistent with either the lack of MMR proteins expression and MSI.

The HDAC2 protein has been the histone deacetylase which expression has been absent in a highest number of studied tumours. Both methylation and HDAC2 protein expression patterns have differed depending on the type of tumour.

The telomere length has not shown any relation with neither type nor grade of tumour and C and G alleles of *TERT-1327C>T* and *TERC-63G>A* polymorphisms were only slightly related to mixed and grade 3 endometrioid carcinomas respectively (the groups with shortest telomeres).

In our work, *PPP2R1A* gene has shown mutations mainly associated with serous carcinomas. We have described a new probably pathogenic mutation in the exon 2 of the gene, presented in a grade 1 endometrioid carcinoma, and a pole of polymorphisms situated in the promoter region implicated in the binding of several transcription factors. When we have analyzed *PPP2R1A* protein expression, we have observed a new pattern of protein expression at 110 kDa, maybe related to posttranslational modifications.

On the other hand, we have observed that *ARID1A* gene appears commonly mutated in endometrioid and non-endometrioid carcinomas with a high number of nonsense and frameshift mutations. We have described 32 new mutations including an inframe alteration that causes a change in the mRNA splicing.

According to our results, the most adequate classification among those that have been proposed until now, is the classification that bears in mind the characteristics of the different histological subtypes. The clinical-pathological criteria are not accurate and they share a high identity with the classification by histological grades.

We have observed that grade 1 and grade 2 endometrioid carcinomas could be grouped in a low-grade endometrioid cluster showing very similar molecular characteristics. At the same time the molecular profile of low-grade endometrioid carcinomas differs from grade 3 endometrioid

carcinomas genetic profile. Grade 3 endometrioid carcinomas share characteristics with low-grade endometrioid and serous carcinomas and because of that, it is not possible to group them with any other histological subtype. Moreover, mixed carcinomas and carcinosarcomas show a molecular profile that depends on the type of their components suggesting the importance of making histological studies of this kind of tumours before their molecular analysis.

ABREVIATURAS



ABD: *ATP-binding domain.*

ADP: *Adenosine diphosphate.*

AFX: *Factor Forkhead.*

AKT/PKB: *Protein Kinase B.*

AMPS: *Ammonium persulfate.*

APC: *Adenomatous Polypous Coli.*

API: *Aprotinina, epstatina, leupeptina.*

AR: *Amphiregulin.*

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

ATP: *Adenosin triphosphate.*

AXIN1/2: *Axis inhibition protein 1/2.*

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

BCL: *Familia de proteínas B-cell lymphoma.*

BIM: *Bcl-2 interacting mediator of cell death.*

BLU: *Proteína codificada por el gen Zinc Finger, MYND-Type Containing 10.*

BRAF: *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1.*

BRCA1: *Breast cancer 1, early onset.*

BRG-1: *Brahma homolog 1.*

BRM: *Bragma.*

BSA: *Bovine Serum Albumin.*

BTC: *Betacellulin.*

Ca²⁺: *Ión Calcio.*

CDH1: *E-cadherina 1.*

CDH2: *N-cadherina 2.*

CDK: *Cyclin-dependent kinase.*

Abreviaturas

- CDKN1A/2A:** *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A/2A.*
- cDNA:** *Complementary DNA.*
- CHD4:** *Chromodomain helicase DNA binding protein 4.*
- CIAA:** Cloroformo:alcohol isoamílico.
- CIMP:** *CpG island methylator phenotype.*
- CK2:** *Casein kinase 2.*
- CO₂:** Dióxido de carbono.
- CREBBP:** *CREB binding protein.*
- CSGE:** *Conformation sensitive gel electrophoresis.*
- CSNK1A1:** *Casein kinase 1, Alpha 1.*
- Ct:** Ciclo umbral en la PCR a tiempo real.
- CTNNB1:** *Cadherin-associated protein beta 1.*
- c-MYC:** *V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog.*
- C-terminal:** Extremo carboxilo terminal.
- ddH₂O:** Agua bidestilada.
- DEPC:** Dietilpirocarbonato.
- DKC1:** *Dyskerin 1.*
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium.*
- DMSO:** *Dimethyl sulfoxide.*
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid.*
- DNMT:** *DNA methyltransferase.*
- dNTP:** *Deoxynucleotide Triphosphates.*
- DO:** Densidad óptica.
- DSB:** *Double Strand Break.*
- Dsh:** *Proteínas Dishevelled.*
- EC1-EC5:** *Extracellular cadherin repeat domains 1-5.*

Abreviaturas

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid.*

EGF: *Epidermal growth factor.*

EGFR/ERBB1: *Epidermal growth factor receptor.*

EPCAM: *Epithelial cell adhesion molecule.*

EP300: *E1A binding protein P300.*

ER: *Estrogen receptor.*

ERK1/2: *Extracellular-signal-regulated kinase 1.*

ESE: *Exon Splicing Enhancers.*

EXO/HEXI: *Exonuclease I.*

FAS-1: *Fatty Acid Synthetase.*

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

FEN1: *Flap Structure-Specific Endonuclease 1.*

FGFR2: *Fibroblast growth factor receptor 2.*

FIGO: *Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.*

FKHR: *Forkhead in human rhabdomyosarcoma.*

FKHRL1: *Forkhead transcription factor like 1 / FoxO3a.*

Fz: *Receptores Frizzled.*

GAP: *GTPase activating proteins.*

GATA: *Globin transcription factor.*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.*

GDP: *Guanosine diphosphate.*

GNEF: *Guanine nucleotide exchange factor.*

GRB2: *Growth factor receptor-bound protein 2.*

GSK-3 β : *Glycogen synthase kinase-3 beta.*

GTP: *Guanosine triphosphate.*

HAT: *Histone acetylase.*

Abreviaturas

HB-EGF: *Heparine-binding EGF-like growth factor.*

hDAB2IP: *Disabled homolog 2-interacting protein.*

HDAC: *Histone deacetylase.*

HEAT: *Huntington-Elongation-A subunit-TOR.*

HER2/neu/ERBB2: *V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2/Neuro.*

HMG(Y): *High mobility group I proteins.*

HNPCC: *Hereditary non-polyposis colorectal cancer.*

hMLH1: *MutL homolog 1 of human.*

hMLH3: *MutL homolog 3 of human.*

hMSH2: *MutS homolog 2 of human.*

hMSH3: *MutS homolog 3 of human.*

hMSH6: *MutS homolog 6 of human.*

hPMS1/2: *Posmeiotic segregation increased 1/2 of human.*

H-RAS: *V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog/p21.*

HRP: *Horseradish Peroxidase.*

IDL: *Inserción/delección.*

IGFBP1: *Insulin-like growth factor binding protein 1.*

IGFBP3: *Insulin-like growth factor binding protein 3.*

IGFR1: *Insulin-like growth factor 1 receptor 1.*

IKZF1/LYF-1: *IKAROS Family Zinc Finger 1 (Ikaros).*

INK4A: *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2 /p16.*

INO80: *Inositol requiring 80.*

IPTG: *Isopropil- β -D-tiogalactósido.*

ISWI: *Imitation SWI.*

K-RAS (4A/4B): *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (isoform 4A/4B).*

LOH: *Loss of heterozygosis.*

LRP: *Lipoprotein Receptor-related Protein.*

MAPK: *Mitogen-activated Protein kinase.*

MAPKKK: *MAP kinase kinase kinase.*

MBD3: *Methyl-CpG binding domain protein 3.*

MDE: *Mutation detection enhancement.*

MDM2: *P53 E3 Ubiquitin Protein Ligase Homolog.*

MEK1/2: *MAPK/ERK kinase 1/2.*

MGMT: *O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase.*

miRNA: *microRNA.*

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.*

MMR: *DNA mismatch repair.*

mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid.*

MS-MLPA: *Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.*

MSI: *Microsatellite Instability.*

MSI-H: *Microsatellite Instability-high.*

MSI-L: *Microsatellite Instability-low.*

MSS: *Microsatellite Stability.*

mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin.*

mTORC1: *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1.*

MTS2: *Multiple Tumor Suppressor 2.*

MutS, MutL y MutH: *Mutator S, L, H.*

MutS α : *Mutator S α complex (heterodimer) (MSH2-MSH6).*

MutS β : *Mutator S β complex (MSH2-MSH3).*

MutL α : *Mutator L α complex (MLH1-PMS2).*

MutL β : *Mutator L β complex (MLH1-PMS1).*

MutL γ : *Mutator L γ complex (MLH1-MLH3).*

MZF1: *Myeloid Zinc Finger 1.*

NAD⁺: *Nicotinamide adenine dinucleotide.*

NES: *Nuclear Export Signal.*

NER: *Nucleotide Excision Repair.*

NFR: *Nucleosome Free Region.*

NLS: *Nuclear Localization Signal.*

NP40: *Nonyl phenoxypolyethoxylethanol.*

N-RAS: *Neuroblastoma Rat Sarcoma.*

NuRD: *Nucleosome remodeling and deacetylation.*

N-terminal: Extremo amino terminal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PADI1: *Peptidyl arginine deiminase, type 1.*

pb: Pares de bases.

PBS: *Phosphate buffered saline.*

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen.*

PCR: *Polymerase Chain Reaction.*

PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase-1 / pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1.*

PEST: Secuencias ricas en aminoácidos Prolina, Glutamato, Aspartato, Serina y Treonina.

PH: *Pleckstrin homology domain.*

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

PIK3R1/2: *Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1/2.*

PIP3: *Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate.*

PIP2: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase.*

PLC- γ : *Phospholipase C, isotype gamma.*

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

POT1: *Protection of telomeres 1.*

PP2A: *Protein Phosphatase 2A.*

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

PPP2R1B: *Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B.*

PR: *Progesterone receptor.*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10.*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride.*

P53: *Protein 53.*

P53R2: *P53-inducible ribonucleotide reductase.*

RAC1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1.*

RAI: *Retinoic Acid Induced (PPP1R13BL).*

RAP1: *Ras-related protein 1.*

RAS: *Rat Sarcoma.*

RASSF1/2A: *Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1/2.*

RB: *Retinoblastoma tumor suppressor.*

RBD: *RAS binding domain.*

RFC: *Replication Factor C.*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism.*

RNA: *Ribonucleic Acid.*

RSK4/RPS6KA6: *Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 6.*

RUNX1/AML1A: *Runt-Related Transcription Factor 1/ Acute Myeloid Leukemia 1 Protein.*

SAM: *S-adenosilmetionina.*

SCNA: *Somatic Copy Number Variation.*

SDS: *Sodium dodecyl sulphate.*

SHC: *Src homology 2 domain-containing.*

SH3: *SRC Homology 3 Domain.*

SIN3: *Histone Deacetylase Complex Subunit Sin3a.*

SIR2: *Silent Information Regulator 2.*

SIRT: *Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog).*

SMAD3: *MAD homolog 3.*

SNF2: *Sucrose non-fermenting 2.*

SOS1: *Son Of Sevenless Homolog 1.*

SOX17: *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 17.*

SPOP: *Speckle-type POZ Protein.*

SPROUTY-2: *Proteína codificada por el gen SPRY2.*

SP1: *Specificity Protein 1/ Sp1 Transcription Factor.*

SR: *Serine/Arginine-rich proteins.*

SSB: *Single-stranded DNA binding proteins.*

SWI/SNF: *Switching defective/sucrose non-fermenting.*

TBE: *Tampón Tris, Borato y EDTA.*

TBS: *Tris-Buffered Saline.*

TBS-T: *Tris-Buffered Saline with Tween.*

TCF/LEF: *T-cell factor-1 / lymphoid enhancing factor-1.*

tDNA: *Telomeric DNA.*

TGF β RII: *Transforming Growth Factor β Receptor II.*

TGF- α : *Transforming Growth Factor α .*

TEMED: *N, N, N, N' Tetrametilendiamina.*

TIN2: *TERF1 (TRF1)-Interacting Nuclear Factor 2.*

Tm: *Temperatura de fusión.*

TNKS2: *Tankyrase, TRF1-Interacting Ankyrin-Related ADP-Ribose Polymerase 2.*

TP53: *Tumor Protein 53.*

TRF1/2: *Telomeric repeat binding factor 1 and 2.*

Abreviaturas

TSP-1: *Trombospondina-1.*

TY: *Tryptone Yeast extract.*

UTR: *Untranslated region.*

UV: Ultravioleta.

WNT: *Wingless-Int.*

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

5-mC: 5-metil-2'-deoxicitidina.

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. EL ENDOMETRIO: DEFINICIÓN	3
2. EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO.....	4
2.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	4
2.2 CLASIFICACIÓN	5
2.2.1 CLÍNICO-PATOLÓGICA	5
2.2.2 HISTOLÓGICA	6
2.2.3 MOLECULAR.....	10
2.3 DESARROLLO DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO	10
2.4 FACTORES DE RIESGO.....	12
2.4.1 EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO HEREDITARIO.....	12
2.4.2 EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO	13
3. PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO	
ESPORÁDICO.....	14
3.1 FACTORES GENÉTICOS	14
3.1.1 VÍA PI3K-AKT-MTOR	14
3.1.2 VÍA RAS-RAF-MEK-ERK	17
3.1.3 VÍA WNT	21
3.1.4 OTROS GENES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS TUMORES DE	
ENDOMETRIO ESPORÁDICO.....	24
3.1.4.1 <i>TP53</i>	24
3.1.4.2 <i>CDKN2A</i>	28
3.1.4.3 <i>PPP2R1A</i>	29
3.1.4.4 <i>EGFR</i>	31
3.2 REPARACIÓN DEL DNA	33
3.2.1 MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR) 33	
3.2.2 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	36
3.3 FACTORES EPIGENÉTICOS: REMODELACIÓN DE LA CROMATINA.....	38
3.3.1 METILACIÓN	38
3.3.2 MODIFICACIÓN COVALENTE DE HISTONAS	41
3.3.3 REMODELACIÓN DE LA CROMATINA DEPENDIENTE DE ATP	44
3.3.3.1 <i>ARID1A</i>	46
3.4 LOS TELÓMEROS	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51

MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. PACIENTES	57
1.1 TEJIDO TUMORAL.....	57
1.2 SANGRE PERIFÉRICA.....	58
2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	59
2.1 EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE Y TEJIDO TUMORAL	59
2.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO TUMORAL.....	60
2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE TEJIDO TUMORAL	61
3. ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO.....	61
3.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR	63
3.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	64
3.3 DETECCIÓN DE MUTACIONES MEDIANTE CSGE-HETERODÚPLEX.....	65
3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR.....	66
3.5 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SANGER	66
3.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.....	66
3.7 BASES DE DATOS	67
3.7.1 PUBMED	67
3.7.2 UCSC	67
3.7.3 VEGA.....	67
3.7.4 HGMD®.....	68
3.7.5 LOVD-INSIGHT	68
3.7.6 COSMIC	68
3.7.7 IARC TP53 WEB SITE	68
3.7.8 THE P53 WEB SITE	69
3.7.9 MISMATCH REPAIR GENE VARIANT DATABASE	69
3.7.10 MIRBASE DATABASE.....	69
4. CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES.....	70
4.1 ESTUDIOS DE PERTENENCIA ALÉLICA DE MUTACIONES MEDIANTE CLONACIÓN	70
4.2 PROGRAMAS PARA EL ESTUDIO <i>IN SÍLICO</i> DE MUTACIONES NO DESCRITAS	73
4.2.1 POLYPHEN.....	73

4.2.2	SIFT	74
4.2.3	PMUT.....	75
4.2.4	PANTHER	75
4.2.5	ALIGN-GVGD	75
4.2.6	MICRORNA.....	77
4.2.7	ESEFINDER 3.0.....	77
4.2.8	RESCUE-ESE 1.0	78
4.2.9	TFSEARCH 1.3.....	78
4.3	PROGRAMAS PARA EL ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES GENERADOS POR LAS MUTACIONES NO DESCRITAS.....	79
4.3.1	PSIPRED.....	79
4.4	RT-PCR.....	79
4.5	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	80
4.5.1	CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL.....	80
4.5.2	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LÍNEAS CELULARES	81
4.5.3	WESTERN BLOT.....	82
4.6	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MMR MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	85
5.	ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH)	85
5.1	MEDIANTE RFLP	86
5.2	MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA	87
6.	ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).....	89
7.	ESTUDIO DE OTRAS ALTERACIONES EN EL MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS.....	91
7.1	ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS MEDIANTE MLPA DE LOS GENES <i>HMLH1</i> , <i>HMSH2</i> Y <i>HMSH6</i>	92
7.2	ESTUDIO DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>HMLH1</i> , <i>HMSH2</i> Y <i>HMSH6</i>	95
8.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS HISTONAS DESACETILASAS (HDAC) 1, 2 Y 3	97
9.	ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA	98
10.	ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS <i>TERT-1327C>T</i> Y <i>TERC- 63G>A</i> MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL	101

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	104
11.1 SPSS.....	104
11.2 GENEX.....	104
11.3 MULTBILOT	105
RESULTADOS	106
1. ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO.....	108
1.1 GENES SUPRESORES DE TUMORES	108
1.1.1 ESTUDIO DEL GEN <i>PTEN</i>	108
1.1.2 ESTUDIO DEL GEN <i>TP53</i>	119
1.1.3 ESTUDIO DEL GEN <i>CDKN2A</i>	121
1.1.4 ESTUDIO DEL GEN <i>CDH1</i>	122
1.1.5 ESTUDIO DEL GEN <i>PPP2R1A</i>	125
1.1.6 ESTUDIO DEL GEN <i>ARID1A</i>	131
1.2 ONCOGENES	137
1.2.1 ESTUDIO DEL GEN <i>PIK3CA</i>	137
1.2.2 ESTUDIO DEL GEN <i>CTNNB1</i>	141
1.2.3 ESTUDIO DEL GEN <i>KRAS</i>	141
1.2.4 ESTUDIO DEL GEN <i>BRAF</i>	142
1.2.5 ESTUDIO DEL GEN <i>EGFR</i>	143
1.3 MMR GENES	144
1.3.1 ESTUDIO DEL GEN <i>HMLH1</i>	144
1.3.2 ESTUDIO DEL GEN <i>HMSH2</i>	145
1.3.3 ESTUDIO DEL GEN <i>HMSH6</i>	146
1.4 ANÁLISIS GLOBAL DEL ESTUDIO DE MUTACIONES	146
2. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI)....	149
3. ESTUDIO DE OTRAS ALTERACIONES EN EL MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR)	152
3.1 ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS EN LOS GENES <i>HMLH1</i> , <i>HMSH2</i> Y <i>HMSH6</i>	152
3.2 ESTUDIO DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>HMLH1</i> , <i>HMSH2</i> Y <i>HMSH6</i>	156
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS HISTONAS DESACETILASAS (HDAC) 1, 2 Y 3	159
5. ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS.....	164

6. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS <i>TERT-1327C>T</i> Y <i>TERC-63G>A</i>	166
7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS RESULTADOS	169
DISCUSIÓN	173
1. ESTUDIO DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO	176
1.1 EL GEN <i>PPP2R1A</i>	177
1.2 EL GEN <i>ARID1A</i>	181
2. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA.....	186
3. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN POR GRADOS HISTOLÓGICOS	190
4. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS HISTOLÓGICOS	194
4.1 ADENOCARCINOMAS ENDOMETRIOIDES DE BAJO GRADO.....	194
4.2 ADENOCARCINOMAS ENDOMETRIOIDES DE ALTO GRADO.....	202
4.3 ADENOCARCINOMAS SEROSOS.....	204
4.4 ADENOCARCINOMAS DE CÉLULAS CLARAS.....	206
4.5 ADENOCARCINOMAS MIXTOS.....	207
4.6 CARCINOSARCOMAS.....	208
5. ANÁLISIS DE LOS TELÓMEROS EN TUMORES DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO.....	212
CONCLUSIONES	217
BIBLIOGRAFÍA	221
ANEXOS	250
ANEXO 1	253
1. GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	255
1.1 <i>PTEN</i>	255

1.2 <i>TP53</i>	255
1.3 <i>CDKN2A</i>	255
1.4 <i>CDH1</i>	256
1.5 <i>PPP2R1A</i>	256
1.6 <i>ARID1A</i>	257
2. ONCOGENES	258
2.1 <i>PIK3CA</i>	258
2.2 <i>CTNNB1</i>	258
2.3 <i>KRAS</i>	258
2.4 <i>BRAF</i>	258
2.5 <i>EGFR</i>	258
3. MMR GENES	259
3.1 <i>HMLH1</i>	259
3.2 <i>HMSH2</i>	259
3.3 <i>HMSH6</i>	260
ANEXO 2	261
1. ESTUDIO DE <i>HMLH1</i> Y <i>HMSH2</i>	263
2. ESTUDIO DE <i>HMSH6</i>	264
ANEXO 3	265
ANEXO 4	268
ANEXO 5	272
ANEXO 6	276

INTRODUCCIÓN



1. EL ENDOMETRIO: DEFINICIÓN

El endometrio es un tejido de naturaleza mucosa que tapiza el cuerpo del útero cuya composición varía de forma periódica dependiendo de los niveles de estrógenos y progestágenos ováricos. Su producción se inicia durante la menarquía y no cesa hasta la menopausia ya que su principal función es la de preparar la mucosa para una posible implantación y anidación del embrión. En caso de que no se produzca dicha fecundación, el endometrio se desprende de la cavidad uterina durante la menstruación¹.

El endometrio se encuentra altamente vascularizado y está formado principalmente por un estrato compacto, consistente en una capa superficial de epitelio columnar simple con células ciliadas y secretoras, y un estrato esponjoso de glándulas endometriales que se desarrollan como invaginaciones del epitelio superficial y que segregan moco. Además, existe un estroma endométrico o estrato basal muy denso formado por tejido conjuntivo (figura 1). Durante la menstruación los estratos compacto y esponjoso se descaman disminuyendo su grosor desde los 5 mm hasta los 0.5 mm².

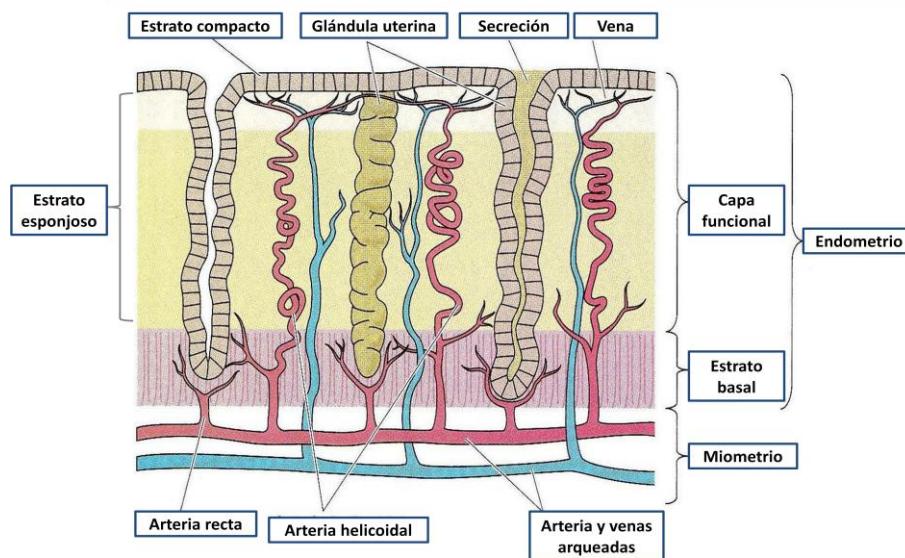


Figura 1: Esquema de la pared uterina en la que se observan las dos capas principales: miometrio y endometrio y sus divisiones según estratos así como los componentes más importantes en cada uno de ellos.

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

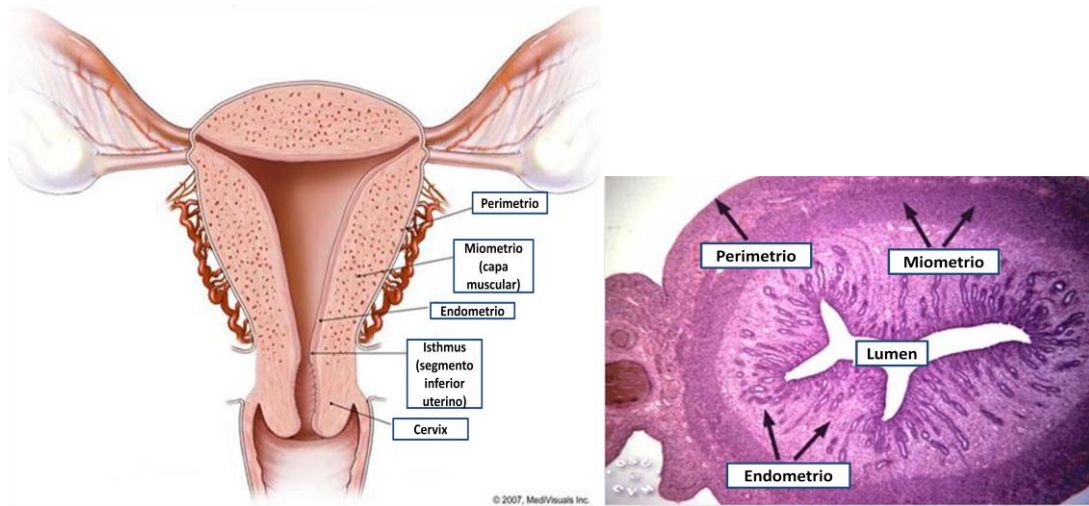


Figura 2: Esquema representativo de un corte vertical (izquierda) y foto real de un corte horizontal del útero (derecha) en los que se observan las diferentes capas que lo componen.

2. EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma de endometrio es el sexto tumor más frecuente en la población mundial femenina con una tasa de incidencia del 4.8%, causando aproximadamente 74.000 muertes en el año 2008³ (figura 3).

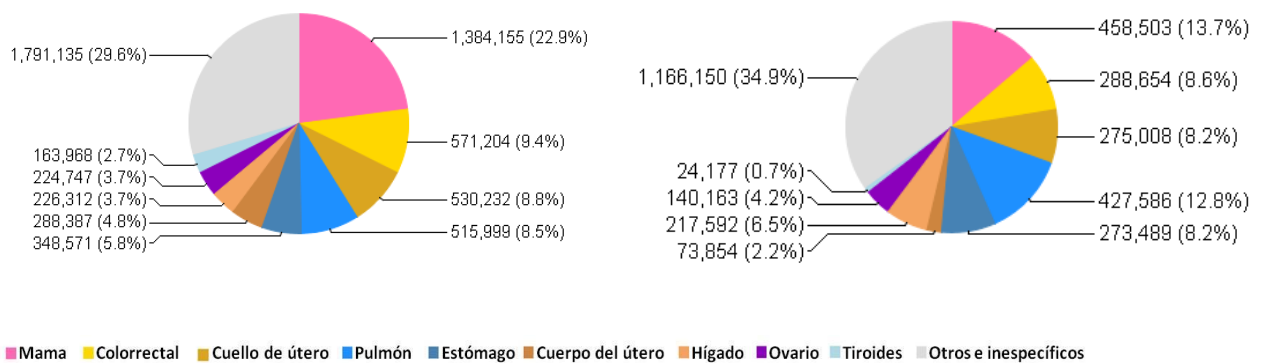


Figura 3: Gráficos de sectores en los que se representan las tasas de incidencia de los principales cánceres a nivel mundial (izquierda) y en los países industrializados (derecha) según la Organización Mundial de la Salud.

En el caso de los países industrializados, la incidencia se incrementa hasta un 5.8% convirtiéndose en el cáncer ginecológico más frecuente³ (figura 3). Esta cifra aumenta con los años parece ser que debido a un incremento de la esperanza de vida, de la obesidad y al uso de tamoxifeno en mujeres⁴. El pico de incidencia se establece entre los 50 y 70

años de edad, concretamente la media de edad de diagnóstico es 61 años^{5,6}. En un 75% de los casos se diagnostica en mujeres postmenopáusicas y la mayoría de ellos son esporádicos y tan sólo un 2-5% de los casos tienen un componente heredado³.

2.2 CLASIFICACIÓN

2.2.1 CLÍNICO-PATOLÓGICA

Según las características clínico-patológicas se ha propuesto un modelo dualístico en el cual los tumores de endometrio esporádicos se dividen en dos grupos: los estrógeno-dependientes o carcinomas endometrioides y los no estrógeno-dependientes o carcinomas no endometrioides⁷.

Los carcinomas endometrioides o tipo 1 representan un 70-80% de los casos, generalmente son de bajo grado y presentan un pronóstico favorable debido a su pronta detección y a su sencillo tratamiento, pues en la mayoría de los casos la histerectomía resulta suficiente^{8,9}. Aparecen en mujeres pre- y post-menopáusicas y coexisten o son precedidos por hiperplasias complejas atípicas o hiperplasias endometriales. Este tipo de tumor expresa normalmente receptores de estrógenos y progesterona^{10,11}.

El restante 20-30% de los carcinomas de endometrio constituye el grupo de los no endometrioides o tipo 2, considerados de alto grado y de peor pronóstico¹². No suelen expresar receptores hormonales y aparecen en mujeres de edades post-menopáusicas sin haber existido una estimulación estrogénica previa¹³. Son agresivos, se detectan en estadios más avanzados y ocasionalmente aparecen pólipos endometriales o atrofia endometrial como lesiones precancerosas.

La aparición temprana de signos clínicos, como por ejemplo un sangrado o manchado uterino anormal, y de síntomas como dolor al orinar, al tener relaciones sexuales o en el área pélvica permiten que el carcinoma de endometrio sea diagnosticado en estadios tempranos, cuando el tumor no ha invadido capas más internas de la pared uterina (75% de los casos)^{14,15}, siendo en este caso la probabilidad de supervivencia a los 5 años del 96%. Sin embargo, cuando el tumor se vuelve agresivo y lleva a cabo una invasión miometrial y linfovascular, la probabilidad de supervivencia disminuye aumentando el riesgo de recurrencia¹⁶.

2.2.2 HISTOLÓGICA

La clasificación histológica no sólo tiene en cuenta las características clínicas sino también el tipo celular y el grado del tumor^{14,17}. Para ello se siguen los criterios y recomendaciones establecidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2003¹⁸. Dichos organismos distinguen los siguientes tipos de carcinoma de endometrio según el grado de diferenciación celular:

- Grado 1: cuando el 5% o menos de las células poseen un crecimiento sólido no escamoso ni morular.
- Grado 2: cuando entre el 6% y el 50% de las células presentan un crecimiento sólido no escamoso ni morular.
- Grado 3: cuando más del 50% de células tienen un crecimiento sólido no escamoso ni morular.

Según el tipo celular se clasifican en:

- Adenocarcinoma endometriode:
 - o Variante con diferenciación escamosa
 - o Variante papilar o villoglandular
 - o Variante secretora
 - o Variante ciliada
- Adenocarcinoma mucinoso
- Adenocarcinoma seroso
- Adenocarcinoma de células claras
- Adenocarcinoma mixto
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma de células transicionales
- Carcinoma de células pequeñas
- Carcinoma no diferenciado
- Sarcoma

Excepto algunos tipos menos frecuentes, la mayoría son adenocarcinomas y los más comunes son los adenocarcinomas endometrioides que pueden ser de grado 1, 2 o 3. Al resto de subtipos se les denomina no endometrioides y se consideran de alto grado (grado 3), estableciendo así dos grupos con características diferentes no sólo a nivel histológico sino también a nivel molecular y clínico.

- Adenocarcinoma endometrioide: Es un tumor por lo general de grado 1 que representa el 90% de todos los tumores epiteliales de endometrio. Las glándulas se encuentran formando ramas en las que apenas interviene el estroma. Su pronóstico suele ser favorable¹⁹. Dentro de este subtipo existen diversas variantes dependiendo de las características citológicas:
 - o Variante con diferenciación escamosa: muestra áreas con discreta diferenciación a epitelio escamoso en el 25 a 50% de los casos. Este evento resulta atípico y no parece tener importancia en el comportamiento del tumor, aunque podría indicar un mejor pronóstico²⁰.
 - o Variante papilar o villoglandular: tiene por lo general características bien diferenciadas en el epitelio endometrial de los fondos papilares y suelen ser de grado 2²¹.
 - o Variante secretora: tiene una diferenciación celular de moderada a buena y se asemeja a etapas tempranas o medias de la fase secretora del ciclo menstrual. Sus células manifiestan prominentes vacuolas supra y subnucleares que contienen glucógeno^{22,23} y núcleos pequeños e hiper cromáticos, característica por la que se diferencia del carcinoma de células claras.
 - o Variante ciliada: es aquella en la que la mayoría de sus células son ciliadas, dando la apariencia del epitelio de las trompas de Falopio. Las diferencias citológicas atípicas ayudan a distinguir estas lesiones del epitelio ciliado normal²⁴.
- Adenocarcinoma mucinoso: representa un 1% de todos los tumores uterinos y se localiza en la endocérvix. Es un tumor raro, de bajo grado, cuyas células muestran mucina intracitoplasmática y tiene buen pronóstico^{25,26}. La diferenciación de este tumor con la metaplasia mucinosa de endometrio suele representar cierta dificultad en el diagnóstico. Este tipo de tumor exhibe proliferación atípica del epitelio con estratificación nuclear, pérdida de polaridad celular, mitosis atípicas, arquitectura anormal de las glándulas con prolongaciones, brotes glandulares, etc.²¹; por el contrario, la metaplasia mucinosa de endometrio no presenta anomalías en los núcleos o en la arquitectura celular.
- Adenocarcinoma seroso: representa un 10% de los tumores uterinos. Es una variante muy agresiva en la que la morfología epitelial se asemeja al carcinoma seroso de ovario y el pronóstico es probablemente peor que en el carcinoma de células claras. Este tipo de

tumor tiene tendencia a extenderse ampliamente en espacios vasculares a través del parénquima del útero y el miometrio²⁷ siendo habituales las colonizaciones del abdomen²¹, aunque no depende de la profundidad de la invasión miometrial. Debido a este poder invasivo, suelen registrarse casos con metástasis²⁷. Se compone de células redondas o de tipo *hobnail* que cubren los núcleos papilares del estroma y que muestran prolongaciones simples o complejas. Los núcleos tienen ocasionalmente formas multinucleares, muchos de ellos bizarros y con pocas mitosis atípicas. Todo esto permite considerarlos de alto grado. Presentan frecuentes cuerpos psamomatosos que a veces no están asociados con células las tumorales cuando aparecen calcificaciones²⁸. Los carcinomas endometriales secretores de bajo grado suelen tener ciertas semejanzas a nivel superficial con los carcinomas serosos, pero presentan núcleos pequeños e hiper cromáticos que generalmente carecen de nucléolo, y citoplasma claro con vacuolas supra y subnucleares que los diferencia²².

- Adenocarcinoma de células claras: representa un 4% del total de los tumores uterinos y es un tipo de tumor de alto grado con peor pronóstico que el carcinoma endometriode²⁹. Hay evidencias de que este tipo de tumores en fases tempranas de desarrollo son menos agresivos que los carcinomas serosos en el mismo nivel de desarrollo³⁰. El tumor está compuesto de células claras con glucógeno o células en forma de *hornails* que crecen en láminas, acinos lineares, cistos o papilas²³. No presenta una localización concreta.
- Adenocarcinoma mixto: este tumor de mal pronóstico es una mezcla de carcinoma de bajo y alto grado, con diferenciación endometriode y no endometriode. Representan un 10% del total de tumores endometriales y el 25% de los de tipo 2²¹.

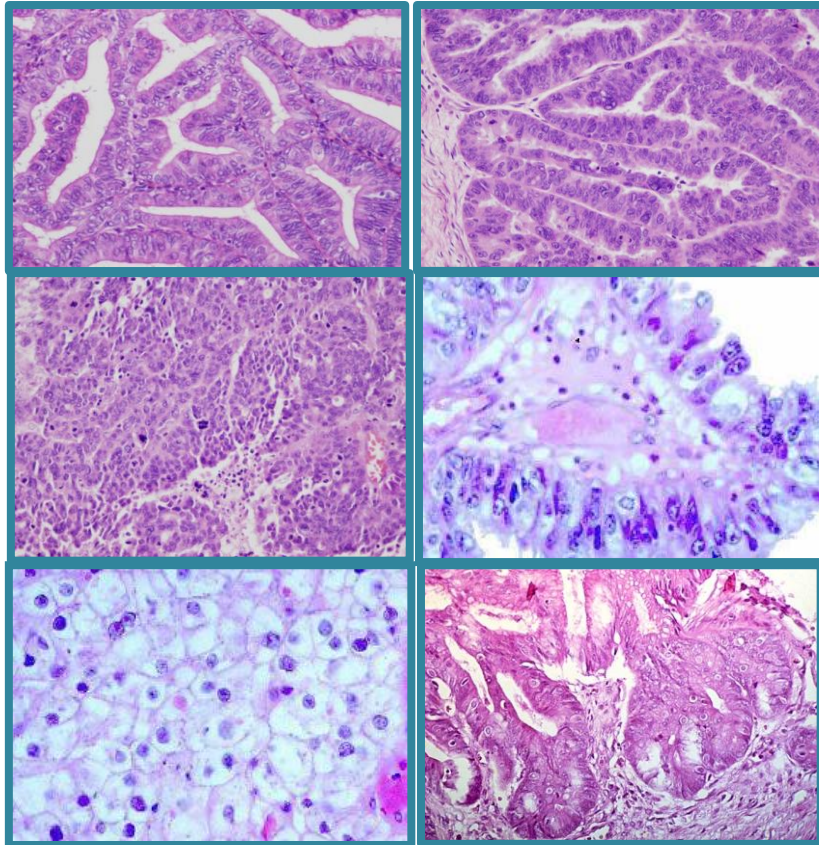


Figura 4: Cortes histológicos de diferentes tipos de carcinoma de endometrio. Imagen superior derecha: adenocarcinoma endometriode grado 1. Imagen superior derecha: adenocarcinoma endometriode grado 2. Imagen central izquierda: adenocarcinoma endometriode grado 3. Imagen central derecha: adenocarcinoma seroso. Imagen inferior izquierda: adenocarcinoma de células claras. Imagen inferior derecha: Adenocarcinoma mixto.

- Carcinoma de células escamosas: es un tumor raro, de diferente grado de malignidad, que se presenta con secreciones y sangrados. Se localiza en la ectocérvix o en la vagina y el diagnóstico suele ser difícil por biopsia ya que se puede confundir con epitelio ectocervical normal³¹.
- Carcinoma de células transicionales: es otro tipo raro de carcinoma endometrial que se asemeja a células transicionales de carcinoma de bazo²¹.
- Carcinoma de células pequeñas: es un tipo de tumor agresivo que expresa marcadores neuroendocrinos comunes³² y muestra al microscopio electrónico gránulos densos típicos. Histológicamente es muy similar al carcinoma de células pequeñas de otros tractos de órganos femeninos, con núcleos hiper cromáticos pequeños, un ratio núcleo/citoplasma alto y patrones de cromatina nuclear distintivos²¹. Los componentes del carcinoma de células pequeñas se pueden confundir con otra variante del carcinoma endometriode pudiendo confundirse con los carcinosarcomas³³.

Existe otro tipo de tumores de endometrio, los sarcomas, que representan del 2 al 5% de los tumores uterinos. Sus variantes más frecuentes son los carcinosarcomas (tumores Müllermanos malignos mixtos), los leiomiomas y los sarcomas del estroma. La variante carcinosarcoma constituye el 50% de este tipo y son tumores formados por una mezcla de

epitelio maligno, generalmente adenocarcinoma endometriode, con un componente estromal. Los elementos epiteliales y estromales están separados. Un 16% son de bajo grado³³. La variante leiomioma representa el 30% de los sarcomas y se componen de grandes regiones de músculo liso que generalmente no tienen bordes bien diferenciados y cuyas células tienen abundantes mitosis atípicas. Por último, los sarcomas del estroma, constituye un 15% de los sarcomas; se caracterizan por su semejanza con el estroma endometrial con células hipercromáticas pequeñas, redondas o alargadas y que presenta frecuentemente varios grados de atipia y gran actividad mitótica²¹.

2.2.3 MOLECULAR

Además de existir unas características clínico-patológicas e histológicas que permitan clasificar los diferentes tipos de carcinoma de endometrio, se ha observado que éstos presentan unos perfiles moleculares que facilitan su clasificación y tratamiento. En el caso de los carcinomas endometrioides, con frecuencia aparecen mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*³⁴, *KRAS*³⁵, *CTNNB1*³⁶, *FGFR2*³⁷ y en genes implicados en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos; por ello, también es frecuente la existencia de inestabilidad de microsatélites (MSI)³⁸. Recientemente se ha observado un alto porcentaje de mutaciones en los genes *ARID1A* (*BAF250A*)³⁹, *PIK3R1*⁴⁰ y *PIK3R2*⁴¹. En los tumores tipo 2 o no endometrioides es frecuente encontrar mutaciones en los genes *TP53*⁴²⁻⁴⁴, *CDKN2A*⁴⁵, *CDH1*^{46,47}, pérdidas de expresión de *HER2/ERBB2*⁴⁸ y *EGFR/ERBB1*⁴⁹ acompañados de pérdidas de heterocigosidad (LOH) en diferentes cromosomas⁵⁰. Estudios recientes han hallado un alto porcentaje de mutaciones en los genes *PPP2R1A*⁵¹, *CHD4* y *FBXW7*⁵², asociados principalmente a carcinomas tipo serosos.

2.3 DESARROLLO DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO

Desde el punto de vista histológico, el carcinoma de endometrio se origina en el revestimiento epitelial uterino y puede limitarse a esa capa o puede llegar a infiltrar el miometrio y el perimetrio, pasando a un estado mucho más avanzado y de peor pronóstico. La capacidad de infiltración está normalmente relacionada con el grado de diferenciación celular. Cuanto más diferenciadas las células, más posibilidad de que el tumor no progrese a capas más profundas y se limite a la superficie epitelial. Sin embargo, los menos diferenciados pueden llegar a invadir el miometrio y continuar la invasión al cérvix, vagina, vejiga y recto aumentando la probabilidad de invasión ganglionar y consecuente metástasis²¹.

Desde el punto de vista molecular, la aparición de un carcinoma endometrial es debida a la acumulación de mutaciones en genes supresores de tumores, genes implicados en la reparación del DNA y oncogenes; sin olvidar el papel fundamental que juega la epigenética. Este modelo de progresión tumoral como consecuencia de la acumulación de alteraciones moleculares ya fue explicado por Vogelstein en 1988 refiriéndose al cáncer colorrectal⁵³:

- Varias de las alteraciones genéticas que aparecen en los tumores endometriales se encuentran también en las hiperplasias atípicas, que son las lesiones precursoras inmediatas de la mayoría de ellos.
- Se encuentra un mayor número de alteraciones genéticas en los tumores bien diferenciados en comparación con las lesiones precursoras inmediatas.
- El número de alteraciones genéticas aumenta con el grado del tumor.
- En el tumor se encuentra un número de aberraciones cromosómicas cada vez mayor en comparación con la hiperplasia atípica.

Por tanto, en el carcinoma de endometrio, dependiendo de la naturaleza de estas alteraciones, la progresión del tumor será diferente llegando a diferenciarse dos tipos con características clínico-patológicas diferentes (figura 5).

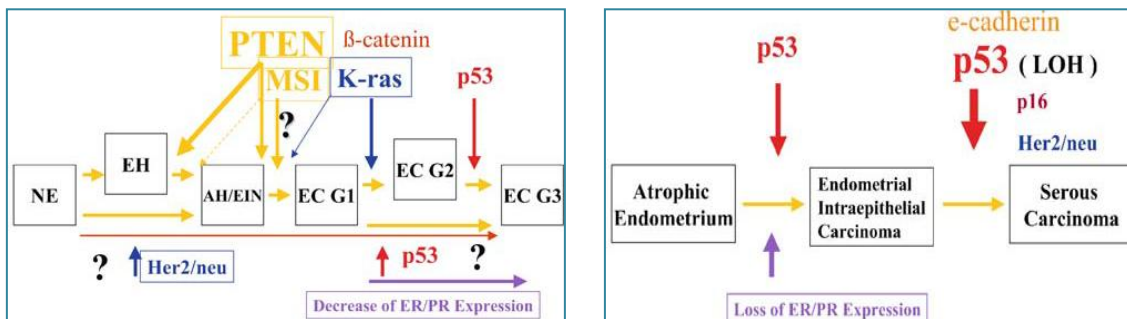


Figura 5: modelos de progresión tumoral diferenciada dependiendo de las alteraciones moleculares producidas en el transcurso del proceso. Imagen izquierda: Formación de tumores endometrioides grado 1, grado 2 y grado 3 por la aparición de mutaciones en el gen *PTEN*, inestabilidad de microsatélites, mutaciones en *KRAS* y en menor medida mutaciones en *HER2*, *TP53*, *CTNNB1* y pérdidas de expresión de receptores hormonales. Una vía alternativa podría dar lugar directamente a carcinomas endometrioides de grado 3 por la aparición de mutaciones en el gen *TP53* y la amplificación de los genes que codifican los receptores *HER2/neu*. Imagen derecha: Formación de adenocarcinomas de endometrio tipo serosos por mutaciones en el gen *TP53*, principalmente, acompañadas por pérdidas de heterocigosis, mutaciones en *CDH1*, *CDKN2A*, *HER2* y pérdida de expresión de receptores hormonales. NE: endometrio normal; EH: hiperplasia endometrial sin atipia; AH: hiperplasia endometrial atípica; EIN: neoplasia endometrial intraepitelial; EC: carcinoma endometrioide (grados 1-3)⁴⁴.

Sin embargo, determinados tipos histológicos de carcinoma de endometrio no poseen unas características clínico-patológicas y moleculares diferenciadas sino bastante heterogéneas. Es el caso de los carcinomas mixtos, los endometrioides grado 3 y algunos carcinosarcomas. Puede considerarse que algunos tumores tipo 2 se originan a partir de los de tipo 1 y de ahí su heterogeneidad (figura 6). Se sugiere por tanto que dichos tipos

de tumor deben ser estudiados en profundidad y considerados como grupo aparte a la hora de su tratamiento.

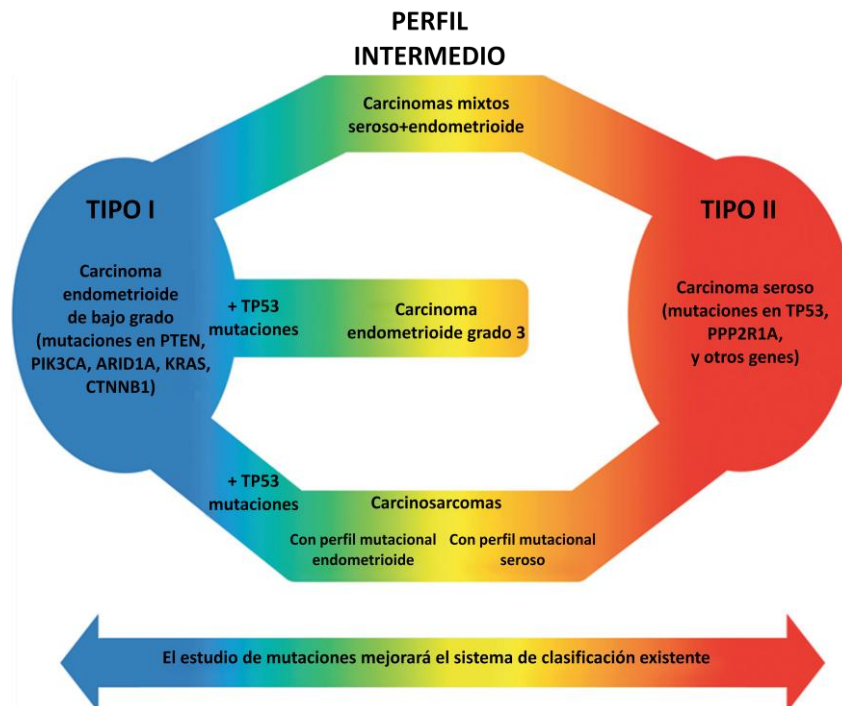


Figura 6: modelo de clasificación de los carcinomas de endometrio por sus características moleculares, proponiendo a los endometrioides grado 3, carcinosarcomas y carcinomas mixtos como grupos con características moleculares intermedias entre los tipo 1 y los tipo 2⁵⁴.

2.4 FACTORES DE RIESGO

2.4.1 EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO HEREDITARIO

La mayoría de los tumores de endometrio son esporádicos y tan sólo entre un 2% y un 5% de los casos son heredados. El carcinoma de endometrio familiar se encuentra asociado a mutaciones en genes del mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos del DNA (MMR) *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *hPMS2* y deleciones en el gen *EPCAM* cuando se encuentran asociadas al Síndrome de Lynch⁵⁵. Por otra parte, mutaciones germinales en el gen PTEN se asocian al Síndrome de Cowden y pueden asociarse con carcinoma de endometrio.

El síndrome de Lynch, también denominado cáncer hereditario colorrectal no polipósico (HNPCC), es una enfermedad autosómica dominante que se manifiesta con la mayoría de los tumores de endometrio no esporádicos ya que es caracterizada por un elevado riesgo de padecer cáncer colorrectal y cáncer de endometrio. En el caso de los varones, el riesgo de presentar cáncer colorrectal es mayor que en el de las mujeres (80% frente a 40-

60%)⁵⁶. Sin embargo, en las mujeres, el cáncer de endometrio asociado a Lynch adquiere una elevada importancia, ya que el riesgo de desarrollarlo es incluso mayor que el del cáncer colorrectal⁵⁶⁻⁵⁹. En mujeres con mutaciones en los genes *hMLH1* y *hMSH2*, el riesgo de padecer carcinoma de endometrio es de un 40 a 60%^{57,58}; sin embargo, ser portador de mutaciones en el gen *hMSH6* aumenta esta probabilidad a un 71% a una edad de aproximadamente 70 años⁶⁰. Todas estas alteraciones producen deficiencias en la reparación del DNA, haciendo que aumenten las mutaciones en otras regiones y aparezcan, entre otras, secuencias microsatélites con expansiones o acortamientos. Este fenómeno, llamado inestabilidad de microsatélites o MSI, también constituye una herramienta de diagnóstico para determinar deficiencias en el sistema MMR⁶¹.

El síndrome de Lynch también se asocia a la aparición de otros tipos de tumores como el renal, pelvis, ovario, estómago, intestino delgado y uretra pero en un porcentaje mucho menor⁶². Actualmente no existen datos que sugieran que el pronóstico de las mujeres que presentan carcinoma de endometrio asociado a síndrome de Lynch sea mejor o peor que el de las mujeres que presentan carcinoma de endometrio esporádico⁵⁵.

El síndrome de Cowden es una enfermedad hereditaria compleja caracterizada por la aparición de lesiones malignas y benignas denominadas hamartomas que afecta a todos los tejidos derivados de las tres capas germinales, principalmente a la mama, el tiroides, el útero, el cerebro y los tejidos mucocutáneos⁶³. Afecta a 1 de cada 200.000 individuos y se asocia en un 80% de los casos con mutaciones germinales en el gen *PTEN*⁶⁴. En un 5-10%^{63,65} de los casos aparece asociado a carcinoma de endometrio pero lo más frecuente es encontrarlo asociado a cáncer de mama en un 25-50%^{63,66} o en menor medida al cáncer de tiroides (10%)^{63,65}.

2.4.2 EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

El principal factor de riesgo asociado al desarrollo del carcinoma de endometrio esporádico es la exposición hormonal, tanto exógena como endógena. Las hormonas promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis y por ello los carcinomas endometrioides se encuentran estrechamente asociados a ellas, observándose una sobreexpresión de los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR). En los no endometrioides no se ha observado una expresión anómala de dichos receptores, siendo en la mayoría de los casos negativa o débil¹¹. Se han descrito otros dos grupos de factores que pudieran también relacionarse con la aparición del tumor: por una parte variaciones fisiológicas como el sobrepeso, la nuliparidad, la menarquía temprana o la menopausia tardía, y por otra ciertos estados de enfermedad como la diabetes mellitus, la hipertensión, el síndrome del ovario poliquístico y tumores en otros lugares como en la mama y el ovario^{67,68}.

3. PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

3.1 FACTORES GENÉTICOS

3.1.1 VÍA PI3K-AKT-MTOR

La ruta de señalización molecular en la que participan PIK3CA (*phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) y PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), resulta de elevado interés por ser una de las posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del carcinoma de endometrio esporádico.

PTEN es uno de los genes supresores tumorales mutados con más frecuencia en el cáncer de endometrio y en otros tumores como los glioblastomas o el cáncer de próstata. También denominado *MMAC1* o *TEP1*, fue clonado por primera vez en 1997 localizándose en la región 10q23.3, donde ya anteriormente se sospechaba la existencia de un gen supresor tumoral al ser una región frecuentemente mutada o delecionada en diversos tipos de tumores^{69,70}.

Este gen codifica una proteína altamente conservada de 403 aminoácidos y masa molecular aproximada de 47 kDa, miembro de la gran familia de las proteínas tirosina kinasas. Consta de cinco dominios: el dominio fosfatasa que se localiza en el extremo N-terminal y consta de un motivo crítico IHCKAGKGRTG, encargado de desfosforilar dominios Tirosina, Treonina y Serina de otras proteínas así como la posición 3 del fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3); en la parte central se encuentra el dominio C2 de unión a la membrana plasmática que parece orientar al dominio catalítico de forma apropiada para la interacción con PIP3⁷¹; las secuencias PEST ricas en aminoácidos Prolina, Glutamato, Aspartato, Serina y Treonina importantes para el reconocimiento del proteosoma y la consecuente degradación de la proteína; y en el extremo C-terminal se sitúa el dominio PDZ que permite a PTEN unirse con proteínas de andamiaje que contienen también dominios PDZ, así como una región que se encuentra sometida a una regulación por fosforilación y defosforilación en residuos Serina y Treonina que cambian la estabilidad y actividad de PTEN (figura 7)⁷². Una de las enzimas que parece estar implicada en este proceso de regulación es la proteína kinasa CK2 que modula la estabilidad de PTEN mediante degradación por proteosoma⁷³.

Introducción

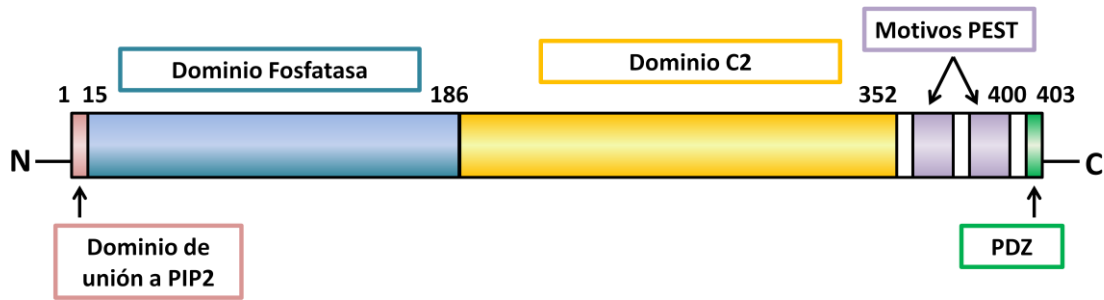


Figura 7: Esquema de la proteína PTEN en el que se observan los diferentes dominios y motivos así como los aminoácidos que comprende cada uno de ellos.

El dominio catalítico de PTEN comparte cierta homología con proteínas del citoesqueleto tales como la tensina y la auxilina, encargadas del transporte sináptico de vesículas, por lo que en su momento se sugirió la existencia de una relación entre PTEN y los procesos de invasión celular y metástasis^{69,70,74,75}.

El gen *PIK3CA* se localiza en el *locus* 3q26.32 y está compuesto por 21 exones de los cuales 20 son codificantes. Codifica la subunidad p110 α que ejerce la función catalítica del complejo heterodímero PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), mientras que la función reguladora la lleva a cabo la subunidad p85. La proteína p110 α está formada por cinco dominios: un dominio adaptador de unión (ABD); un dominio de unión a RAS (RBD); un dominio C2, por el que establece uniones con otras proteínas y lípidos, entre ellos los lípidos de membrana; un dominio helicoidal cuya función es servir de puente entre el dominio C2 y kinasa, y un dominio catalítico kinasa (figura 8)⁷⁶.



Figura 8: Esquema de la proteína PIK3CA en el que se observan los diferentes dominios y motivos que la componen. ABD: dominio adaptador de unión; RBD: dominio de unión a RAS.

La proteína pertenece a la clase 1A de las PI3K, activadas por receptores tipo tirosín-kinasa, receptores asociados a proteína G y a algunos protooncogenes como RAS. Cuando PI3K está activada es capaz de fosforilar, utilizando ATP, el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) y convertirlo en PIP3⁷⁷ que recluta en la membrana a proteínas con dominios homólogos a la plecstrina (PH) como PDK1 y AKT. Este proceso es inhibido por PTEN, el cual revierte la reacción sirviendo de regulador y equilibrando la cantidad de PIP3 presente en el citoplasma⁷⁶.

Cuando AKT se encuentra reclutada en la membrana plasmática es activada mediante fosforilación de sus residuos de Serina y Treonina en las posiciones 308 y 473 respectivamente. Una vez activada, AKT inicia la cascada de señalización que conlleva la activación de numerosos factores de transcripción con dominios Forkhead tales como AFX, FKHR y FKHL1⁷⁸ relacionados con la supervivencia celular, los cuales se traslocan desde el núcleo al citoplasma evitando su actividad sobre la transcripción de genes como FAS-1, IGFBP1 y BIM. Una vez en el citoplasma, estos factores de transcripción son secuestrados por

la proteína 14.3.3. Asimismo, la activación de la proteína GSK-3 β por AKT y la fosforilación de sus sustratos regulan la señalización celular de la proteína mTORC1, la cual actúa sobre diferentes efectores regulando diversos procesos celulares como el crecimiento celular, el metabolismo, la proliferación, la supervivencia, la migración, la apoptosis y la angiogénesis (figura 9)⁹.

AKT también activa otros factores de transcripción relacionados con proliferación, apoptosis supervivencia celular y otros mecanismos de la tumorigénesis, convirtiéndola, por tanto, en una molécula clave en los diferentes mecanismos celulares cuya desregulación implicaría graves consecuencias para la célula ya que se vería involucrada en procesos de crecimiento y proliferación descontrolados. En la actualidad se utilizan fármacos inhibidores de los principales componentes de esta ruta que, combinados con tratamiento hormonal, parecen tener un buen resultado en el tratamiento del carcinoma de endometrio.

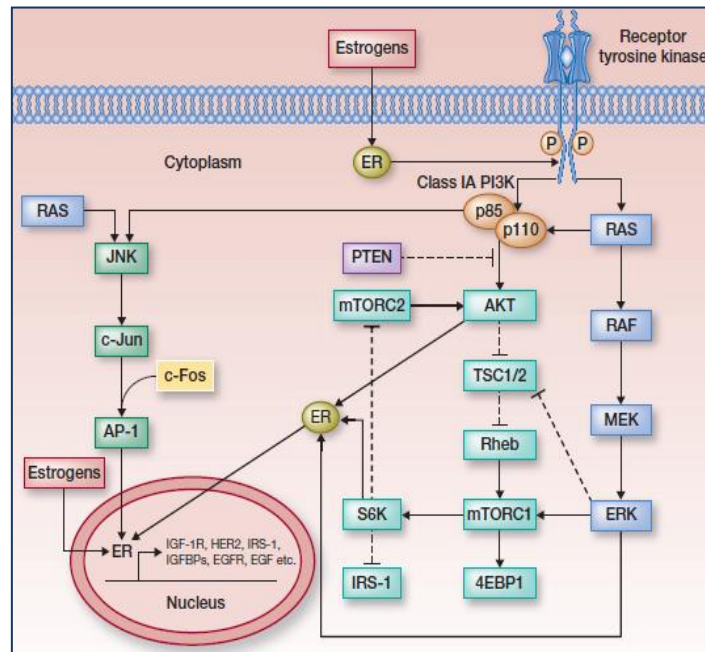


Figura 9: esquema de la integración de diferentes rutas de señalización celular destacando la constituida por PI3K, PTEN y AKT y la ruta de las RAS-RAF-MEK-ERK ambas con mTORC y receptores de estrógenos como efectores comunes⁷⁹.

Tanto el gen *PTEN* como el gen *PIK3CA* aparecen mutados en el carcinoma de endometrio esporádico. Las mutaciones en *PTEN* parecen ser uno de los principales factores desencadenantes del desarrollo tumoral en hasta un 80% de los casos de tipo endometriode, siendo el gen más frecuentemente mutado en este tipo de tumores^{80,81}. Las mutaciones encontradas en el gen *PTEN* comprenden alteraciones de cambio de aminoácido (*missense*), mutaciones sin sentido (*nosense*), deleciones e inserciones que alteran la fase de lectura (*frameshift*), mutaciones silenciosas, y mutaciones que alteran el proceso de *splicing*. La frecuencia de las mutaciones tipo *missense* en *PTEN* es más elevada que en otros genes supresores de tumores a excepción del gen *TP53*. Aunque las mutaciones *nosense* y *missense* han sido encontradas en los nueve exones de *PTEN*, las mutaciones de tipo *missense* tienden

a agruparse en la región de los dominios catalítico fosfatasa y C2 codificados por los exones 5, 6, 7 y 8. Estas mutaciones pueden disminuir la actividad inositolfosfatasa de PTEN y se asocian con mayor afinidad tumoral mientras que las mutaciones localizadas fuera de estos exones, es decir, fuera de los dominios implicados en la actividad fosfatasa y de unión a proteínas y lípidos, se asocian con una mayor supervivencia de las pacientes⁸².

El gen *PIK3CA* también aparece mutado con frecuencia en el carcinoma endometrial y con mayor frecuencia en los dominios hélice (exón 9) y kinasa (exón 20), aunque también se pueden hallar en los exones del 1 al 7. De hecho, la vía PI3K/AKT/mTOR es la más afectada en el carcinoma tipo endometriode estando mutada en un 80% de los casos incluyendo mutaciones en los genes *PIK3R1* (p85 α) (43%), *PIK3CA* (36%) y *PTEN* (37-61%), amplificación de *PIK3CA* (7-33%), metilación del promotor o pérdida de expresión de *PTEN* (35-50%) y raramente mutaciones en *AKT* (2%) y *PIK3R2* (p85 β) (5%). De todas ellas, las mutaciones en *PTEN* son las más frecuentes y parecen no ser redundantes con las presentes en *PIK3CA* ya que coexisten en muchos casos^{34,41,80,81,83-87}. Se postulan diferentes hipótesis para explicar este hecho; por una parte la ruta de señalización PI3K-AKT-mTOR podría requerir más de una señal desreguladora para su sobreactivación y desarrollo del tumor. Por otra, recientemente se ha observado que PTEN muestra funciones independientes de la ruta AKT e incluso de su actividad fosfatasa, pudiendo interactuar con otros factores jugando un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica^{88,89}. También se ha observado, en las hiperplasias con y sin atipia (20-27%)^{90,91} y en las neoplasias intraepiteliales (55%)⁸, lo que sugiere que las mutaciones en el gen *PTEN* son un evento que ocurre en etapas tempranas del desarrollo del carcinoma endometriode.

En los carcinomas no endometrioides la ruta PIK-AKT-mTOR aparece alterada con menos frecuencia, aproximadamente un 40% de los casos, y la incidencia de mutaciones en los genes *PTEN* y *PIK3CA* es menor que en los carcinomas endometrioides (5-13% y 30-35% respectivamente)^{92,93}.

3.1.2 VÍA RAS-RAF-MEK-ERK

Los genes *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) y *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) codifican dos proteínas envueltas en la ruta de señalización de las MAP kinasas.

KRAS es una proteína de pequeño tamaño (21kDa) perteneciente a la subfamilia de las GTPasas RAS. Esta familia contiene cuatro miembros que se diferencian principalmente en su extremo C-terminal: HRAS, NRAS, KRAS4A y KRAS4B. Estas dos últimas son dos isoformas producto de un *splicing* alternativo de su mRNA en la secuencia del gen *KRAS* que codifica el

extremo carboxiterminal de la proteína y que se expresan de forma diferencial en los distintos tejidos. En la literatura, cuando se menciona KRAS en realidad se está refiriendo a la isoforma KRAS4B (figura 10)⁹⁴.

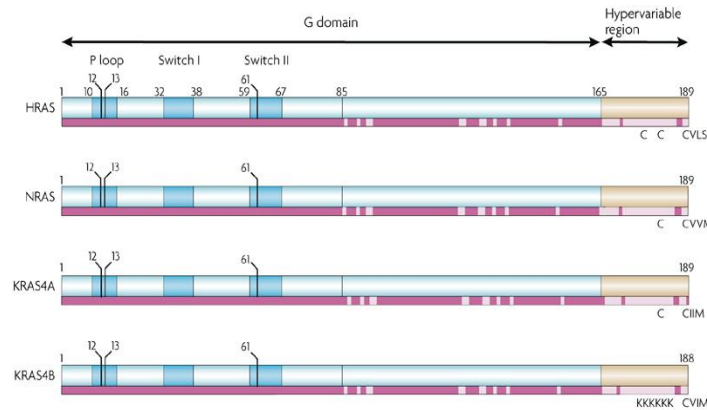


Figura 10: Esquema de las proteínas integrantes de la familia RAS en el que se observan los diferentes dominios que la componen destacando los codones 12, 13 y 61 donde se han detectado las mutaciones patogénicas descritas hasta el momento en cáncer esporádico⁹⁴.

El extremo N-terminal comprende los residuos del 1 al 165 y en él se encuentra el dominio G, con una estructura común altamente conservada. El extremo C-terminal diferencia a unas isoformas de otras constituyendo la región hipervariable de la familia de las RAS. Contiene aminoácidos específicos para las modificaciones postranscripcionales que se van a producir y que van a mantener a las proteínas citosólicas ancladas a la membrana celular. KRAS, al igual que el resto de las proteínas RAS, es farnesilada en el motivo terminal CAAX, en el que C es una Cisteína, A es un aminoácido alifático y X es cualquier otro aminoácido. Pero además, a distinción de las demás, contiene una zona rica en Lisinas que forman uniones iónicas con las cabezas cargadas negativamente de los lípidos de la membrana celular (figura 10)⁹⁴.

La proteína KRAS se activa cuando interacciona con una molécula de GTP, reacción facilitada por unas moléculas denominadas GNEFs, las cuales se encargan de abrir el sitio de unión a GTP. La proteína RAS activada desencadena una cascada de señalización intracelular que envuelve a diferentes moléculas, muchas de ellas kinasas. Cuando RAS hidroliza GTP a GDP, gracias a su actividad GTPasa y estimulado por los reguladores negativos GAPs, se desactiva y la señal cesa⁹⁵.

KRAS actúa cuando existe una señal emitida por receptores de superficie, proteínas G heterotriméricas o integrinas al interior de la célula. Por ejemplo, es conocido el mecanismo desencadenado a través de EGFR, cuya fosforilación en el dominio intracelular activa la unión de moléculas intermediarias/adaptadoras tales como GRB2 o SHC que a su vez reclutan GEFs como SOS1 a la membrana celular^{94,96,97}. Entonces KRAS activa de forma directa dos moléculas fundamentales: RAF kinasa, principalmente, y PI3K, en menor medida, asociadas a las rutas MAPK y PI3K/AKT respectivamente^{94,96}. De forma adicional, KRAS-GTP también interacciona con GEFs para la activación de pequeñas GTPasas como RAC y RAI interviniendo en la modulación de la dinámica del citoesqueleto y del tráfico vesicular (figura 11)^{94,98,99}.

Introducción

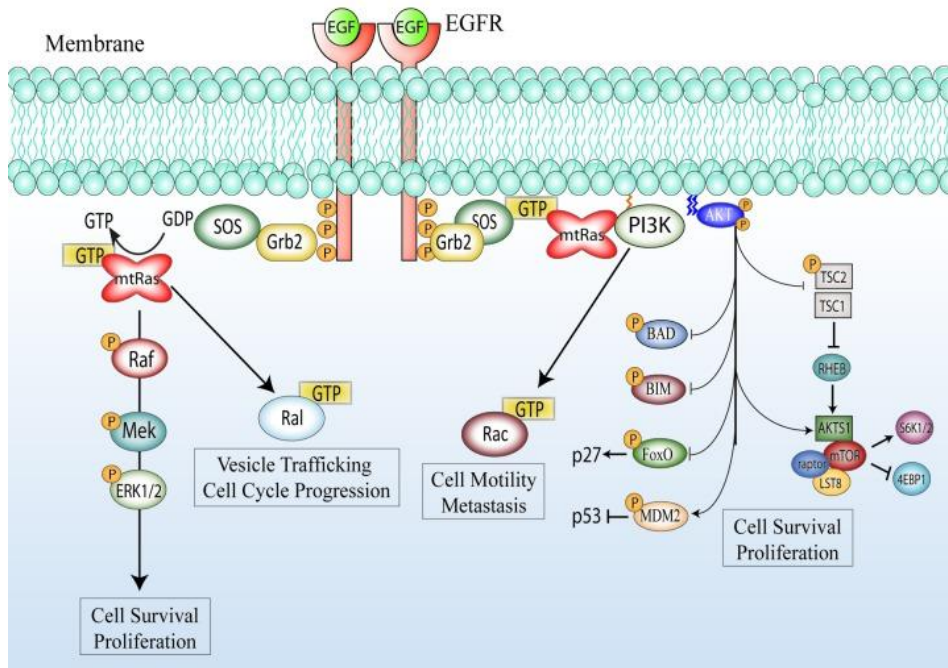


Figura 11: Activación de RAF y PIK3CA por parte de la proteína RAS como respuesta a la activación del receptor EGFR. Se observa también la activación de algunas GTPasas como son RAC y RAI encargadas de la modificación del citoesqueleto y tráfico de vesículas¹⁰⁰.

El gen *KRAS* se localiza en el *locus* 12p12.1 y consta de 6 exones. Las mutaciones somáticas observadas hasta el momento en la familia de los genes *RAS* sobreactivan a las proteínas y aparecen en un 30% de los cánceres humanos. *KRAS* se halla mutado de forma somática prevalentemente en cáncer de páncreas, colorrectal, endometrio, tracto biliar, pulmón y cervical así como en enfermedades mieloides. En la mayoría de los casos se trata de mutaciones tipo *missense* localizadas en los codones 12 y 13 principalmente (exón 2) y en el 61 (exón 3) con una menor frecuencia¹⁰¹. Estos cambios confieren resistencia a las GAPs lo cual hace que la proteína quede permanentemente unida a GTP, y por tanto, activa¹⁰²; como consecuencia se produce una desregulación en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de la célula. Se han descrito mutaciones en otros codones en la línea germinal del desarrollo de enfermedades tales como el Síndrome de Noonan y el Síndrome de Costello⁹⁴.

En el carcinoma de endometrio el porcentaje de aparición de mutaciones en el gen *KRAS* es bajo (14%), destacando su distribución diferencial según el tipo de tumor¹⁰³ siendo más frecuente encontrarlo mutado en los tipo 1 (18%) aunque también se ha observado alterado en un 3% de los carcinomas tipo seroso¹⁰⁴. Las mutaciones en el gen *KRAS* se han asociado con mal pronóstico independientemente de la edad de la paciente¹⁰⁵. Estas mutaciones parecen producirse en estadios tempranos de la tumorigénesis ya que se han observado en hiperplasias endometriales atípicas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

El gen *BRAF* se localiza en el *locus* 17q34 y está compuesto por 18 exones. Codifica la proteína serina/treonina kinasa BRAF componente también de la vía de las MAPK y activada por RAS. Está formada por tres dominios de los cuales el primero de ellos contiene el sitio de unión a RAS seguido de una región rica en Cisteínas; el segundo dominio está compuesto por

un alto número de residuos de Serina y Treonina que se fosforilan para su función biológica; en el tercer dominio reside su función kinasa y está flanqueado por una región rica en glicinas y un segmento de activación¹⁰⁹.

La proteína BRAF forma parte de la familia de las RAF serina/treonina kinasas junto con otras dos isoformas: ARAF y CRAF. Las tres isoformas comparten el mismo dominio N-terminal, cuya actividad es reguladora y se encarga de inhibir el dominio C-terminal kinasa. Cuando RAS se une a ese dominio N-terminal, cesa la inhibición y RAF fosforila al siguiente componente de la cascada de señalización: MAPKKK. Mientras que BRAF posee dos sitios de activación kinasa, ARAF y CRAF presentan 4; de esta forma resulta más fácil sobreactivar a BRAF con la aparición de una sola mutación (figura 12)¹¹⁰.

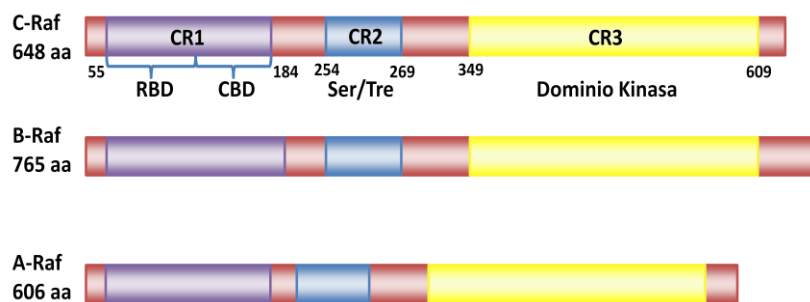


Figura 12: Esquema de las proteínas integrantes de la familia RAF en el que se observan los diferentes dominios que la componen y los aminoácidos que integran cada uno de ellos.

La activación de la MAPKKK por parte de BRAF desencadena la fosforilación y consecuente activación de MEK1 y MEK2 que catalizan la activación de las kinasas ERK1 y ERK2 y su traslocación al núcleo. Una vez allí, estas dos moléculas fosforilan diversos efectores nucleares y citoplasmáticos envueltos en una gran cantidad de procesos celulares tales como la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación, la motilidad y la angiogénesis (figura 11)¹¹¹⁻¹¹³.

Las mutaciones en el gen *BRAF* suelen ser tipo *missense* y aparecen con una gran frecuencia en algunos tipos de tumores humanos como los melanomas malignos (39%), el cáncer de tiroides (38%) y el carcinoma colorrectal (12%)¹⁰³.

Las mutaciones suelen agruparse en la región rica en residuos de glicina codificada por el exón 11 y en el segmento de activación codificado por el exón 15. Como consecuencia, se genera una proteína que induce una constante activación de ERK, promoviendo el paso de la fase G1 a S en el ciclo celular, y un aumento en la proliferación celular¹¹⁴.

Entre todas las mutaciones descritas hasta el momento cabe destacar el cambio de una Timina por una Adenina en la posición 1799 (c.1799T>A) localizada en el exón 15 del gen que da lugar a una sustitución en el codón 600 de una Valina por un ácido Glutámico (V600E). Esta mutación aumenta diez veces la actividad kinasa de la proteína y su prevalencia es mayor en algunos tipos de cáncer como el melanoma¹¹⁵ y el carcinoma papilar de tiroides¹¹⁶. No

obstante, la aparición de esta mutación en carcinoma de endometrio esporádico es poco frecuente¹¹⁷. En general, las mutaciones somáticas en los exones 11 y 15 de *BRAF* no son muy comunes en el carcinoma de endometrio (1-4%)^{103,104,118,119}.

No se han descrito mutaciones concomitantes en los *loci* de los genes *KRAS* y *BRAF* lo que apunta a que estas mutaciones pudieran ser redundantes en los efectos que provocan y que, por tanto, sólo sería necesaria la alteración en una ellas para conducir a la célula hacia la tumorigénesis^{118,120}.

3.1.3 VÍA WNT

La ruta Wnt (*Wingless-Int*) regula procesos tales como proliferación, diferenciación y polaridad celular. Las señales de Wnt desencadenan cascadas de transducción intracelular al interactuar con receptores específicos en las membranas celulares. La cascada más estudiada es la que implica a Frizzled y a β -catenina¹²¹. En ausencia de Wnt, la β -catenina forma un complejo citoplasmático con las proteínas AXIN1, AXIN2, APC, CSNK1A1 y GSK-3 β que promueven su fosforilación en los residuos de Serina y Treonina de su dominio N-terminal y por tanto su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma¹²². Cuando Wnt está presente, se une a los receptores Frizzled (Fz) y los coactivadores LRP activan las proteínas Dishevelled (Dsh) que inhiben el complejo que activa la ubiquitinación de la β -catenina evitando su degradación y facilitando su acumulación en el citoplasma, lo que promueve su traslocación al núcleo de la célula donde actúa como coactivador de factores de transcripción de la familia TCF/LEF liderando la activación de genes de respuesta de la ruta Wnt (figura 13)¹²³.

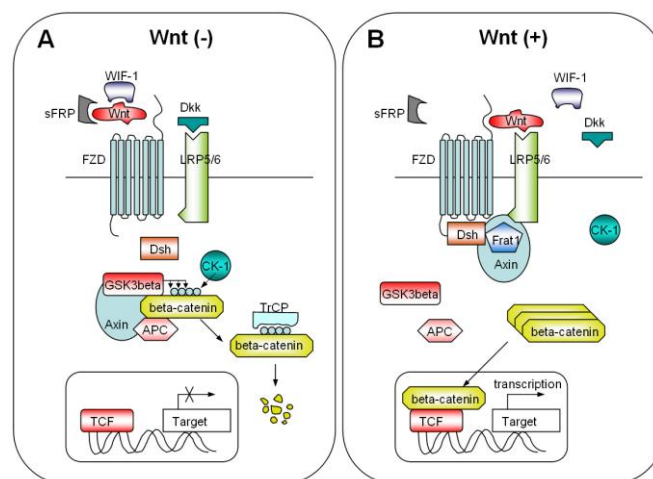


Figura 13: Ruta de señalización Wnt. A) Cuando no se produce una señalización Wnt-FDZ, la proteína β -catenina se une al complejo citoplasmático formado por GSK-3 β , Axina y APC que la fosforilan y marcan para su ubiquitinación, por la TrCP- ubiquitin ligasa, y posterior degradación. B) Activación de la ruta Wnt por unión del ligando Wnt al receptor FZD con el consecuente secuestro de la proteína Axina y disgregación del complejo de unión a β -catenina que no es degradada. Por tanto β -catenina acumulada en el citoplasma es trasladada al núcleo de la célula donde se une a TCF/LEFs activando la transcripción de diversos genes¹²³.

En el carcinoma de endometrio, la ruta Wnt se ve principalmente afectada por alteraciones en la proteína β -catenina (cadherin-associated protein beta 1), codificada por el gen *CTNNB1* que se localiza en la región cromosómica 3p22.1 y consta de 15 exones.

La proteína β -catenina posee un peso molecular de 88 kDa y contiene 781 aminoácidos. Además de jugar un papel muy importante en la ruta de señalización intracelular Wnt, también intermedia la interacción entre cadherinas y el esqueleto de actina participando en la señal de inhibición de la división celular cuando la capa del epitelio está formada¹²¹.

El gen *CDH1* se sitúa en el cromosoma 16q22.1 en un clúster con otros genes codificantes de cadherinas¹²⁴. Su longitud es de aproximadamente 98 Kb repartidas en 16 exones, todos ellos codificantes. Codifica la proteína E-cadherina, una glicoproteína transmembrana dependiente de Ca^{2+} que pertenece a la superfamilia de las cadherinas las cuales se expresan en la mayoría de las células epiteliales y cuya principal función es el mantenimiento de la polaridad y la diferenciación celular tanto durante el desarrollo del organismo como en la vida adulta¹²⁵⁻¹²⁷.

La E-cadherina tiene un peso de 120 KDa y se compone de 883 aminoácidos organizados en tres dominios estructurales fundamentales: un dominio citoplasmático de unos 150 aminoácidos, un dominio transmembrana y un dominio extracelular de unos 550 residuos que contiene 5 dominios cargados negativamente, repetidos en tándem, denominados EC1-EC5, muy conservados y exclusivos de las cadherinas. La única forma de estabilizar su unión con otras células o con la misma es a través de la unión de Ca^{2+} a los 5 dominios¹²⁸⁻¹³⁰.

El dominio citoplasmático de la E-cadherina interacciona con las α -, β - y γ -cateninas. A través de la α -actina se une al citoesqueleto de actina y gracias a la unión con la p120-catenina queda estabilizada su unión a la membrana celular previniendo su degradación mediante endocitosis (figura 14)¹³¹⁻¹³³.

Introducción

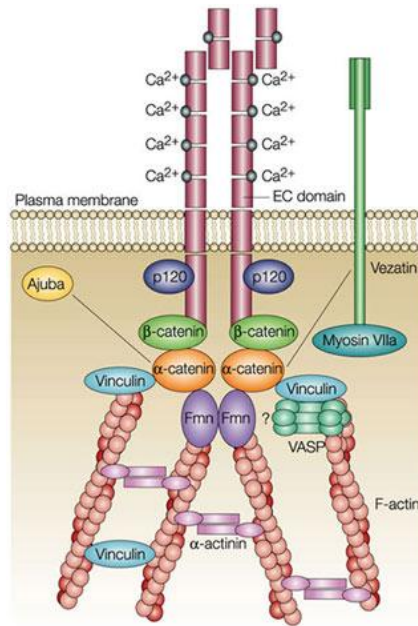


Figura 14: Complejo formado por la interacción de la proteína transmembrana E-cadherina, en la que se observan los dominios extracelulares (EC) cuya unión a Ca^{2+} permite su homodimerización, y la β -catenina que media la unión con la α -catenina y permite el reclutamiento de una gran cantidad de proteínas del citoesqueleto¹³⁴.

La estabilización del complejo cadherina-catenina y su unión con el esqueleto de actina forma un complejo esencial para la inhibición de la motilidad de las células epiteliales e interviene en la homeostasis de la arquitectura tisular^{135,136}.

Se ha observado una disminución o ausencia de expresión de la E-cadherina en diferentes tipos de tumores que se ha relacionado con la pérdida de cohesión intercelular. Este proceso precede a cambios de motilidad de las células tumorales, lo que facilita la progresión tumoral, la invasión y la metástasis y, por tanto, un peor pronóstico de la enfermedad¹³⁷. Es el caso del carcinoma de endometrio, pero más concretamente de los tipos seroso y de células claras^{138,139} aunque mecanismo no se conoce ya que las mutaciones somáticas en *CDH1* son poco frecuentes¹⁴⁰. Las pérdidas de heterocigosidad, más frecuentes en los carcinomas no endometrioides (57%) que en los endometrioides (22.5%)¹³⁹ y la hipermetilación de su promotor, habitual en ambos casos (21-40%), pueden estar relacionados con esta pérdida de expresión^{141,142}.

Sin embargo, son frecuentes las mutaciones somáticas en el gen *CTNNB1* en tumores de endometrio de tipo endometriode (45%)^{36,143}. Las mutaciones encontradas hasta el momento en tumores se localizan en el exón 3, son de tipo *missense* y modifican los residuos de Serina y Treonina claves en la regulación de su degradación. Las mutaciones producen una estabilización y acumulación de la β -catenina en el citoplasma con su consecuente traslocación al núcleo celular, facilitándose así la sobreexpresión génica y un aumento en la proliferación celular y el crecimiento de la célula^{121,122}. Parece ser que en el carcinoma de endometrio estas alteraciones se producen en etapas tempranas de la patogénesis del tumor, habiéndose

observado en el componente escamoso de hiperplasias con atipia y en las neoplasias endometriales intraepiteliales^{144,145}.

3.1.4 OTROS GENES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS TUMORES DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

3.1.4.1 *TP53*

TP53 es un gen supresor de tumores que codifica una proteína con un gran potencial inhibidor del crecimiento celular y cuya pérdida de expresión y función supone un paso importante en el proceso de transformación tumoral.

El gen *TP53* mide aproximadamente 20 kb y se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13). Está compuesto por 11 exones de los cuales el primero no es codificante y se ubica a 8-10 kb del exón 2¹⁴⁶.

La proteína p53, altamente conservada en la evolución, consta de 393 aminoácidos presentando diferentes dominios con actividad funcional. En el extremo amino terminal residen un dominio de actividad transcripcional y un dominio SH3¹⁴⁷. Este dominio de transactivación interactúa con factores de transcripción, acetiltransferasas y la proteína MDM2, que regula su concentración celular¹⁴⁸. Por otra parte, el dominio SH3 es esencial para la unión de p53 con SIN3 que la protege de la degradación¹⁴⁹; la parte central de la proteína está compuesta principalmente por el dominio de unión a DNA y en el extremo carboxilo terminal se sitúan secuencias de localización y exportación nuclear (NLS y NES), un dominio de regulación y un dominio de tetramerización¹⁴⁸.

Existen 5 regiones en la proteína altamente conservadas numeradas del I al V: 12-23, 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286. Cuatro de ellas se encuentran contenidas en el dominio central (del II al V) y la restante (I) en el dominio N-terminal. Estas zonas son cruciales para que la proteína p53 lleve a cabo sus funciones y suelen coincidir con los llamados “puntos calientes” que son los residuos donde se han descrito la mayoría de las mutaciones en *TP53* (figura 15)^{150,151}.

Introducción

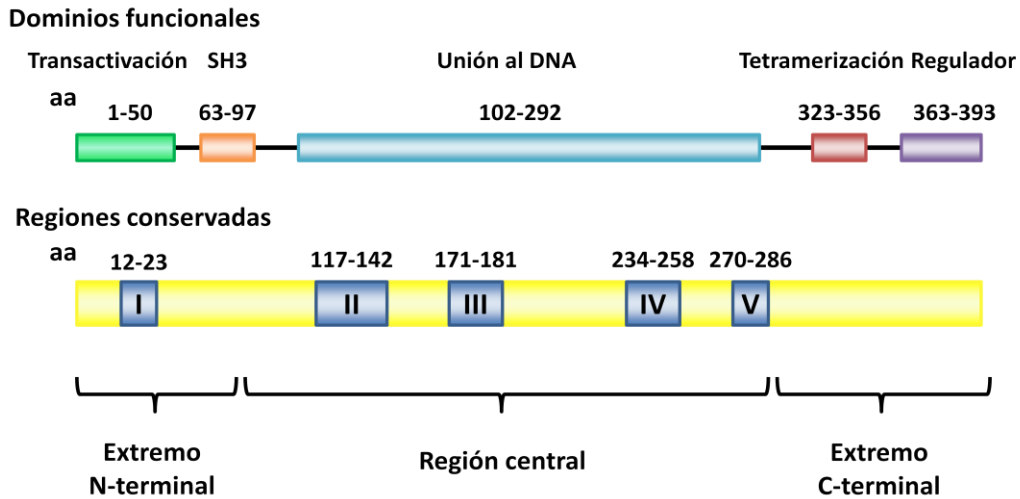


Figura 15: Esquema representativo de la proteína p53 en el que se observa en la parte superior la proteína y sus distintos dominios funcionales, y en la parte inferior las 5 regiones conservadas que la conforman.

P53 es una proteína extremadamente inestable y de vida media corta cuya expresión es normalmente constitutiva y ubicua. Sus niveles en la célula son claves para su actividad y se encuentran estrictamente controlados por diferentes mecanismos, siendo los más importantes la interacción con quinasas, acetiltransferasas, chaperonas moleculares y antagonistas como MDM2¹⁵². Si esto no ocurriese, p53 estaría constantemente activada y se produciría un bloqueo permanente del ciclo celular que desembocaría en un proceso de apoptosis¹⁵³.

En condiciones celulares normales, la ubiquitín ligasa E3 MDM2 es la proteína encargada del proceso de proteólisis de p53 interaccionando con el dominio de transactivación e inhibiendo su actividad transcripcional¹⁵⁴. Además, MDM2 también promueve la exportación nuclear de p53 mediante la ubiquitinación de residuos de lisina del extremo carboxiterminal, marcándola para su degradación en el proteosoma, controlando así sus niveles y permitiendo la progresión del ciclo celular¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. A su vez, p53 estimula la transcripción y la traducción de MDM2, cerrando un bucle de regulación negativa que permite de nuevo el aumento de los niveles de p53¹⁵⁸. En ausencia de MDM2, la célula eucariota posee otras ubiquitín ligasas E3 activadas también por p53¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Los daños directos en el DNA, la proliferación celular incontrolada debida a una activación oncogénica, la erosión de telómeros, la hipoxia o la carencia de nucleótidos son algunos de los muchos factores que pueden provocar una activación y acumulación de p53 en la célula^{162,163}. La finalidad es que la proteína active o reprima ciertos genes cuyos productos lleven a la célula a un estado de senescencia o apoptosis, proceso que conlleva la interacción de p53 con otras proteínas y la participación de modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la acetilación, que evitan su ubiquitinación gracias a la interrupción de su interacción con MDM2, activándola y estabilizándola evitando su degradación por el proteosoma, lo que favorece su acumulación en el núcleo en forma de homotetrámeros¹⁶⁴. Es entonces cuando p53 se une a secuencias específicas del DNA y activa la transcripción de genes (figura 16).

Introducción

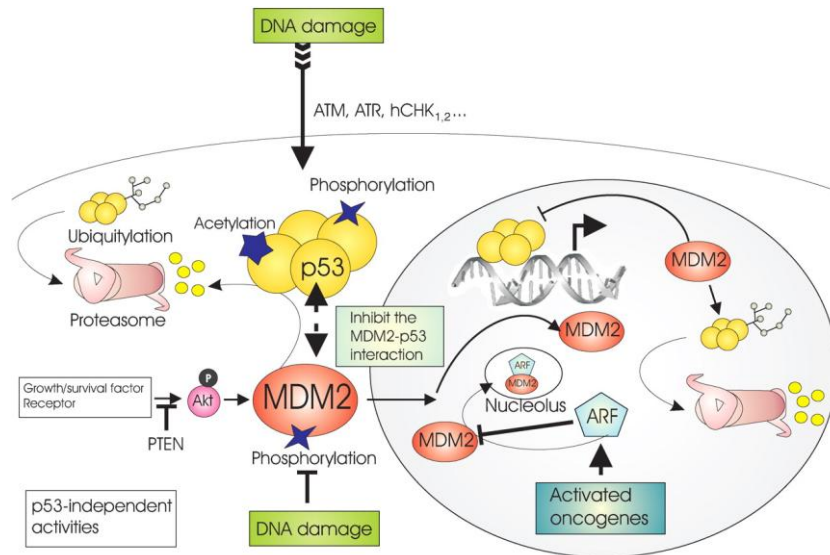


Figura 16: Regulación de los niveles de p53 celulares mediante interacción con MDM2 y modificaciones postraduccionales. En condiciones celulares normales los niveles de p53 son regulados por su interacción con MDM2 y viceversa. Cuando existe una situación de estrés celular que pueda causar daños en el DNA, p53 es modificada postraduccionalmente para evitar su degradación por el proteosoma, al contrario que MDM2, el cual es fosforilado y marcado para su degradación con el fin de que p53 se trasloque al núcleo y active la transcripción de diferentes genes necesarios para que la célula responda ante esa situación desfavorable¹⁶⁵.

Los principales procesos en los que actúa p53 son los siguientes:

- Inducción de parada del ciclo celular: p53 actúa como un regulador en los puntos de control (*checkpoints*) que existen a lo largo del ciclo celular con el fin de prevenir la replicación de su DNA y la mitosis cuando las condiciones no son favorables para la célula o existe daño en el material genético. En la fase G1 del ciclo celular dirige la parada (normalmente transitoria) y permite la reparación del DNA en caso de estar dañado. Esto lo lleva a cabo promoviendo la expresión de la proteína p21, inhibidora de las CDKs que se asocian a ciclinas y regulan el ciclo celular^{166,167}. De esta forma evita la fosforilación por diversas CDKs de la proteína RB reprimiendo la transición a la fase S y, por tanto, la proliferación celular^{168,169}. Además, también participa en la parada del ciclo celular en la transición G2/M transactivando la expresión de genes diana que secuestran el complejo B1-CDK fuera del núcleo e inhiben la actividad de la ciclina B1, manteniendo el bloqueo en G2¹⁷⁰.
- Inducción de apoptosis: la muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo importante y necesario para que las células no proliferen de forma indefinida. p53 participa en ella activándola a través de mecanismos indirectos mediante la regulación de la transcripción de genes implicados y directos e independientes de su actividad transcripcional a través de la interacción directa con proteínas implicadas en apoptosis en la mitocondria^{171,172}. Existen dos vías de inducción de apoptosis y en ambas participa p53. En la vía extrínseca activa receptores celulares específicos en respuesta a señales de muerte, promueve la translocación del receptor Fas desde el aparato de Golgi a la membrana celular e induce la expresión de la proteína IGFBP3 que reprime la activación del receptor IGFR1 bloqueando señales de supervivencia^{173,174}. En la vía intrínseca o mitocondrial, que se activa como

respuesta a señales de estrés, p53 interacciona directamente con proteínas antiapoptóticas y apoptóticas de la familia de los reguladores apoptóticos BCL¹⁷⁵. Para ello, MDM2 monoubiquitina a p53 y la trasloca a la mitocondria, donde es desubiquitinada y activada¹⁷⁶ antagonizando la actividad de proteínas antiapoptóticas y liberando proteínas apoptóticas lo que desencadena una cascada de eventos que activa las caspasas y la muerte celular mediante liberación de potentes activadores apoptóticos al citoplasma^{177,178}.

- Mantenimiento de la estabilidad genómica: Además de participar en la parada del ciclo celular en caso de existir daño en el DNA o en ausencia de condiciones favorables, p53 interviene en el proceso de reparación del DNA previniendo la inestabilidad genómica. Los mecanismos por los que actúa no son del todo conocidos pero implican la inducción de genes que regulan la reparación por escisión de nucleótidos del DNA y la recombinación y segregación cromosómica¹⁷⁹. Es el caso de la ribonucleótido reductasa P53R2, la cual es inducida por p53 en respuesta a daños en el DNA¹⁸⁰. La activación de p53 puede interferir en la transcripción de la enzima aumentando la incorporación errónea de dNTPs y la frecuencia de mutaciones lo que provoca inestabilidad genómica.
- Inhibición de la angiogénesis: la angiogénesis tumoral es una etapa limitante para la expansión de los tumores primarios y la formación de metástasis. La formación de microcapilares asociados al tumor es esencial para la aportación de nutrientes y oxígeno que permitan la supervivencia de células tumorales y la progresión del mismo. p53 estimula la expresión de genes que previenen este proceso como la trombospondina-1 (TSP-1). El proceso de angiogénesis puede asociarse con una pérdida de p53 germinal y por tanto una disminución de TSP-1 pero la activación y sobreexpresión de p53 da lugar a una inhibición de la angiogénesis¹⁸¹.

El gen *TP53* aparece mutado en la mayoría de los tumores, incluidos los carcinomas endometriales¹⁸². La proteína mutada no es funcional pero resiste a su degradación y se acumula en la célula secuestrando a su vez, mediante homotetradimerización, a la proteína que se produce a partir del alelo germinal¹⁸³.

TP53 es el gen más frecuentemente mutado en carcinoma de endometrio tipo seroso (53-90%)^{42,43,184-186} y parece que las mutaciones se producen en etapas tempranas de la génesis del tumor ya que la sobreexpresión de p53 en aparece en un 75% de las lesiones que los precede, pudiendo observarse en glándulas endometriales morfológicamente benignas o en el epitelio adyacente al carcinoma seroso, así como en carcinoma endometrial intraepitelial o en displasias glandulares endometriales^{43,187-189}. Sin embargo, en carcinoma de endometrio tipo 1 la incidencia de mutaciones en el gen *TP53* es mucho menor (12-23%)^{42,120,185,189-191} siendo superior en los de grado 3 en contraste con los de bajo grado (43% en grado 3, 8% en grado 2 y 0% en grado 1)⁴². Es poco común encontrar sobreexpresión de la proteína y mutaciones en el gen en hiperplasias atípicas precursoras de los carcinomas endometrioides, lo que sugiere que las alteraciones en *TP53* son un evento molecular tardío en el desarrollo de estos tumores²⁷.

Además, se ha visto que este pequeño porcentaje de alteraciones en el gen *TP53* en tumores de tipo 1 no coinciden con alteraciones en otros genes como *PTEN*, *KRAS*, *CTNNB1*⁴² y, sin embargo, sí coincide con una mayor frecuencia de aparición de MSI⁴⁴. En los carcinomas de células claras no se ha definido aún bien su porcentaje de mutabilidad pero algunos estudios lo sitúan alrededor del 9% de los tumores de este tipo¹⁹².

3.1.4.2 *CDKN2A*

El gen *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) se localiza en el cromosoma 9p21 y codifica una fosfoproteína nuclear de 16 kDa: p16^{INK4A}. Está formado por 3 exones y posee su propio promotor pero comparte los exones 2 y 3 con el gen *MTS2* que codifica la proteína p14^{ARF}¹⁹³.

p16^{INK4A} es una proteína supresora tumoral de 156 aminoácidos que pertenece al grupo de las proteínas inhibidoras (INK4A) de kinasas ciclina dependientes (CDK); concretamente se une a CDK4 y CDK6 inhibiendo la actividad catalítica del complejo CDK-ciclina D, un regulador del *checkpoint* en fase G1 del ciclo celular^{194,195}. En ausencia de p16^{INK4A} estas kinasas se unen a la ciclina D1 y fosforilan la proteína RB, inhibiéndola y permitiendo la transición de la fase G1 a la S y la proliferación celular (figura 17)¹⁹⁶.

Por otra parte, p14^{ARF}, aunque también parece interferir en el crecimiento tumoral, exhibe funciones diferentes de p16 a través de la estabilización de p53 mediante el secuestro y degradación de MDM2 en el nucleolo¹⁹⁷.

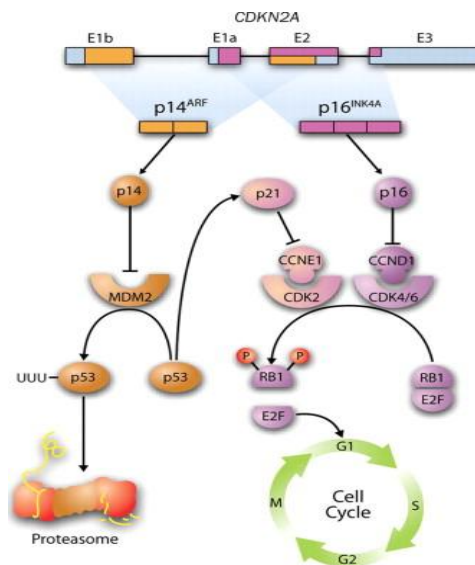


Figura 17: Esquema de las regiones exónicas comunes a los transcritos de las proteínas p16 y p14 y la participación de ambas en la regulación del ciclo celular, indirectamente a través de la inhibición de MDM2 en el caso de p14, y directamente a través de la inhibición del complejo CDK-Ciclina D en el de p16¹⁹⁸.

Se ha observado una disminución de la expresión de la proteína p16^{INK4A} en multitud de líneas celulares y procesos tumorales como consecuencia de diversos mecanismos

genéticos y epigenéticos tales como deleciones en homocigosis, mutaciones puntuales en la región codificante y silenciamiento por hipermetilación del promotor de *CDKN2A*¹⁹⁹⁻²⁰¹.

En los carcinomas de endometrio es frecuente la pérdida de expresión de p16 (20-70%) y es más frecuente en los carcinomas no endometrioides, concretamente en los de diferenciación escamosa, serosa y de células claras. Esta pérdida de expresión se debe fundamentalmente a mutaciones puntuales, deleciones homocigotas o hipermetilación del promotor de *CDKN2A*²⁰²⁻²⁰⁴. El porcentaje de mutaciones puntuales encontradas es bastante bajo (2-6%). Se han descrito deleciones homocigotas en un 2-8% de los casos y, por otra parte, la tasa de hipermetilación tampoco es mucho más elevada (4-5%), aunque algunos autores la han detectado hasta en un 20% y 37% de los casos estudiados. Su existencia parece estar asociada a carcinomas de endometrio más agresivos y con peor pronóstico. Por otra parte, estudios recientes han detectado, mediante inmunohistoquímica, la sobreexpresión de la proteína p16 asociada a tumores de endometrio tipo seroso papilar pero su origen aún no ha sido esclarecido^{27,30,50,202-207}.

3.1.4.3 *PPP2R1A*

El gen *PPP2R1A* (*protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha*) también denominado PR65a, codifica la isoforma α de la subunidad A de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), una de las 4 principales serin/treonin fosfatasas^{208,209}.

PP2A es un heterodímero formado por tres subunidades: la catalítica o subunidad C, de 36 kDa, la *scaffolding* o subunidad A, de 65 kDa y 590 aminoácidos, y la unidad reguladora B, en contacto con las dos anteriores y de tamaño variable (figura 18).

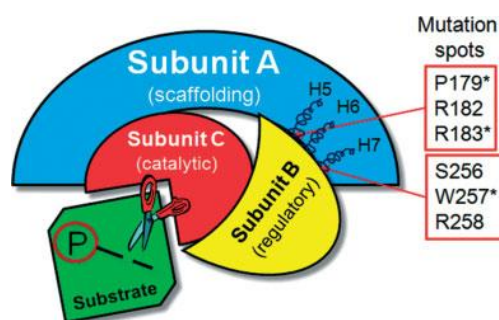


Figura 18: Representación del complejo PP2A en el que se observan las tres subunidades A, B y C y algunas de las mutaciones patogénicas descritas, y más frecuentes, localizadas en los HEATS 5, 6 y 7 situados en la zona de interacción entre la subunidad A y la B²¹⁰.

La subunidad A y C pueden presentar dos isoformas, una α y otra β , mientras que la subunidad B presenta al menos 12 posibles isoformas, lo que hace que el complejo adquiera una elevada variabilidad gracias a la combinación de las diferentes isoformas de cada subunidad²¹¹⁻²¹³.

La subunidad C media la actividad catalítica inactivando fosfoproteínas y participando por ello en multitud de rutas de señalización, mientras que la subunidad A proporciona la actividad estructural, controlando así el ensamblaje y estabilidad del complejo. Su isoforma α se expresa de forma ubicua en una cantidad 10-100 veces mayor que la subunidad β (PPP2R1B)²¹⁴. La proteína PPP2R1A presenta 15 repeticiones en tándem de motivos HEAT (Huntington-Elongation-A subunit-TOR)²¹⁵ constituyendo una hélice en forma de garfio que le proporciona un aspecto helicoidal (figura 19). Los motivos 11-15 forman puentes de hidrógeno con la subunidad C de PP2A mientras que los 2-7 lo hacen con la subunidad reguladora B^{209,216-218}.

Como anteriormente hemos comentado, el trímero PP2A actúa sobre una gran variedad de sustratos implicados en diferentes rutas que aparecen desreguladas en los procesos cancerosos tales como c-MYC, BCL2, ERBB2, AKT, MEK, WNT, p53 y RAF. Seguramente la heterogeneidad de la subunidad B, que es la reguladora y está menos conservada, sea la que le confiera la posibilidad de actuar sobre unas u otras moléculas en diferentes lugares de la célula²¹¹, lo que la convierte en un complejo implicado en diversidad de funciones entre las que se incluyen la regulación del ciclo celular, la mitosis, la reparación del DNA en respuesta a hipoxia e incluso en la transformación neoplásica asociada a virus²¹⁹⁻²²³.

El gen *PPP2R1A* se localiza en el cromosoma 19q13.41 y consta de 15 exones, todos ellos codificantes. Los exones 5 y 6 codifican los motivos HEATS 5, 6 y 7, y en los motivos H5 y H7 se han encontrado todas las mutaciones patogénicas descritas hasta el momento (figuras 18 y 19)²¹⁰. Cabe destacar que todas las mutaciones son *missense* en heterocigosis, lo cual resulta interesante ya que siendo un gen supresor tumoral, debería presentar al menos una mutación en homocigosis o más de una en heterocigosis o una pérdida de expresión que hiciese que PP2A perdiese su función. Existen varias hipótesis para explicar este hecho pero la más aceptada hasta el momento es la que sostiene que el alelo mutado de *PPP2R1A* ejerce un efecto dominante negativo sobre el alelo silvestre. El cambio de aminoácido alteraría la unión entre la subunidad A y la B, desestabilizaría el complejo y afectaría por tanto a la actividad fosfatasa, lo que provocaría un aumento del estado fosforilado de los sustratos que tendría como consecuencia el incremento de la actividad de determinadas proteínas desencadenando el proceso tumoral o facilitando su progresión²²⁴.

Introducción

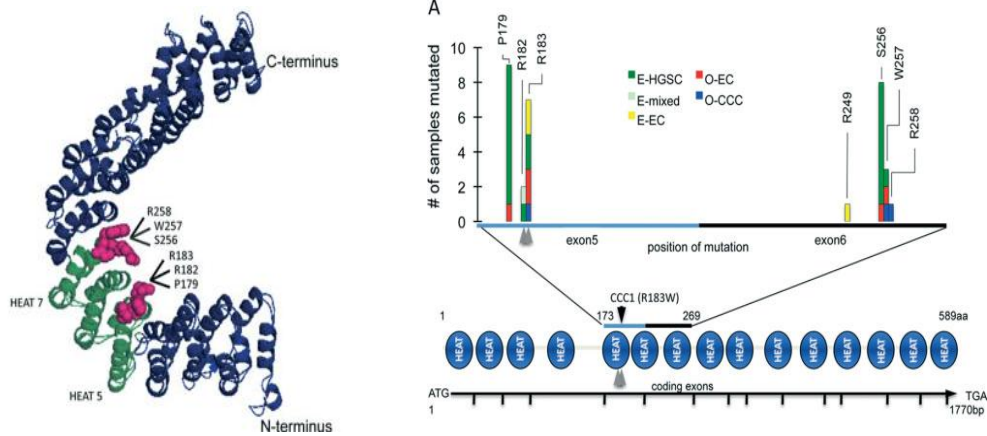


Figura 19: Izquierda: Imagen tridimensional de la proteína PPP2R1A, en la que se observa la forma helicoidal que adquiere debido a las 15 repeticiones en *tándem* (HEATs) que presenta (hélices en color azul oscuro) destacando las H5, H6 y H7 en color verde y los motivos en los que se han descrito algunas de las principales mutaciones patogénicas (color rosa). Derecha: representación linealizada de la proteína y la ubicación de cada uno de los 15 HEATs así como las mutaciones anteriores con su localización en los exones 5 y 6 del gen *PPP2R1A* y el tipo de tumor dónde se han descrito. E-HGSC: Carcinoma de endometrio seroso de alto grado; E-mixed: Carcinoma de endometrio tipo mixto; E-EC: adenocarcinoma endometrioide; O-CCC: Cáncer de ovario de células claras; O-EC: Cáncer de ovario endometrioide ⁵¹.

El porcentaje de mutaciones en el gen *PPP2R1A* en carcinoma endometrioide de bajo grado es del 6.9%, del 10.0% en carcinomas endometrioides de alto grado, del 43.2% en los de tipo seroso y del 21.4% en los carcinosarcomas⁵⁴. Se han detectado mutaciones también en otros tipos de tumores pero en muy baja frecuencia²²⁵ e incluso alteraciones en la isoforma β de la subunidad A, *PPP2R1B*, con una frecuencia del 15% en tumores primarios de pulmón, 6% en líneas celulares de cáncer de pulmón y en un 15% de tumores primarios de colon²²⁶.

3.1.4.4 EGFR

Uno de los primeros factores de crecimiento que se descubrió fue EGF (*epidermal growth factor*), que interviene en la estimulación de la proliferación y diferenciación celular^{227,228}. Más tarde, se observó que dicho factor interactuaba con un receptor de membrana, *epidermal growth factor receptor* (EGFR) y que desencadenaba una respuesta de activación celular²²⁹.

EGFR (ERBB1) es una proteína de 1186 aminoácidos, con un peso de 170 kDa que se expresa en la superficie de la mayoría de las células normales²³⁰. Es un receptor tipo tirosín-kinasa y está constituido por tres regiones: una extracelular de interacción con el ligando, una intracelular con actividad tirosín-kinasa y una transmembrana con una secuencia hidrofóbica con la que EGFR atraviesa la membrana una sola vez. En la región extracelular se pueden diferenciar 4 dominios, de los cuales el III es el responsable de la unión del ligando (figura 20). Además de EGF existen otras moléculas que se unen al receptor tales como TGF- α , AR, HB-EGF y BTC²³¹⁻²³⁴. En la región intracelular reside su

función reguladora, siendo la encargada de fosforilar residuos de tirosina de sustratos tales como PLC- γ , MAPK and GAP^{227,235,236}.

EGFR se ha encontrado alterado en diferentes tipos de tumor. Su sobreexpresión es frecuente en el carcinoma seroso de útero habiéndose detectado en algunos estudios en un 36%⁴⁹ y 56%⁹² de los casos analizados, siendo indicador de mal pronóstico y se relaciona con mutaciones en el dominio tirosín-kinasa (exones 18-21)²³⁷⁻²³⁹; sin embargo, tan sólo se han detectado mutaciones patogénicas en esa región en algunos tipos de tumor como el cáncer de pulmón *no-small cell* pero no en los uterinos serosos⁹².

Los inhibidores de tirosinas-kinasas parecen ser efectivos para tratar tumores portadores de mutaciones en los exones 18 a 21 de *EGFR*. Estos fármacos sólo actúan sobre la isoforma completa de EGFR (isoforma A) codificada por dos transcritos de 10.5kb y de 5.8kb²⁴⁰. Pero existen al menos otras tres, la B, la C y la D, que proceden de transcritos de 2.4kb, 1.8kb y 3.0kb respectivamente (figura 20) que dan lugar a proteínas más cortas que la isoforma A y con diferentes características que las hacen inmunes a la actividad de estos fármacos²⁴¹.

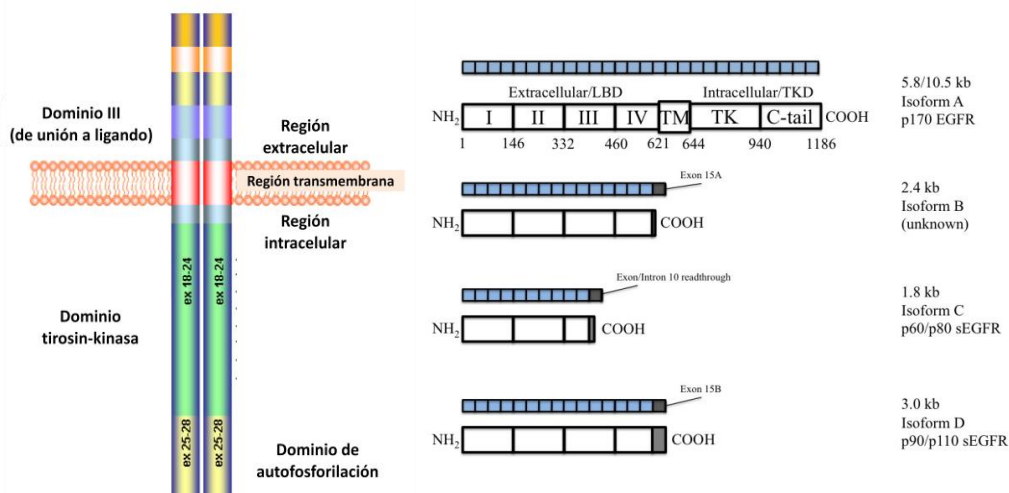


Figura 20: Derecha: Esquema de la proteína EGFR dimerizada en el que se muestra la localización de los tres dominios funcionales de la proteína y las regiones en las que se localizan. Izquierda: Representación de las cuatro isoformas de EGFR observando que la A es la más extensa y que está codificada por dos posibles transcritos de 5.8 y 10.5kb^{241,242}.

3.2 REPARACIÓN DEL DNA

La reparación del DNA se produce gracias a la actuación conjunta y coordinada de procesos que corrigen el daño al DNA producido por diversos factores. Su acción es muy importante porque una acumulación de mutaciones puede inducir a la célula a un estado de senescencia o apoptosis así como a la síntesis de proteínas aberrantes. Fallos en el sistema de reparación causan enfermedades y se asocian con envejecimiento. Existen diferentes tipos de mecanismos, dependiendo del tipo de error a corregir: reparación directa, reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos modificados, reparación del mal apareamiento de bases y reparación por recombinación de roturas de la doble cadena.

3.2.1 MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR)

El sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*) está compuesto por una serie de proteínas que forman complejos y cuya finalidad es corregir errores tipo emparejamiento base-base y bucles extrahélice formados por pequeñas inserciones y deleciones producidos durante la replicación del DNA. Es un proceso altamente conservado desde organismos sencillos como *Escherichia coli* hasta más complejos como los mamíferos.

En las regiones codificantes este mecanismo repara las mutaciones puntuales que dan lugar a mutaciones de tipo *missense*, mutaciones sin sentido o *nonsense* y mutaciones de cambio de fase de lectura o *frameshift* por la formación de estos bucles. En regiones no codificantes cobra importancia el papel reparador de errores ocurridos en secuencias repetidas como los microsatélites, produciendo incrementos o disminuciones en la longitud de una determinada hebra que no se puede emparejar correctamente²⁴³.

Se conocen al menos 7 genes implicados en el proceso: *hMLH1* (MutL homolog 1 of human), *hMSH2* (*MutS homolog 2 of human*), *hMSH6* (*MutS homolog 6 of human*), *hMLH3* (*MutL homolog 3 of human*), *hMSH3* (*MutS homolog 3 of human*), *hPMS1* (*posmeiotic segregation increased 1 of human*) y *hPMS2* (*posmeiotic segregation increased 2 of human*) cuyos productos proteicos actúan de forma coordinada formando heterodímeros homólogos a los existentes en las levaduras²⁴⁴.

En organismos procariotas el MMR se lleva a cabo mediante los complejos enzimáticos MutS, MutL y MutH; sin embargo, en organismos eucariotas sólo han sido identificadas proteínas homólogas a MutS y MutL. El complejo MutS α está formado por hMSH2 y hMSH6 y se encarga del reconocimiento de los cambios de base así como de los bucles formados por la inserción o deleción (IDLs) de una base tanto en la hebra molde como en la nueva.

MutS β (hMSH2 y hMSH3) puede también reconocer IDLs pero con una mayor afinidad por aquellos más complejos como inserciones de 2 a 4 bases. Los heterodímeros MutL son reclutados por los complejos MutS a la zona donde se ha producido el error. Están formados por hMLH1 dimerizado con hPMS2, dando lugar al complejo más grande de los MutL (MutL α) capaz de intervenir en la reparación tanto grandes como pequeños IDLs, con hPMS1 (MutL β) o con hMLH3 (MutL γ). Estos dos últimos tienen un papel menor y prácticamente desconocido en el MMR²⁴⁵.

El complejo MutL α media la interacción entre el complejo MutS y otras proteínas que también participan en el proceso de reparación como son PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), las ADN polimerasas δ y ϵ , las proteínas SSB y algunas exonucleasas y helicasas²⁴⁶. PCNA se une a los complejos actuando como enlace entre el heterodímero de MMR y la DNA polimerasa en la horquilla de replicación, facilitando el reconocimiento y reparación de la nueva cadena. RFC es un factor necesario para la unión de PCNA al DNA y EXOI/HEXI y FEN1 son exonucleasas que interactúan con hMSH2 dirigiendo la escisión de las secuencias erróneas. Finalmente, la síntesis de la nueva cadena parece ser consecuencia de la acción concertada de la DNA polimerasa δ , otras DNA polimerasas sensibles a afidicono y DNA ligasas que finalizan el proceso de reparación de MMR²⁴⁷.

El proceso se lleva a cabo en tres pasos principales: reconocimiento del error, ensamblaje de los complejos (dependiente de ATP) y degradación y síntesis de la nueva zona de la cadena reparada (figura 21).

Introducción

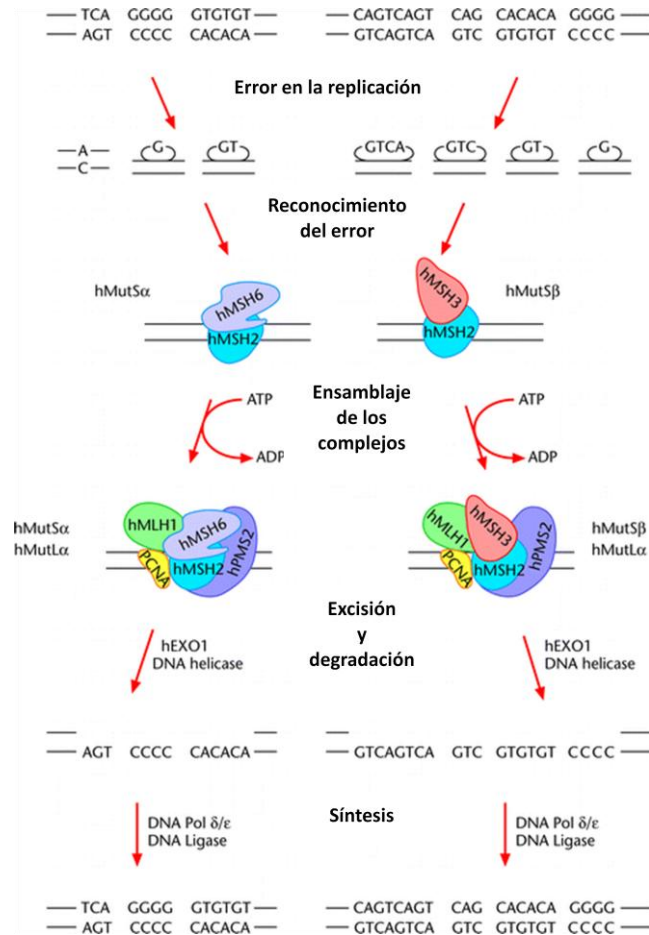


Figura 21: Mecanismos de corrección de emparejamientos erróneos a través de los complejos MutSα-MutLα y MutSβ-MutLα siguiendo tres pasos fundamentales: reconocimiento del error, ensamblaje de los complejos y degradación de la hebra errónea y síntesis de la nueva²⁴⁸.

Las mutaciones en el mecanismo MMR se relacionan principalmente con el cáncer colorrectal, cáncer de endometrio y cáncer de ovario asociados al Síndrome de Lynch. En el cáncer colorrectal los dos genes más frecuentemente mutados son *hMLH1* (60%) y *hMSH2* (35%)²⁴⁹ al contrario que en el carcinoma de endometrio asociado a Síndrome de Lynch, en el que el riesgo a desarrollarlo es de un 73%, 29% y 31% cuando existen mutaciones en los genes *hMSH6*, *hMSH2* y *hMLH1* respectivamente²⁵⁰. Curiosamente la aparición de mutaciones en *hMSH6* es menos frecuente en el caso del cáncer colorrectal y da lugar a un fenotipo mucho menos severo.

Recientemente se ha comprobado que el MMR también ejerce un papel importante en el procesamiento de errores en las bases producidos por daños al ADN tales como los producidos por O⁶-metilguaninas, 8-oxoguanina, cisplatino y la exposición al ultravioleta²⁵¹. Además de esto, las proteínas del MMR son multifuncionales y participan en los *checkpoints* en G₁ y G₂, en la respuesta apoptótica iniciada por daño al ADN y en la fidelidad del proceso de recombinación genética^{252,253}. Por tanto, un defecto en el sistema no sólo contribuye al desarrollo de tumores sino también al de otras enfermedades como consecuencia de la alteración de diferentes mecanismos biológicos.

3.2.2 INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Los microsatélites son secuencias cortas y repetitivas de entre 1 a 5 nucleótidos, altamente distribuidas en el genoma y más frecuentes en áreas conocidas como DNA basura o *Junk DNA*. Concretamente, se han encontrado entre 50.000 y 100.000 secuencias de este tipo en regiones no codificantes y sólo una pequeña cantidad en secuencias codificantes. En humanos, el microsatélite más común es una repetición del dinucleótido Adenina-Citosina (CA)_n que se distribuye en miles de sitios del genoma de la línea germinal²⁵⁴. Generalmente estas secuencias suelen ser muy polimorfas, componiéndose de varios alelos en los que sólo cambia el número de repeticiones entre ellos. Además, representan diferencias estables y heredables dentro de la población²⁴³.

Los microsatélites presentan una gran susceptibilidad a adquirir un alto índice de mutaciones espontáneas tipo inserción o delección de una de las unidades repetitivas. Este evento es lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (MSI)²⁴³.

La MSI se debe a errores en la replicación del DNA debido a un “resbalamiento” de la polimerasa que produce expansiones o contracciones de las secuencias que, en condiciones normales, son solventadas por el sistema MMR. El problema aparece cuando el sistema MMR no funciona adecuadamente y estas alteraciones no son corregidas²⁵⁵. Aunque la MSI no tiene un efecto carcinogénico porque la mayoría de los microsatélites se encuentran en áreas no codificantes del DNA, resulta ser un buen indicador del estado de estabilidad genética poniendo de manifiesto un error en la replicación y en el funcionamiento del sistema MMR que pudiera estar afectando a otras zonas importantes del genoma.

La MSI se describió por primera vez el Síndrome de Lynch (1993)²⁵⁶ pero afecta a una gran cantidad de tumores entre los que se encuentra el carcinoma endometrial. Para su determinación se pueden analizar diferentes grupos de microsatélites pero para estandarizar el estudio, el Instituto Nacional del Cáncer (U.S.A.) en 1997 recomendó el análisis en cáncer de colon de un panel de 5 marcadores que posteriormente ha sido adoptado para su análisis en otros tipos de cáncer. En él se incluían: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 y D17S250 (figura 22)²⁵⁷.

Su determinación fenotípica se basa en la categorización de la inestabilidad dependiendo del número de marcadores alterados al comparar DNA procedente de dos poblaciones celulares diferentes (por ejemplo, sangre y tejido tumoral):

- MSI de alto grado (MSI-H): cuando el 30% o más de los marcadores muestra MSI.
- MSI de bajo grado (MSI-L): cuando menos del 30% de los marcadores muestra MSI.
- Estabilidad de microsatélites (MSS): cuando ningún marcador muestra inestabilidad²⁵⁷.

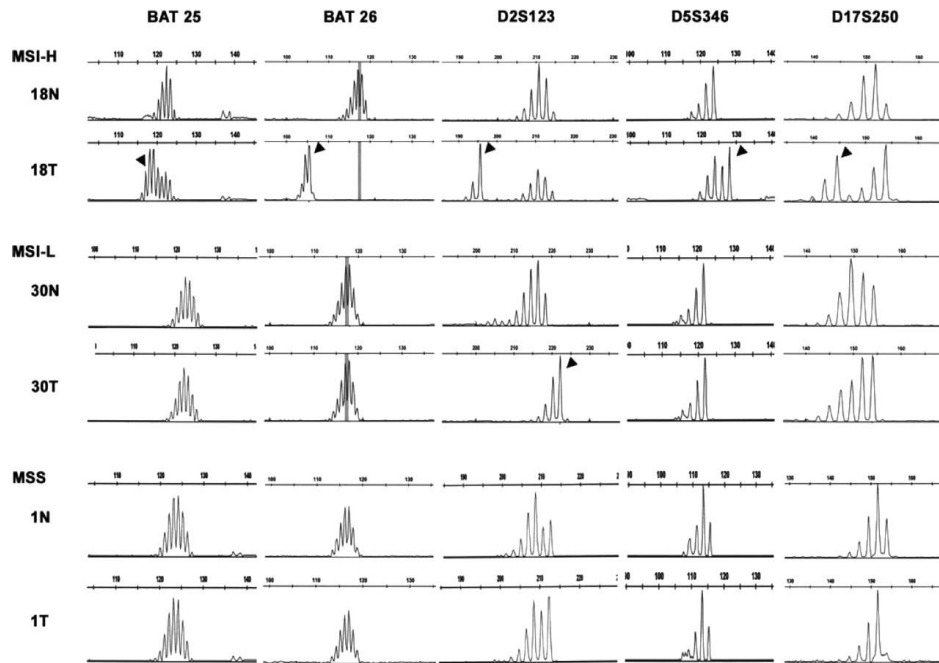


Figura 22: Electroferogramas de los 5 microsatélites recomendados por el Instituto Nacional del Cáncer (U.S.A.) en 1997 para el análisis de inestabilidad de microsatélites en Síndrome de Lynch. Se muestran un ejemplo de alta inestabilidad (MSI-H), baja inestabilidad (MSI-L) y estabilidad de microsatélites (MSS)²⁵⁸.

La MSI aparece en un 75% de los casos de carcinoma de endometrio cuando está asociado a Síndrome de Lynch²⁵⁹ y en un 20% de los tumores de endometrio esporádico^{38,260,261}, siendo más frecuente en los carcinomas endometrioides que en los no endometrioides. Sin embargo, la detección de mutaciones puntuales en genes reparadores del DNA es inferior a la esperada en relación a la aparición de MSI, lo que sugiere que pueden existir otros mecanismos implicados. En el caso de los tumores endometrioides, se ha observado un alto índice de hipermetilación en el promotor del gen *hMLH1* que podría actuar como *second hit* y, por tanto, contribuiría a la inactivación de la expresión de la proteína y, en último término, al “fenotipo mutador”²⁶²⁻²⁶⁶. Este proceso ocurre durante la progresión del tumor, apareciendo en un 3% de las hiperplasias endometriales complejas y en un 33% de las hiperplasias atípicas²⁶³. En la mayoría de los casos, las pérdidas de expresión de *hMLH1* se correlacionan con pérdidas de expresión de proteína *hPMS2*, consecuencia de la degradación masiva de esta al no poder formar el complejo MutLa con *hMLH1*. Por el contrario, la detección de expresión de proteína *hMLH1* en ausencia de expresión de *hPMS2* sugiere mutaciones en el gen *hMLH1* de tipo *missense*, donde la proteína está presente pero inactiva^{257,267}.

Otra pequeña fracción de tumores endometrioides con MSI presenta mutaciones o pérdidas de expresión de la proteína *hMSH2*²⁶⁸. También se han descritos mutaciones somáticas en los genes *hMSH3* y *hMSH6*²⁶⁹ pero pudiera tratarse tanto de una causa como de una consecuencia de la MSI al poseer regiones de nucleótidos repetitivas en sus secuencias^{270,271}.

Por último, se ha observado que existen diferencias entre el perfil de expresión génica en etapas tempranas de tumores endometrioides dependiendo de la presencia o ausencia de MSI. Se sostienen dos posibles teorías para explicar este hecho: Que haya un efecto directo provocado por la estabilidad o inestabilidad, o que el estado global de metilación sea diferente en los MSI+ que en los MSI-. Esta última hipótesis podría tener sentido teniendo en cuenta que esa MSI podría ser provocada por la hipermetilación de *hMLH1*, entre otros genes²⁷².

3.3 FACTORES EPIGENÉTICOS: REMODELACIÓN DE LA CROMATINA

En las últimas décadas se ha confirmado el importante papel que desempeñan los cambios epigenéticos del DNA. Las modificaciones epigenéticas son independientes de la secuencia del DNA y varían la regulación transcripcional tanto de genes supresores de tumores como de oncogenes. Su actuación, independiente pero de manera coordinada, da lugar a la remodelación de la cromatina secundarios a mecanismos tales como la modificación covalente de las histonas, la remodelación de cromatina dependiente de ATP, la utilización de variantes histónicas y la metilación del DNA. Todo ello para que se produzcan una correcta regulación transcripcional, replicación y reparación de los daños del DNA²⁷³.

3.3.1 METILACIÓN

La metilación del DNA es una modificación covalente post-transcripcional que consiste en la adición de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la posición 5' de un nucleótido de Citosina adyacente a una Guanina (CpG). Como resultado se forma 5-metil-2'-deoxicitidina (5-mC) (figura 23). Las enzimas encargadas del proceso son las DNMTs (DNA metiltransferasas)²⁷⁴ y en mamíferos existen tres principales: DNMT1 que mantiene la metilación mediante el reconocimiento de metilación en cadena única después de la replicación y DNMTs 3a y 3b que metilan *de novo* sitios en el DNA previamente no metilados²⁷⁵.

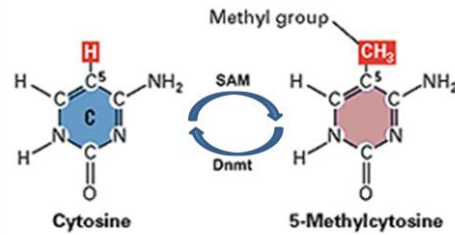


Figura 23: Proceso de metilación desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la posición 5' de un nucleótido de Citosina gracias a las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs) dando lugar a una 5'-metilcitosina.

Generalmente, el proceso de metilación se lleva a cabo en zonas ricas en nucleótidos CG situadas en la región 5'-UTR y primeros exones de los genes. Éstas son denominadas "islas CpG". Se cree que la represión de la transcripción es llevada a cabo a dos niveles diferentes: por una parte el grupo metilo inhibe la unión de moléculas reguladoras de la transcripción al sitio CpG y por otra, la zona metilada es reconocida por proteínas represoras de la transcripción que se unen a ella²⁷⁶.

En condiciones celulares normales la metilación silencia la transcripción de determinados genes²⁷⁷. La mayoría de las secuencias repetitivas del DNA y la heterocromatina suelen estar metiladas para evitar la transcripción²⁷⁸. Sin embargo, se ha observado que alrededor de un 10-20% de los genes presentan un patrón de metilación específico de tejido relacionado con los patrones de expresión de los genes específicos de tejido²⁷⁹⁻²⁸¹. En los tumores existe una elevada hipermetilación de las islas CpG a pesar de que el estado de metilación general disminuye en la célula tumoral²⁷⁴. Esta hipermetilación se produce principalmente en los genes supresores de tumores, genes relacionados con la reparación de DNA, genes relacionados con el control del ciclo celular, apoptosis, etc.^{282,283}. La hipometilación también puede contribuir al desarrollo tumoral cuando por ejemplo afecta a oncogenes o a los retrotransposones. En el primer caso, el gen vería aumentada su transcripción²⁸⁴ y el segundo podría desembocar en una traslocación de dichos elementos que aumentaría la inestabilidad genómica²⁸⁵.

Introducción

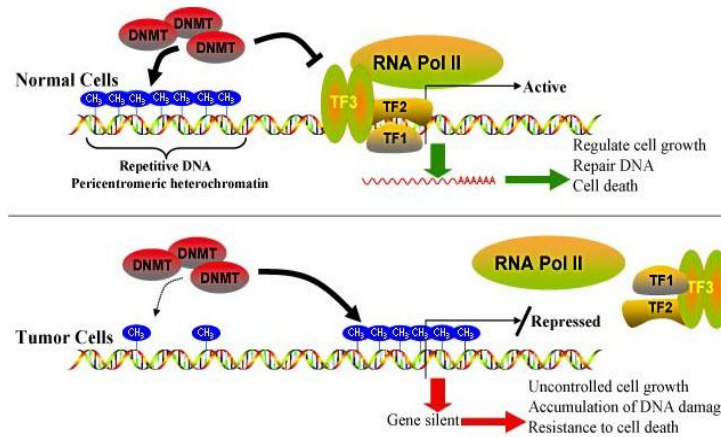


Figura 24: Proceso de metilación de promotores en células normales y células cancerosas. En el segundo caso se observa cómo la hipermetilación del promotor de genes supresores de tumores, genes relacionados con la reparación de DNA, con el control del ciclo celular, con la apoptosis, etc. produce la inactivación de la transcripción que da lugar a un proceso de crecimiento incontrolado, resistencia a la muerte celular y acumulación de errores en el DNA que desemboca en un proceso tumoral.

En carcinoma de endometrio se ha observado hipermetilación principalmente en genes implicados en el proceso de reparación del DNA como *hMLH1*, teniendo siempre en cuenta que actuaría como *second hit*^{136,147-150}. La O(6)-metilguanina-DNA metiltransferasa (*MGMT*) es otro gen reparador susceptible de ser metilado en un 48% de los carcinomas de endometrio²⁸⁶.

PTEN aparece mutado en un elevado porcentaje de carcinomas de endometrio pero cuando esto se acompaña de MSI es común observar una pérdida de expresión de la proteína. Este hecho se debe a la metilación de su promotor que actúa como mecanismo adicional en aproximadamente un 20% de los tumores de endometrio, sin tener claro si se trata de una causa o consecuencia del proceso tumoral²⁸⁷.

El gen *APC* también aparece frecuentemente hipermetilado en el carcinoma de endometrio. Su proteína se encarga de regular a la β -catenina en la ruta de señalización de Wnt. La metilación del clúster *APC*, *PTEN* y *hMLH1* se ha descrito en determinados tipos de carcinoma de endometrio, principalmente en los endometrioides, acompañado también de metilación en *MGMT*²⁸⁸, como un fenómeno CIMP (fenotipo metilador de islas CpG), característica también observada en otros tipos de tumor^{289,290}.

A pesar de que *PTEN*, *hMLH1*, *MGMT* y *APC* son los genes con un mayor grado de hipermetilación en carcinoma de endometrio y en concreto los dos primeros en los casos esporádicos, se ha descrito hipermetilación en los promotores de otros genes relacionados con estos tumores como son *CDH1*^{141,142} y *CDKN2A*²⁹¹.

Se ha propuesto que los estadios iniciales de transformación tumoral podrían estar relacionados con el grado de hipermetilación de los promotores, de tal forma que las lesiones premalignas pudieran tener promotores parcialmente metilados o un bajo número de genes metilados, mientras que las lesiones malignas presentarían un estado de

metilación superior al igual que el número de genes mutados que, además, iría en aumento según aumentase el grado del tumor²⁹².

3.3.2 MODIFICACIÓN COVALENTE DE HISTONAS

Las histonas son un conjunto de proteínas encargadas del empaquetamiento del DNA y del mantenimiento de la estructura de la cromatina. Se encuentran formando octámeros alrededor de los cuales se enrollan aproximadamente 146 pb de DNA. Cada octámero consiste en dos grupos de 4 histonas: H2A, H2B, H3 y H4 que forman un nucleosoma. Entre nucleosoma y nucleosoma existe un DNA espaciador que forma bucles y al cual se une otra histona, la H1, que estabiliza la estructura.

Los extremos N-terminales de las histonas constan de aproximadamente 20-30 aminoácidos y su carga es positiva gracias a su riqueza en Lisinas. Estos extremos se encuentran sujetos a modificaciones postranscripcionales como la acetilación de residuos de Lisina, la metilación de Lisinas y Argininas, la fosforilación, ubiquitinación, sumiolación, ADP-ribosilación, deiminación e isomerización de Prolinas^{293,294}. La mayoría de estas modificaciones covalentes neutraliza la carga positiva de los residuos y desestabiliza la estructura del nucleosoma, lo que permite que las hebras de DNA se desenrollen parcialmente y los factores de transcripción puedan acceder modificando los patrones de la expresión génica. Por el contrario, la cromatina transcripcionalmente silenciada está compuesta de nucleosomas en los cuales estas colas han sufrido bajos niveles de modificaciones post-traduccionales, de tal forma que conservan su carga y con ello su alta afinidad por la hebra de DNA²⁹⁵.

Todas estas modificaciones postranscripcionales son reversibles y pueden cambiar en cuestión de minutos, dotando así de un gran dinamismo a la cromatina. De todas ellas, la mejor caracterizada es la acetilación y desacetilación de lisinas que conlleva una activación y silenciamiento de la transcripción del DNA respectivamente²⁹⁶.

Las proteínas encargadas de llevar a cabo este proceso son las enzimas nucleares histonas acetilasas (HATs) y las histonas desacetilasas (HDACs)²⁹⁷. Las HATs EP300 y CREBBP actúan sobre residuos de lisina de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 mientras que PCAF sólo acetila a la H3. Las HDACs se dividen en tres grupos basados en su homología con las HDACs de levadura. Las clase I, homólogas de Rpd3 de levadura, son: HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8. Las clase II, homólogas de Hda1, son: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7A, HDAC9, HDAC10 y HDAC11. La clase III comparte homología con Sir2 y contiene 7 miembros: SIRT1-7²⁹⁸. Las HDAC clase I son mayoritariamente nucleares, altamente ubicuas y su secuencia consta de entre 350 y 500 aminoácidos. Las HDAC de la clase II tienen más de 1000 aminoácidos, se localizan principalmente en el citoplasma y son

más específicas de tejido, actuando en la diferenciación de células cardíacas y de músculo esquelético estriado. Las HDAC clase III son NAD⁺ dependientes y pueden estar implicadas en otras funciones como la ubiquitinación²⁹⁹.

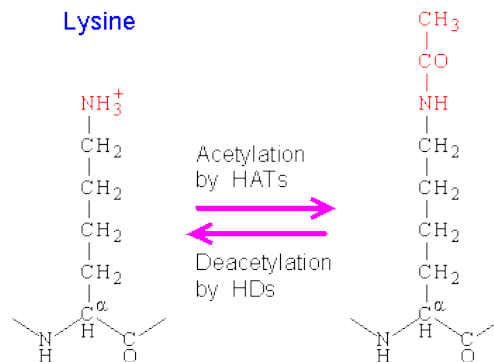


Figura 25: Proceso de acetilación y desacetilación de un grupo Lisina gracias a las histonas acetilasas (HATs) e histonas desacetilasas (HDACs) respectivamente.

Tanto las HATs como las HDACs son moduladores no específicos de histonas pudiendo modificar otras proteínas como p53, β -catenina, GATA y HMGI(Y)^{300,301}. Se ha descrito el importante papel que juegan ambos tipos de enzimas en el desarrollo del cáncer. En concreto, se presta especial interés a las HDACs de la clase I y principalmente a las HDAC1 y HDAC2. Ambas destacan por una elevada ubicuidad en su expresión y una localización nuclear que les permite formar parte de complejos multiproteicos que actúan en la represión transcripcional, participando en la regulación del ciclo celular y en la diferenciación y desarrollo^{302,303}. HDAC3 se localiza tanto en el núcleo, en el citoplasma, como en la membrana celular^{304,305}.

Se ha descrito una sobreexpresión de HDAC1 en cáncer gástrico³⁰⁶ y un papel modulador en la progresión del cáncer de mama³⁰⁷. Así mismo, se ha observado que HDAC2 aparece también sobreexpresada en el cáncer colorrectal^{308,309}. En el cáncer de ovario es frecuente un aumento de la expresión HDAC1, 2 y 3 en aproximadamente un 61%, 93% y 84% respectivamente. Además, HDAC1 presentan un patrón de sobreexpresión diferente según los subgrupos histológicos mucinoso (71%), seroso (64%), células claras (54%) y endometriode (36%)^{310,311}.

En el endometrio, la expresión de las HDAC1, 2 y 3 varía con el ciclo celular pero no parece que con el menstrual. Las tres isoformas muestran una expresión constitutiva de su mRNA durante el ciclo menstrual al igual que las HATs EP300. Sin embargo la expresión de las proteínas parece ser diferencial entre individuos en el caso de las HDAC1 y algo más elevada durante la fase de secreción en el de las HDAC2³¹².

La mayoría de los carcinomas de endometrio muestran una expresión elevada de éstas tres isoformas en el núcleo celular: HDAC2 en un 95%, HDAC3 en un 83% y HDAC1 en un 61%³¹¹. Por otro lado, también se ha descrito una pérdida de expresión de HDAC1 relacionada con un peor pronóstico del cáncer y una disminución de la supervivencia de

las pacientes³¹². De forma parecida a lo que ocurre en el cáncer de ovario, los subtipos seroso y células claras presentan ratios de expresión más elevados que los endometrioides³¹¹. Además, una elevada expresión de HDAC1 se asocia a un peor pronóstico de los carcinomas endometrioides, hecho que no se ha observado en el resto de isoformas³¹¹⁻³¹³.

Algunos estudios recientes han demostrado la existencia de una fuerte relación entre la expresión de las HDAC1 y 2 y las hormonas esteroideas; parece ser que dichas desacetilasas interactúan con proteínas que han sido reclutadas por los complejos receptores de hormonas esteroideas después de llevarse a cabo la unión del ligando^{314,315}. Los tratamientos con hormonas esteroideas provocan una sobrerregulación de ambas HDACs en el estroma de células del endometrio. Además, se ha observado que el tratamiento con progesterona produce un aumento en la expresión de HDAC1 mientras que la expresión de HDAC2 se ve incrementada cuando se trata tanto con estrógenos como con progesterona³¹⁶.

Por último, hay que destacar que existen evidencias de que el proceso de acetilación-desacetilación pudiera estar asociado a la maquinaria de metilación de la célula ya que los DNMTs pueden reclutar complejos que contengan HDACs y actuar sobre ellas²⁹⁶. Por ejemplo, la dimetilación de la histona H3 en su lisina 9 (H3K9me2) y la trimetilación en su lisina 27 (H3K27me3) están fuertemente asociadas al silenciamiento génico³¹⁷. Este hecho también ha sido corroborado por otros autores que han observado una actividad coordinada entre la acetilación de histonas y la desmetilación con la finalidad de que el DNA quede relajado y susceptible ser transcrito (figura 26)^{318,319}.

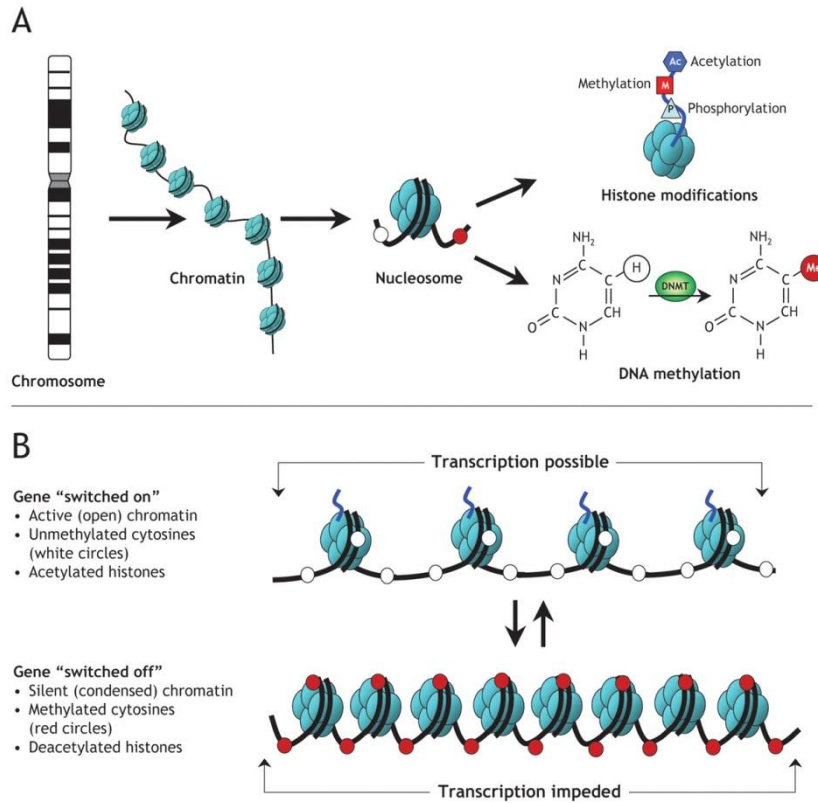


Figura 26: (A) Esquema de las modificaciones epigenéticas. Por una parte las histonas que forman octámeros sobre los que se enrolla la cromatina, están sometidas a modificaciones en múltiples sitios tales como acetilación, metilación y fosforilación. Por otra el DNA también puede ser metilado gracias a la actuación de las DNA metiltransferasas (DNMTs). Todas estas modificaciones actúan de manera conjunta y coordinada y regulan la organización y expresión de la cromatina. **(B) Esquema de las modificaciones reversibles que se producen en la organización de la cromatina las cuales determinan la expresión de los genes:** cuando la cromatina está abierta, los genes se expresan (*switched on*) y cuando se encuentra condensada, los genes quedan silenciados (*switched off*). Círculos blancos: Citosinas no metiladas. Círculos rojos: Citosinas metiladas³²⁰.

3.3.3 REMODELACIÓN DE LA CROMATINA DEPENDIENTE DE ATP

La remodelación de la cromatina dependiente de ATP es llevada a cabo por los complejos remodeladores formados por enzimas que utilizan energía del ATP para deshacer contactos DNA-nucleosomas, mover nucleosomas a lo largo del DNA y añadir o eliminar nucleosomas. De esta forma bloquean o favorecen el acceso de factores de transcripción a las secuencias que reconocen, evitando el ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción³²¹.

En los genomas eucariotas se ha comprobado que existe un patrón de colocación de los nucleosomas que dista mucho de ser al azar. En este patrón destacan regiones libres de nucleosomas (NFR) en los extremos 5' a 3' de los genes, que son usados para el ensamblaje y desensamblaje de la maquinaria de transcripción, mientras que las regiones codificantes internas de los genes parece que se colocan aleatoriamente. La pérdida de un nucleosoma anterior a un promotor está directamente relacionada con la activación del gen, mientras que la

ocupación de un nucleosoma en uno de estos lugares implica la represión de la transcripción³²².

Mutaciones o pérdidas de expresión en las enzimas que forman los complejos remodeladores de la cromatina desembocan con frecuencia en un proceso de tumorigénesis o apoptosis debido a la desregulación del ciclo celular³²³. Estos complejos se encuentran altamente conservados desde levaduras hasta humanos y presentan homología con la familia de las DNA traslocasas SNF2 (sucrose non-fermenting 2) de levaduras, conteniendo todas ellos una subunidad ATPasa³²⁴.

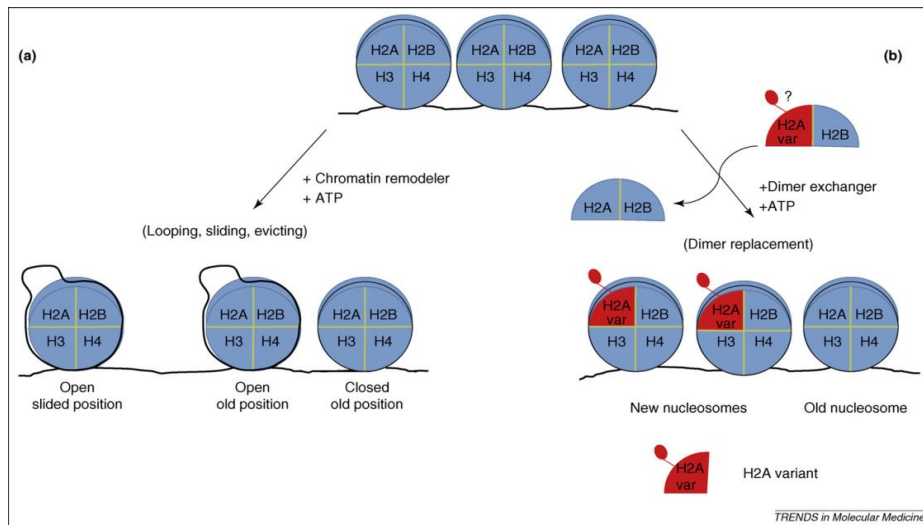


Figura 27: Ilustración de los dos principales mecanismos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP. (A) Cambios estructurales nucleosomales que implican la disociación de los contactos DNA-histona (*looping*), traslocación de los nucleosomas a lo largo del DNA (*sliding*) y eliminación de nucleosomas (*evicting*). Estos cambios dan lugar a una cromatina más abierta y expuesta y por tanto a una activación de la transcripción génica. (B) Mecanismo de cambio de subunidades nucleosomales por variantes post-transcripcionalmente modificadas que producen cambios en el empaquetamiento del DNA alrededor de los octámeros de histonas³²⁵.

Basándose en los distintos dominios estructurales, han sido descritas 4 familias de ATPasas remodeladoras de cromatina en mamíferos: SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi-2/CDH e INO80. Además de desempeñar un papel importante en la regulación transcripcional, estos complejos desarrollan diversas funciones en otros procesos celulares. Por ejemplo, la familia ISWI juega un papel fundamental en el ensamblado de la cromatina después de la replicación del DNA y en el mantenimiento ordenado de las estructuras de cromatina. Las familias INO80 y SWI/SNF participan en la reparación de errores de doble cadena del DNA (DSB) y de escisión de nucleótidos (NER). Por último, MBD3 es un componente del complejo NuRD/Mi-2/CDH necesario para el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre embrionarias³²⁵.

Todo ello hace que dichos complejos, y las proteínas que los forman, jueguen un papel biológico de elevada importancia requiriendo un correcto funcionamiento y la ausencia de factores que puedan alterarlos.

3.3.3.1 ARID1A

El gen *ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A*) se localiza en la región cromosómica 1p35.5 y codifica una proteína nuclear envuelta en la remodelación de la cromatina, BAF250a, que forma parte del complejo SWI/SNF cuya función principal es la remodelación de la cromatina dependiente de ATP ya que moviliza a los nucleosomas y actúa como regulador de la expresión y la dinámica de la cromatina. La proteína BAF250a interacciona con diferentes proteínas incluyendo BRG o BRM las cuales tienen una actividad ATPasa y, por tanto, forman la parte catalítica del complejo³²⁶.

BAF250a se compone de 2285 aminoácidos y posee un peso molecular de 242 kDa aproximadamente, constando de al menos dos dominios conservados muy importantes para su función. Por un lado, el dominio de unión al DNA (aminoácidos del 1017 al 1180) que le permite unirse a secuencias del DNA ricas en AT. Por otra parte, el dominio C-terminal, que es capaz de activar la actividad transcripcional dependiente de receptor de glucocorticoides. Los motivos NLS (residuos 1651 a 1657) y NES (residuos 2004 a 2021) permiten a la proteína localizarse en una zona u otra de la célula para llevar a cabo su función (figura 28)³²⁷.

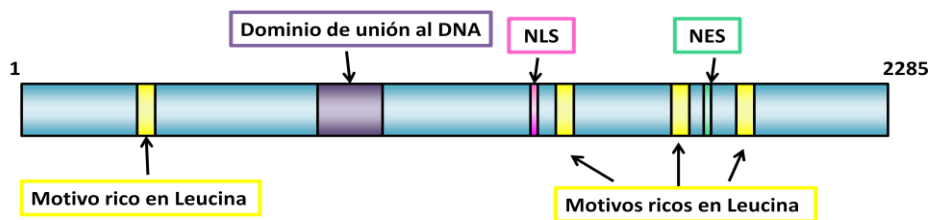


Figura 28: Esquema de la proteína BAF250a en el que se destacan los motivos ricos en Leucina, las señales de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) y el dominio de unión al DNA clave para que el complejo SWI/SNF pueda unirse a secuencias ricas en AT.

El complejo SWI/SNF podría considerarse un factor de regulación epigenético ya que juega un papel muy importante en el control de la expresión génica³²⁸, en la inhibición del crecimiento celular, en la diferenciación celular y, por tanto, en el desarrollo de los tejidos y en la supresión tumoral³²⁹⁻³³¹. BAF250a es esencial para la supresión de la síntesis de DNA y se piensa que su inactivación conlleva un aumento en la progresión celular vía c-myc contribuyendo a la proliferación celular descontrolada en células cancerosas. Sin embargo, son muchos los efectores sobre los que muestra influencia este complejo, como por ejemplo p53, cuya interacción permite regular la transcripción de moléculas importantes como CDKN1A (p21) y SMAD3 (figura 29).

Introducción

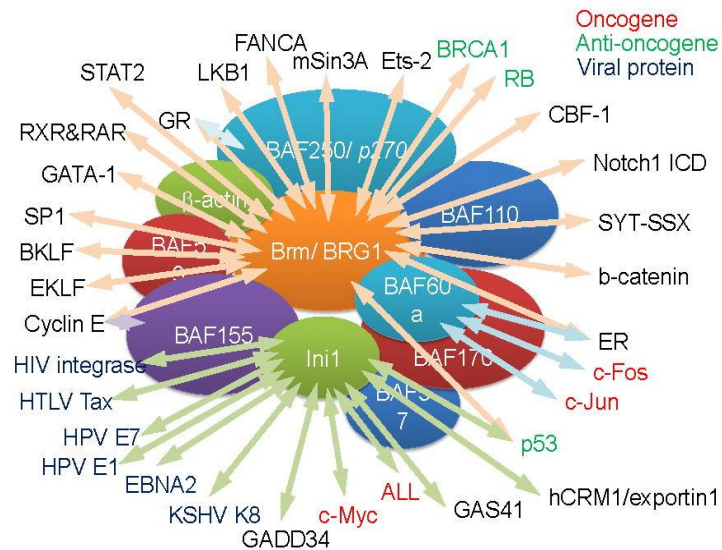


Figura 29: Representación de las interacciones que llevan a cabo algunos de los componentes del complejo SWI/SNF con múltiples moléculas implicadas en diferentes procesos celulares.

El gen *ARID1A* aparece mutado en una gran variedad de cánceres humanos destacando los carcinomas relacionados con el endometrio (carcinoma de células claras y endometrioides del ovario así como en los carcinomas endometrioides uterinos) y algunos subtipos de carcinoma gástrico, cáncer de colon, cáncer de páncreas e incluso cáncer de mama^{39,332-335}.

ARID1A consta de 20 exones, todos ellos codificantes, y las mutaciones encontradas hasta el momento se encuentran distribuidas por todo el gen, sin observar “puntos calientes” en los que se concentren. Estas mutaciones son en su mayoría tipo *nonsense*, *frameshift* e *inframe* y suelen ser causa de una pérdida de expresión de la proteína observable mediante inmunohistoquímica.

No está claro si las mutaciones en *ARID1A* se originan antes o después del inicio del tumor pero sí se ha observado que la inactivación del gen ocurre en estadios tempranos de la progresión tumoral, tanto en carcinomas de células claras como en endometrioides^{336,337}. Muchas de las mutaciones aparecen en zonas repetitivas en las que en una secuencia de varios nucleótidos iguales, se inserta o deletiona alguno de ellos. Es posible que, al igual que pasa en otros genes como *BAX* o *TGFβRII*, *ARID1A* se encuentre asociado a MSI y de ahí que este tipo de alteraciones resulten de un defecto en el sistema MMR^{332,338,339}.

En los tumores de endometrio *ARID1A* aparece principalmente mutado en los carcinomas endometrioides de bajo grado (40%)³⁹. En los subtipos seroso y de células claras se ha observado una pérdida de expresión de BAF250a en un 18% y 26% de los casos respectivamente sin detectarse mutaciones patogénicas que la originen³⁴⁰. Este acontecimiento se produce con frecuencia en otros tipos de tumores lo cual hizo que algunos grupos investigasen otros posibles orígenes encontrándose que en el cáncer de

páncreas existía una frecuente pérdida de número de copias del gen (47% de los casos)³⁴¹, mientras que en el cáncer de mama el promotor estaba hipermetilado en un 86.4% de los casos asociados con baja expresión de mRNA³⁴².

3.4 LOS TELÓMEROS

Los telómeros son regiones de DNA no codificante que consisten, en la mayoría de los organismos, en repeticiones en tándem de una secuencia corta de nucleótidos, variando el número de repeticiones de unos organismos a otros. Están situados en la parte final de los cromosomas eucariotas junto con sus proteínas asociadas. Juegan un papel muy importante en la integridad y estabilidad genómica y participan en el proceso de daño/replicación del DNA celular^{343,344}.

La longitud telomérica disminuye en cada ciclo de división celular, aunque la célula posea los mecanismos necesarios para completar su replicación. Si esto no ocurriera, la célula podría llegar a perder información genética importante o adquirir un estado de inmortalidad que produciría una proliferación celular desmesurada de la línea celular.

En la especie humana los telómeros están formados por repeticiones de 6 nucleótidos: T₂AG₃ a diferencia de las secuencias subtelo méricas, las cuales se ubican en zonas contiguas a los telómeros y se hallan formadas por repeticiones en tándem altamente polimórficas.

El DNA telomérico (tDNA) consiste en dos hebras desiguales. Su extremo 3' está enriquecido con Guaninas y Citosinas repartidas de forma asimétrica. Las Guaninas se acumulan en la hebra con orientación 5' → 3' denominada hebra G. Las Citosinas se acumulan en la hebra con orientación 3' → 5'. La hebra G no se encuentra apareada con la otra hebra en la parte extrema sino que forma un segmento monofibrilar, de longitud variable según las especies y que constituye el extremo 5' del cromosoma. El extremo monofibrilar adopta una estructura secundaria por apareamiento de las bases de Guanina (D-loop). El extremo telomérico forma un bucle hacia atrás y crea un dúplex de DNA con otra de las secuencias repetidas (T-loop) que desplaza al dúplex original del telómero. Esta estructura en forma de lazo se estabiliza gracias a la unión de proteínas específicas que se unen a los telómeros³⁴⁵. En el caso de las levaduras de fisión y de los humanos, la proteína que se une y protege el extremo de DNA de cadena sencilla de la hebra G es la α proteína POT1³⁴⁶.

Existen otras proteínas que se unen a lo largo de las repeticiones teloméricas dando lugar a un complejo ribonucleoproteico altamente ordenado³⁴⁷. Es el caso de TRF-1 y TRF-2, dos proteínas que se asocian mediante interacción directa con el DNA y cuya finalidad es la de ayudar a proteger el extremo telomérico³⁴⁸. A ellas se unen otras muchas formando así un complejo competidor de la telomerasa que impide el acceso de la enzima (figura 30).

Introducción

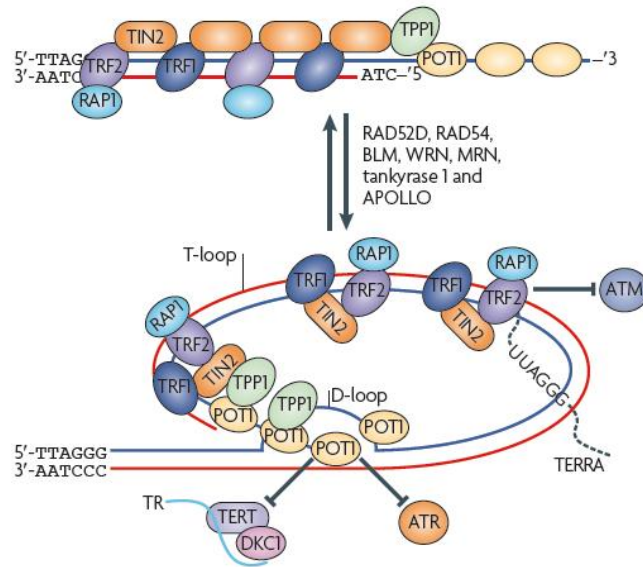


Figura 30: Extremo telomérico linealizado (parte superior) y formando el bucle (parte inferior) junto con sus proteínas asociadas³⁴⁹.

En las células somáticas que no poseen mecanismos de mantenimiento de la longitud telomérica en cada replicación, y consecuentemente cada división celular, se produce una pérdida de entre 100 y 200 pb de la secuencia telomérica. Esto es debido a la ausencia de polimerasas capaces de replicar la cadena de DNA completa ya que siempre queda en el extremo 5' el hueco correspondiente al fragmento de Okazaki. De esta forma, después de un número de divisiones determinado (entre 40 y 70) la longitud telomérica llega a ser crítica (2.5 kb) y se alcanza el punto de Hayflick. En ese momento el cromosoma pierde su protección y las células entran en estado de senescencia en el que, aun siendo metabólicamente activa y viable, no prolifera³⁵⁰. Se trata de un mecanismo irreversible que se acompaña de cambios morfológicos y de la expresión génica y que desemboca finalmente en la apoptosis celular, contribuyendo, por tanto, al envejecimiento del organismo³⁵¹.

En las células germinales³⁵² y tejidos en desarrollo³⁵³ existe un mecanismo de replicación de telómeros: la telomerasa. Se ha comprobado que también está presente en células endometriales³⁵⁴, en la capa basal de la epidermis³⁵⁵ y en el sistema hematopoyético³⁵⁶. En ciertas células del organismo el mecanismo de la telomerasa puede ser inducido durante determinadas etapas de la vida, como ocurre durante la activación de los linfocitos T³⁵⁷ y B³⁵⁸.

En las células que poseen telomerasa, el DNA telomérico permanece en un estado de dinamismo debido a sus pérdidas y adiciones. De esta forma, la longitud telomérica se encuentra normalmente regulada y dentro de unos límites bien definidos, permaneciendo en un estado de equilibrio que se ve influenciado por factores genéticos, ambientales y fisiológicos³⁵⁹ denominado "homeostasis telomérica"³⁶⁰.

La telomerasa es un complejo con tres componentes principales: la proteína de la familia de las transcriptasas inversas TERT, un ácido ribonucleico denominado TERC y la proteína auxiliar Disquerina (DKC1)^{361,362}.

Cuando la célula replica su material genético antes de dividirse, la telomerasa es guiada hacia los telómeros. Allí se alinea con el extremo de la hebra G y lleva a cabo su extensión. De esta forma los telómeros mantienen su longitud y mantienen la estabilidad cromosómica evitando la recombinación, la fusión entre telómeros, y la degradación del DNA

Estudios recientes apuntan a que la senescencia tendría un papel principal que sería el de prevenir el desarrollo del cáncer, lo que representaría una ventaja evolutiva para el organismo.

La telomerasa es sobreexpresada en las células cancerosas y esto conlleva un proceso de reversión de la pérdida de longitud telomérica que convierte a las células en inmortales³⁶³. A pesar de ello, la actividad de la telomerasa no es la responsable del origen de una célula cancerosa aunque sí un requisito.

Sin embargo, existen diferentes estudios que apoyan y refutan esta teoría ya que, dependiendo del tipo de tumor, se observa una presencia o ausencia de correlación con la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa. En los neuroblastomas³⁶⁴, el cáncer de próstata³⁶⁵, cáncer de hígado³⁶⁶, cabeza y cuello³⁶⁷, pulmón³⁶⁸, tumores gástricos³⁶⁹ y algunos hematológicos³⁷⁰ las características clínicas del tumor parecen relacionarse con la longitud sus telómeros. No es el caso del cáncer de mama³⁷¹ o de otros tumores ginecológicos en los que no existe asociación entre la longitud telomérica y el estadio de la enfermedad o el diagnóstico (cáncer de ovario, endometrio y cérvix)³⁷². Por otra parte, en los tumores ginecológicos, al igual que en otros muchos, la actividad de la telomerasa parece verse incrementada, aumentando en los primeros estadios, mientras que disminuye una vez se aplican tratamientos quimioterapéuticos. En cáncer de ovario, concretamente, los telómeros son cortos a pesar de que la actividad de la telomerasa es elevada y esto dota de un elevado riesgo a desarrollar cáncer de ovario tanto esporádico como hereditario^{372,373}.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



El carcinoma de endometrio es el tumor ginecológico más frecuente en los países industrializados³. El 95% de los casos son de origen esporádico³ y su principal factor de riesgo es la exposición hormonal¹¹.

Bokhman, en 1983, estableció un modelo dualístico el cual dividía los carcinomas de endometrio esporádicos en dos principales grupos según sus características clínico-patológicas: estrógeno dependientes o tipo 1 o endometrioides (70-80% de los casos) y no estrógeno dependientes o tipo 2 o no endometrioides (20-30%)⁷. Se ha observado que, además, ambos grupos presentan unas características moleculares determinadas. Los carcinomas endometrioides aparecen frecuentemente asociados a mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*³⁴, *KRAS*³⁵, *CTNNB1*³⁶, *FGFR2*³⁷ y en genes implicados en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos, siendo común la aparición de inestabilidad de microsatélites (MSI)³⁸. En los tumores tipo 2 o no endometrioides es frecuente encontrar mutaciones en los genes *TP53*⁴²⁻⁴⁴, *CDKN2A*⁴⁵, *CDH1*^{46,47}, pérdidas de expresión de *HER2/ERBB2*⁴⁸ y *EGFR/ERBB1*⁴⁹ y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en diferentes cromosomas⁵⁰. Estudios realizados mediante secuenciación de exomas han permitido identificar nuevos genes implicados en el desarrollo tumoral como es el caso de los genes *ARID1A*³³² y *PPP2R1A*²²⁵ en los que se han observado un alto número de mutaciones asociadas a los carcinomas endometrioides y no endometrioides respectivamente.

Posteriormente se han propuesto otras clasificaciones atendiendo a las características histológicas de los tumores. Siguiendo los criterios de la FIGO y de la OMS, los carcinomas de endometrio se pueden clasificar dependiendo del grado de diferenciación de sus células (grado 1, 2 y 3) o dependiendo de las características histológicas de cada subtipo^{14,17,18}. Esta última es una clasificación más específica y concreta en la que cada uno de los subtipos tumorales es tratado como un grupo aparte, con unas características moleculares determinadas y un tratamiento más específico y dirigido.

Las modificaciones epigenéticas también juegan un papel importante en el desarrollo del carcinoma de endometrio. Por una parte, la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1* es una de las principales causas de aparición de MSI²⁶²⁻²⁶⁶. Por otra, se han observado cambios en el perfil de expresión de las proteínas HDAC clase I durante la formación del tumor. Concretamente, la pérdida de expresión de la HDAC1 se asocia a un peor pronóstico del tumor y una menor supervivencia de las pacientes³¹².

Finalmente, la longitud de los telómeros ha sido relacionada con la predisposición a desarrollar diferentes tipos de tumores o con el estadio de la enfermedad sin llegar a esclarecer su papel en la tumorigénesis. No es el caso de los carcinomas de endometrio en los que sólo se ha observado una mayor actividad del complejo ribonucleico telomerasa no asociada a la longitud telomérica ni al tipo o grado tumoral^{363,371-373}.

Por ello, en nuestro trabajo analizamos diferentes aspectos implicados en el desarrollo del carcinoma de endometrio esporádico a partir de cinco objetivos principales:

- **Primer objetivo:** estudiar la organización de los genes implicados en el desarrollo tumoral *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1*, *PPP2R1A*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *KRAS*, *BRAF* y *EGFR*.
- **Segundo objetivo:** analizar la inestabilidad de microsatélites (MSI), la metilación de la región promotora, los grandes reordenamientos y las mutaciones puntuales presentes en los genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*.
- **Tercer objetivo:** estudiar el patrón de expresión de las proteínas histona desacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC3.
- **Cuarto objetivo:** analizar la longitud telomérica de los diferentes tipos de carcinoma de endometrio esporádico y estudiar la su posible relación con los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A*.
- **Quinto objetivo:** establecer diferencias entre los perfiles moleculares de los diferentes tipos de carcinoma de endometrio esporádico según sus características clínico-patológicas (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grados histológicos (grado 1, 2 y 3) y subtipos histológicos (carcinomas endometrioides, serosos, carcinomas de células claras, carcinomas mixtos y carcinosarcomas).

PACIENTES Y MÉTODOS



1. PACIENTES

1.1 TEJIDO TUMORAL

Hemos estudiado 86 muestras de carcinoma de endometrio esporádico procedentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, obtenidas por extirpación quirúrgica entre los años 2006 y 2012 y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado de las pacientes siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. La media de edad fue de 69.36 ± 10.29 años (mediana=70.0).

Todas las muestras fueron analizadas para la determinación del tipo y grado histológico según las recomendaciones de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Asimismo, de manera rutinaria, se realizó un estudio inmunohistoquímico a fin de obtener un perfil de expresión de los genes del mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) y obtener información necesaria para el estudio molecular de los mismos.

En la tabla 1 se presentan los diferentes tipos de tumores analizados y el número de muestras correspondientes a cada uno:

Tabla 1: Número de muestras analizadas de cada tipo y grado de tumor según el estudio realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca.

Tipo de tumor	Grado	Subtipo de Tumor	Número de Muestras	Porcentaje (%)
Tipo 1 o Endometriode	Grado1	Endometriode G1	31	36.05
	Grado 2	Endometriode G2	24	27.91
		Endometriode G3	8	9.30
Tipo 2 o No endometriode	Grado 3	Seroso	8	9.30
		Células Claras	1	1.16
		Mixto	2	2.33
		Carcinosarcoma	12	13.95
		TOTAL	86	100.00

De los 31 adenocarcinomas endometrioides grado 1, tres de ellos presentaron diferenciación escamosa (casos 3, 47 y 64), uno diferenciación tubular (paciente 10), dos diferenciación tubular y papilar (casos 6 y 41) y uno diferenciación tubular y cribiforme (caso 7). De los 24 tumores de grado 2, uno presentó diferenciación tubular (caso 1), otro tubular y papilar (caso 2), otro ciliada (caso 15), otro villoglandular (caso 28) y otro escamosa (caso 33). Tres de los 8 adenocarcinomas endometrioides grado 3 presentaron un patrón escamoso (pacientes 9, 36 y 38). De los 8 carcinomas serosos, dos presentaron diferenciación papilar (caso 29 y 70). Además incluimos en el estudio dos adenocarcinomas mixtos, uno con 50% de componente endometriode grado 2 y 50%

carcinoma de células claras y seroso (caso 23) y el otro con componente seroso y componente endometrioides grado 3 (caso 66). La composición de los carcinosarcomas fue muy heterogénea y en ocasiones no dispusimos de la información acerca de las características de sus componentes. De los casos 5 y 16 tan sólo obtuvimos información acerca del tipo de componente epitelial que fue endometriode en el primer caso y seroso en el segundo. De las muestras 11 y 39 no obtuvimos información acerca de sus características. El caso 24 estaba compuesto por componente endometriode y sarcoma de alto grado, los casos 64 y 83 por endometriode de grado 3 y sarcoma de alto grado, las muestras 27, 53 y 81 de componente seroso y estroma de grado alto y los casos 46 y 58 de componente endometriode y epidermoide respectivamente y sarcoma de alto grado.

1.2 SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre periférica de las pacientes operadas de carcinoma endometrial se obtuvieron, siempre que fue posible, mediante venopunción antecubital en el Servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. La extracción se realizó en el momento en el que la paciente acudió a la consulta rutinaria dentro del seguimiento realizado en el Servicio. Las muestras de sangre periférica se conservaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento y todas ellas fueron extraídas previo consentimiento informado de la paciente.

De todas las pacientes cuyos tumores habían sido extraídos y analizados, obtuvimos muestra de sangre periférica de 28: diez de adenocarcinomas endometrioides grado 1 (casos 3, 21, 40, 41, 42, 43, 50, 65, 68 y 79), diez de grado 2 (casos 1, 15, 17, 37, 44, 45, 54, 55, 69 y 86), dos de grado 3 (casos 52 y 80), tres con carcinoma tipo seroso (casos 25, 49 y 70), uno con adenocarcinoma mixto (caso 23) y dos con carcinosarcomas (casos 16 y 53).

Aparte de las 86 muestras tumorales y de las 28 procedentes de sangre periférica, recibimos dos muestras de dos pacientes que fueron excluidas del estudio por presentar mutaciones en los genes *hMLH1* y *hMSH6* tanto en el tumor como en el DNA procedente de la sangre periférica. Además mostraron un patrón de herencia familiar totalmente acorde al descrito en Síndrome de Lynch. Estas dos pacientes no han sido incluidas en ninguno de los análisis descritos en este trabajo.

Por último aclarar que nuestro trabajo se encuentra englobado dentro de un estudio, llevado a cabo en nuestro laboratorio desde el año 2006. Los casos 1 a 41 fueron previamente analizados por la Dra. Mercedes Núñez Lozano³⁷⁴ y descritos en su trabajo de tesis doctoral a excepción del estudio de los genes *PPP2R1A*, *ARID1A*, *EGFR* y *hMSH6* y el análisis de la longitud telomérica así como el estudio de los polimorfismos

TERT-1327C>T y *TERC-63G>A*. De igual forma, los programas de predicción utilizados para el estudio *in silico* de las mutaciones *missense* y de significado desconocido no fueron exactamente los mismos ya que el programa SNP3D fue sustituido por el GVDG y además se añadió el estudio de las mutaciones silenciosas mediante los programas ESEfinder y RESCUE-ESE 1.0. El programa TFSEARCH fue utilizado por primera vez en nuestro trabajo para el estudio de mutaciones localizadas en la región 5'-UTR. Los casos del 42 al 86 fueron estudiados por nosotros posteriormente completando así el estudio y realizando un análisis global de los resultados.

2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

2.1 EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE Y TEJIDO TUMORAL

Para la extracción de DNA tanto de sangre periférica como de tejido tumoral se siguió el mismo protocolo variando las cantidades añadidas de los reactivos y realizando un paso de homogeneización inicial en el caso de la muestra tumoral. Para ello se utilizaron 100 mg de tejido que se homogeneizaron con un Politrón® en 425 mL de tampón Fornace (0.25 M Sacarosa, 50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂).

La obtención de células mononucleadas de la sangre se realizó a partir de 10 mL de sangre periférica mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50 mL de ddH₂O durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Tras la recuperación de la interfase creada y la lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, las células mononucleadas fueron lavadas en tampón Fornace, que proporcionó la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos, y posteriormente precipitadas mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió nuevamente en tampón Fornace a una concentración estimada de 5×10^6 células/mL, tras lo cual se añadió EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 0.5 M pH 8 (que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas) a una concentración final de 10 mM, SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares y proteinasa K (*AppliChem, Darmstadt, Alemania*) a una concentración final de 50 µg/mL para degradar las proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del DNA incubándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) (*AppliChem, Darmstadt, Alemania*) Tras lo cual se sometió a centrifugación. Con este proceso el DNA permaneció en la fase acuosa y se limpió de otros residuos al mezclarla con CIAA (*Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, España*) y centrifugar para separar de nuevo las dos fases, una en la que estaba contenido el DNA y otra que contenía los detritos celulares. Tras este paso se

añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió 200 μ L en ddH₂O estéril.

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA se calcularon tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático Nanodrop® ND2000 (*Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sur África*) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de DNA/mL} = (D.O._{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de la absorbancia que tienen 50 μ g de DNA/mL).

El cociente DO_{260}/DO_{280} se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de RNA que se eliminó tratando la solución de DNA con RNasa y purificando de nuevo, según los métodos descritos anteriormente³⁷⁵.

La muestra de DNA constó de una concentración aproximada de entre 1000 y 1500 ng/ μ L (resuspendidos en 200 μ L de ddH₂O). Se almacenó en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

2.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO TUMORAL

Se extrajo RNA a partir de muestras de 100-200 mg de tejido tumoral siguiendo una modificación del método de Chomczynski y Sacchi³⁷⁶. Para ello, las muestras se homogeneizaron en 1 mL de Trizol (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) con la ayuda de un Politrón® y se realizó una extracción selectiva del RNA mediante separación de fases tras la adición de 200 μ L de cloroformo por cada mL de Trizol inicial. El RNA disuelto en la fase acuosa se precipitó con isopropanol y se resuspendió en ddH₂O tratada con DEPC (dietilpicrocarbonato 0.1%) que es un inhibidor de RNasas.

La integridad del RNA se comprobó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes de las muestras y la observación de las bandas de RNA ribosomal. La concentración de RNA de las muestras se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop® ND2000 (*Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sur África*) midiendo la absorbancia a 260 nm y comprobando la presencia de contaminantes con la medida del ratio A260/A280.

2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE TEJIDO TUMORAL

Para la extracción de proteínas de la muestra tumoral se utilizó 1 mL de tampón RIPA (1% NP40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1x PBS) y 20 µL de inhibidor de proteasas API 100x (1% aprotinina, 1% pepstatina y 1% leupeptina, y se procedió a la homogenización de 100 mg de tejido con el Polytrón® System PT 1200E (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, U.S.A.*). Una vez homogeneizado, se incubó en hielo durante 30 minutos, durante los cuales se realizaron repetidos vórtex y, posteriormente se centrifugó a 2000 r.c.f. durante 20 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación, se recogió el sobrenadante, que es el que contenía el lisado proteico y se almacenó en tubos Eppendorf® a -80°C, con el fin de evitar la desnaturalización y degradación progresiva de la muestra.

3. ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

Para el estudio mutacional realizado en los genes asociados al carcinoma de endometrio esporádico, llevamos a cabo diferentes técnicas dependiendo del gen y de sus características. En algunos genes no fueron estudiados todos los exones ya que nos centramos en aquellas regiones exónicas e intrónicas en las que se habían descrito previamente la mayoría de las mutaciones patogénicas.

Analizamos dichos genes en las 86 muestras de DNA procedente de tejido tumoral. Posteriormente, y siempre que fue posible, se extendió el análisis de las mutaciones encontradas a la muestra de DNA procedente de sangre periférica para comprobar la naturaleza germinal o somática de la mutación.

En la siguiente tabla (tabla 2) podemos observar un resumen de las técnicas utilizadas para el estudio de cada gen y las regiones analizadas.

Tabla 2: Regiones analizadas en cada gen y método utilizado para su estudio.

TIPO	GEN	EXONES CODIFICANTES	EXONES ANALIZADOS	PCR	SECUENCIACIÓN DIRECTA	CSGE-Heterodúplex
SUPRESORES DE TUMORES	<i>PTEN</i>	1-9	1-9	SÍ	5, 6, 7 y 8	1, 2, 3, 4 y 9
	<i>TP53</i>	1-10	4-10	SÍ	4-10	---
	<i>CDKN2A</i>	1-2	1-2	SÍ	1-2	---
	<i>CDH1</i>	1-16	1-16	SÍ	---	1-16
	<i>PPP2R1A</i>	1-15	1-15 ó 5 y 6	SÍ	1-15	5 y 6
	<i>ARID1A</i>	1-20	1-20	SÍ	---	1-20
ONCOGENES	<i>PIK3CA</i>	1-20	7, 9 y 20	SÍ	---	7, 9 y 20
	<i>CTNNB1</i>	2-16	3	SÍ	3	---
	<i>KRAS</i>	1-6	2 y 3	SÍ	2 y 3	---
	<i>BRAF</i>	1-18	11 y 15	SÍ	---	11 y 15
	<i>EGFR</i>	1-28	18-21	SÍ	18-21	---
MMR GENES	<i>hMLH1</i>	1-19	1-19	SÍ	---	1-19
	<i>hMSH2</i>	1-16	1-16	SÍ	---	1-16
	<i>hMSH6</i>	1-10	1-10	SÍ	---	1-10

En el gen *PTEN* se analizaron por secuenciación directa los exones 5, 6, 7 y 8 ya que corresponden a la región en la que se han descrito la mayoría de mutaciones patogénicas, casi todas tipo *missense*, coincidiendo con sus dominios catalítico fosfatasa y C2.

En el gen *TP53*, los exones estudiados fueron los comprendidos entre el 4 y el 10, ambos inclusive, y debido a que más del 90% de las mutaciones descritas son *missense* tipo transición, la secuenciación directa mostró ser el método más eficaz para su estudio.

CDKN2A fue estudiado mediante secuenciación directa ya que se han descrito mutaciones tipo deleción en homocigosis las cuales no se pueden detectar mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex.

En el caso de *PPP2R1A*, los exones del gen fueron secuenciados en su totalidad en los tumores de alto grado incluido los endometrioides grado 3 al poseer unas características intermedias entre los no endometrioides y los endometrioides de bajo grado. En los endometrioides grado 1 y grado 2 se estudiaron los exones 5 y 6 mediante CSGE-Heterodúplex ya que son las zonas donde se localizan las únicas mutaciones descritas hasta el momento en el gen, todas ellas en heterocigosis.

Del gen *PIK3CA* tan sólo se analizaron los exones 7, 9 y 20 ya que es dónde se han descrito la mayoría de las mutaciones y al ser un oncogén, lo más común es su aparición en heterocigosis. De ahí que se estudiaran por CSGE-Heterodúplex.

En el gen *CTNNB1* se estudió en exón 3 por secuenciación directa ya que es el encargado de codificar el dominio treonín-serina kinasa y los residuos adyacentes al dominio regulador. Casi todas las mutaciones descritas hasta el momento son tipo *missense* en heterocigosis.

Del gen *KRAS* se analizaron los exones 2 y 3 ya que es donde se localizan los codones 12 y 13 y 61 respectivamente, ambos *hotspots* en diferentes tipos de tumores. A veces aparecen cambios *missense* en homocigosis y su detección mediante CSGE-Heterodúplex resulta imposible, por tanto se estudiaron por secuenciación directa.

El gen *BRAF* suele presentar mutaciones en los exones 11, que codifica a una región rica en Glicinas, y 15, que da lugar al segmento de activación. Es por ello que tan sólo se estudiaron ambas regiones por CSGE-Heterodúplex.

Del gen *EGFR* sólo se estudiaron los exones del 18 al 21 que codifican su región tirosín-kinasa. Como hasta el momento se ha encontrado un porcentaje poco elevado de mutaciones en carcinoma de endometrio, se prefirió estudiarlos mediante secuenciación directa.

Los genes implicados en el MMR fueron analizados en una primera fase en todos los casos disponibles (1 a 41) y, posteriormente, tan sólo en aquellas tumores en las que el estudio inmunohistoquímico realizado en el Servicio de Anatomía Patológica, fue negativo. Las mutaciones en estos genes suelen afectar a uno de los alelos ya que necesitan una segunda mutación para que se desencadene el proceso tumoral. Por ello se estudiaron mediante CSGE-Heterodúplex.

Finalmente los genes *CDH1* y *ARID1A* fueron analizados en su totalidad mediante CSGE-Heterodúplex al tratarse de un método adecuado para su estudio debido a que la mayoría de las mutaciones descritas en la bibliografía aparecen en heterocigosis.

3.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Se amplificaron mediante PCR las regiones exónicas e intrónicas a estudiar como paso previo a la secuenciación directa o al análisis por heterodúplex.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el producto comercial PCR Master Mix (*Promega, Madison, WI, U.S.A.*). Se llevaron a cabo en un volumen de 25 μL : 12.5 μL de Master Mix (22 mM tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl_2 , 220 μM dNTPs, 22 U Taq DNA polimerasa), 9.5 μL de agua libre de nucleasas; 1 μL de cada uno de los dos oligonucleótidos flanqueantes (sentido=*forward* y anti-sentido=*reverse*) y 1 μL de DNA obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0.1-0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)³⁷⁵. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de *Life Technologies-Invitrogen (California, U.S.A.)* con las siguientes condiciones generales de amplificación:

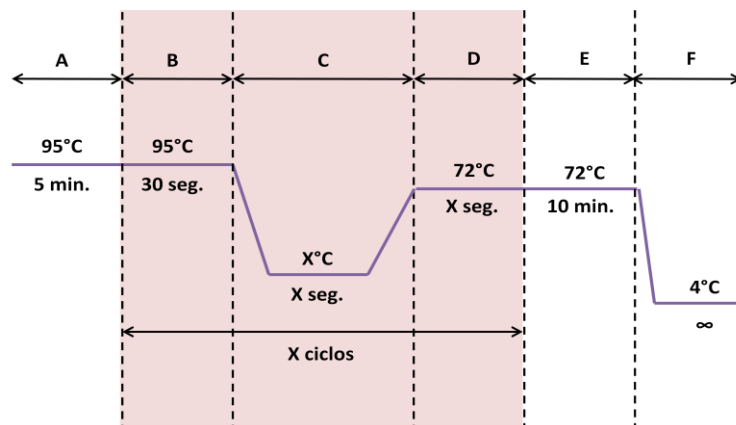


Figura 31: Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR. A: tiempo de desnaturalización previa; B: desnaturalización inicial del ciclo; C: anillamiento de nucleótidos; D: extensión; E: extensión final; F: conservación del producto de PCR. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo y el número de ciclos BCD.

Para asegurar la ausencia de contaminación y la especificidad de la amplificación, para cada mezcla se preparó siempre como control negativo una reacción paralela conteniendo todos los reactivos menos el DNA a amplificar.

Las condiciones de la PCR con respecto a la temperatura y tiempo de anillamiento y el tiempo de extensión y el número de ciclos, dependen básicamente de las características de los oligonucleótidos y del tamaño de fragmento a amplificar. En el anexo 1 podemos observar las secuencias de los oligonucleótidos empleados y las características de las PCRs de cada uno de los genes estudiados.

3.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% (*Gel Company Inc, San Francisco, U.S.A.*) preparado con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM, pH=8.3). El primer pocillo del gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño correspondiente con el DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. Este marcador de tamaño genera fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 kb.

La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.

Para monitorizar la migración del DNA en el gel, utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 kb.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando SYBR® Safe DNA Gel Stain (1:10000, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D).

3.3 DETECCIÓN DE MUTACIONES MEDIANTE CSGE-HETERODÚPLEX

Algunos exones no fueron secuenciados directamente porque cumplían los requisitos necesarios para un análisis por CSGE-Heterodúplex. De esta forma, mediante esta técnica hicimos un descarte previo de aquellos exones que no presentaban alteraciones lo cual simplifica el proceso y abarata los costes asumiendo un 5% de error en la técnica.

Las muestras amplificadas por PCR fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos, y enfriadas 1°C por minuto hasta 32°C para su nueva renaturalización.

Con este proceso se busca hibridar hebras de DNA procedentes de ambos alelos (heterodúplex) en los que uno pudiera tener alguna alteración y producir una distorsión en la doble hélice que diera un patrón anormal en la migración electroforética (figura 32). La preparación de las muestras para la electroforesis fue de 3 a 8 µL de los productos de PCR mezclado con 2 µL de tampón de carga Triple Dye Loading Buffer (*National Diagnostics, Hessle, Reino Unido*).

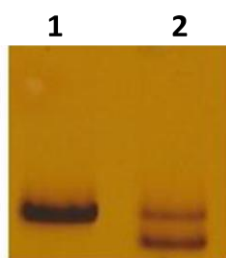


Figura 32: Ejemplo de dos muestras a las que se les ha aplicado la técnica CSGE-Heterodúplex. La muestra 1 presenta un patrón de migración normal mientras que en la muestra 2 se encuentra alterado por la presencia de alguna mutación que después del proceso de desnaturalización-renaturalización ha dado lugar a la formación de heterodúplex y homodúplex.

Se emplearon para ello, geles de MDE, que es un polímero de acrilamida modificado derivado del vinilo para realizar la electroforesis vertical de los productos de PCR amplificados y se analizaron los patrones de migración anormal que pudieran indicar la presencia de mutaciones. Cada gel se preparó atendiendo a las siguientes cantidades: 7.705 mL de ddH₂O, 5.98 mL de formamida 99% (*Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, España*), 4.025 mL de Poly(etilenglicol) al 99% (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.*), 2.415 mL de TBE 10X, 20.125 mL de SquaGel[®] MD 2X (*National Diagnostics, Hessle, Reino Unido*), 36.8 µL de TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina, *AppliChem, Darmstadt, Alemania*) y 138 µL de AMPS (persulfato de amonio) al 25%. El volumen final fue de 40.25 mL. La electroforesis se llevó a cabo con tampón 0.6X TBE. A cada gel se le aplicó una diferencia de potencial eléctrico constante de 180V durante aproximadamente 21 horas (el tiempo varió dependiendo del tamaño del fragmento de PCR a analizar).

Finalmente cada gel fue teñido con el kit comercial DNA Silver Staining Kit (*GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia*) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los fragmentos resultantes fueron visualizados y analizados en un transiluminador. La detección de

un patrón de migración anormal conllevó la purificación del producto de PCR correspondiente y secuenciación automática directa para visualizar la secuencia nucleotídica exacta.

3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR

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

3.5 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SANGER

Las reacciones para la secuenciación automática se llevaron a cabo preparando 40-60 ng del DNA amplificado con 3 pmol de oligonucleótido correspondiente, todo ello en un volumen final de 8 µL de reacción. Acto seguido se enviaron al secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) localizado en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca donde se realizó la reacción de secuenciación con el kit BigDye Terminator[®] v.3.1 (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*).

3.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó utilizando diferentes programas informáticos.

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se llevó a cabo con ayuda del programa Chromas Lite (http://technelysium.com.au/chromas_lite.html).

La homología con las secuencias depositadas en las bases de datos EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>) y GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) se realizó con los programas FASTA o BLAST de los servidores www2.ebi.ac.uk/fasta3 y www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html respectivamente.

El diseño de oligonucleótidos específicos para PCR o secuenciación se llevó a cabo con el programa Oligo 4.05 primer Analysis Software (*National Biosciences, Inc.*).

3.7 BASES DE DATOS

3.7.1 PUBMED “U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health”.

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Es un motor de búsqueda de libre acceso a bases de datos bibliográficas, entre ellas principalmente MEDLINE. Esta base de datos es un recurso creado por la “National Library of Medicine” de Estados Unidos, y recoge referencias bibliográficas de artículos publicados en más de 4.500 revistas médicas desde 1966 hasta la fecha.

3.7.2 UCSC

genome.ucsc.edu

La base de datos UCSC Genome Browser fue creada en el año 2000 por dos investigadores de la Universidad de California Santa Cruz y posteriormente entró a formar parte del proyecto Genoma Humano. Con 13 años de antigüedad, contiene secuencias de 58 organismos y ofrece un amplio rango de posibilidades debido a las múltiples herramientas que ofrece³⁷⁷.

En nuestro trabajo ha sido utilizada para la obtención de las secuencias genómicas de los genes estudiados así como para la comparación entre las secuencias génicas de nuestros tumores y las almacenadas en la base gracias a la aplicación Blat.

3.7.3 VEGA “Vertebrate Genome Annotation”

vega.sanger.ac.uk/index.html

La base de datos VEGA es un repositorio central en el que se encuentra contenida la secuencia completa del genoma de aquellos vertebrados en los que se conoce, incluyendo el *Homo sapiens*. El pez cebra y el ratón están en proceso de ser completados mientras que de otras especies tan sólo se localizan las regiones genómicas de elevado interés. Está desarrollada por el Wellcome Trust Sanger Institute y en nuestro trabajo ha sido utilizada

principalmente para la búsqueda de las secuencias genómicas y proteómicas así como para la búsqueda de mutaciones ya descritas.

3.7.4 HGMD® “The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetic in Cardiff”.

www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php

Consiste en una colección de mutaciones en línea germinal para el estudio de determinadas enfermedades humanas y representa una fuente de referencia actualizada sobre cambios con alguna implicación patogénica en el genoma.

3.7.5 LOVD-INSIGHT “Leiden Open Variation Database”

www.insight-group.org/mutations

Esta base de datos creada por la Sociedad Internacional de Tumores Hereditarios Gastrointestinales, fue implantada para dotar de una herramienta flexible, útil y accesible a los profesionales de los distintos ámbitos de la salud, para la búsqueda y catalogación de variantes de DNA ordenadas por los genes de interés.

3.7.6 COSMIC “Catalogue of Somatic Mutations in Cancer”.

www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic

Esta base de datos es uno de los recursos disponibles on-line que ofrece el Instituto Sanger para proveer información sobre mutaciones somáticas y detalles relacionados con cáncer en humanos.

3.7.7 IARC TP53 DATABASE

p53.iarc.fr/

Esta base de datos es desarrollada y mantenida por la International Agency for Research on Cancer en Lyon (Francia) y se compone exclusivamente de los datos obtenidos mediante la

búsqueda y revisión de la literatura científica existente, constituyendo un depósito de todas las mutaciones en el gen TP53 publicadas hasta la fecha.

3.7.8 THE P53 WEB SITE

p53.fr/

La base de datos de esta Web provee información para la identificación y el análisis de mutaciones que afectan a la proteína p53 en cáncer. Permite descargarse un archivo en el cual se recoge toda la información detallada de todas las mutaciones descritas hasta el momento, el artículo original en el que se describieron así como el tipo de tumor, características de los pacientes portadores, etc.

3.7.9 MISMATCH REPAIR GENE VARIANT DATABASE

www.med.mun.ca/mmrvariants/default.aspx

Esta base de datos creada por la “Memorial University” de Newfoundland (Canadá) es un catálogo de las variantes conocidas de los genes pertenecientes a MMR que han aparecido en la literatura. Para ello se ha revisado el tipo de cambio y las circunstancias clínicas en las que ha sido identificado.

3.7.10 MIRBASE DATABASE

<http://www.mirbase.org/>

Esta base de datos está mantenida y ubicada en los servidores de la Faculty of Life Sciences de la Universidad de Manchester y apoyada económicamente por Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC).

miRBase database es una base de datos que reúne las secuencias de los miRNA publicados actualmente. Cada entrada de esta base de datos muestra la estructura del transcrito del miRNA teórica con la información de la localización y la secuencia del miRNA maduro. Ambas secuencias, la del transcrito y la del miRNA maduro, se pueden descargar para su uso. Además consta de la aplicación miRBase Registry que proporciona localizadores de los genes de los miRNA para nuevos miRNA y de miRBase targets database o microCosm que es una herramienta para la predicción de dianas de los miRNA.

4. CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES

4.1 ESTUDIOS DE PERTENENCIA ALÉLICA DE MUTACIONES MEDIANTE CLONACIÓN

Para determinar la pertenencia a uno u otro alelo de las mutaciones en las muestras en las que aparecieron más de una alteración puntual en el mismo exón, se recurrió al clonaje de los fragmentos DNA de interés en vectores de clonación. También se llevó a cabo en aquellos casos en los que las mutaciones eran tipo inserción/delección y se encontraban en zonas cercanas a los oligonucleótidos. En esta situación resulta difícil detectar la alteración ya que las secuencias presentan un patrón doble desde su inicio o en la región final, dependiendo de dónde se localice la mutación. En nuestro estudio, aplicamos esta técnica para el estudio de mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1* y *ARID1A*.

Para ello, se amplificaron mediante PCR los fragmentos donde fueron identificadas las mutaciones y dichos productos fueron subclonados en el vector de clonación pGEM®-T easy (*Promega, Madison, WI, U.S.A.*), constituido por una doble cadena de DNA lineal que permite ligar en sus extremos productos de PCR para su posterior secuenciación, sin necesidad de que estos sean manipulados previamente. Este vector ofrece la posibilidad de seleccionar por color las colonias que contienen las construcciones ligadas, ya que el sitio de clonaje interrumpe una secuencia del operón LacZ, y de selección de transformación ya que contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp) (figura 33).

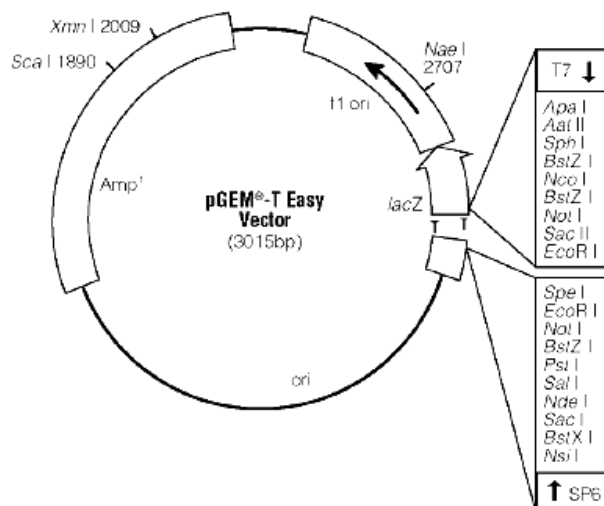


Figura 33: Esquema del vector de clonación pGEM®-T easy. Aparecen representados el mapa de restricción de enzimas de corte único y las secuencias funcionales de referencia.

Para realizar dichas construcciones, se procedió a la ligación del material amplificado con el vector, empleando de 2 a 5 μ L del DNA amplificado (inserto) y 20 ng del vector. Dicha mezcla se incubó en presencia de la enzima T4 DNA ligasa 1U (*Promega, Madison, WI, U.S.A.*), 1 μ L

de tampón específico (*2x Rapid ligation buffer, Promega, Madison, WI, U.S.A.*) y ddH₂O hasta un volumen de 10 µL durante 3 a 4 horas a una temperatura de 22°C o bien durante 15 horas a temperatura de 4-15°C.

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de la cepa bacteriana DH5α derivada de *Escherichia coli*. Para que la bacteria sea susceptible a la transformación, tiene que ser sometida a un proceso previo que la convierte en competente. Para ello, se sembró una colonia de esta cepa en medio 2xTY y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O.600 aproximada de 0,6. El cultivo se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 100 mL de CaCl₂ 100 mM a 4°C y, después de una nueva centrifugación de iguales condiciones, las bacterias se resuspendieron en 100 mL de CaCl₂ 100 mM. Se distribuyeron en alícuotas de 120 µl que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana se utilizó un volumen de 30 µL de bacterias competentes, descongeladas en hielo previamente, que se incubaron con 5 µL de la reacción de ligación durante 1 hora en hielo. Pasado ese tiempo, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos, y se añadieron 500 µL de 2xTY, para proseguir con una incubación de la mezcla a 37°C en agitación durante 30 minutos. La bacteria transformada se sembró, junto con 50 µL de IPTG (20 mg/mL), que induce la transcripción del operón LacZ, y 50 µL del sustrato X-Gal (20 mg/mL), en medio sólido de 2xTY preparado con 100 µg/mL de ampicilina para llevar a cabo la selección de transformación. Las placas de cultivo se incubaron en una estufa a 37°C durante 10 a 12 horas.

Seleccionamos las colonias blancas ya que fueron las no adquirieron coloración azul debido a que la clonación del inserto interrumpió la secuencia codificante del operón LacZ presente en el vector. Se sembraron en 1 mL de 2xTY suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 6 a 10 horas, para aumentar su crecimiento, aumentar la replicación del plásmido y con ello obtener mayores cantidades de vector con la construcción de interés. Seguidamente, se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 2000 rpm y se decantó el sobrenadante para obtener el botón bacteriano. La extracción del DNA plasmídico con el inserto se llevó a cabo mediante el kit comercial DanaPlasmi Spin Miniprep Kit (*GeneDan S.L., Barcelona, España*) según las especificaciones del fabricante. Se empleó una lisis alcalina seguido de un paso de precipitación y neutralización que hizo precipitar proteínas y DNA genómico de la bacteria, tras lo cual se precipitó con isopropanol el DNA plasmídico y se procedió a la posterior purificación y concentración con etanol al 70%.

Para asegurarnos de nuevo de que las colonias seleccionadas contenían los vectores con los insertos de interés, se realizó una digestión con enzimas de restricción específicas del vector de clonación. Se escogieron para ello las enzimas ApaI y SacI (*Fermentas, Glen Burnie, MD*) cuyos sitios de corte se encuentran localizados a ambos lados del inserto (figura 33) y se usó un tampón de digestión específico (10x B+ buffer, *Fermentas, Glen Burnie, MD*). La incubación

se realizó durante 3 a 5 horas a 37°C según recomendaciones del fabricante. La presencia de los insertos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (figura 34).

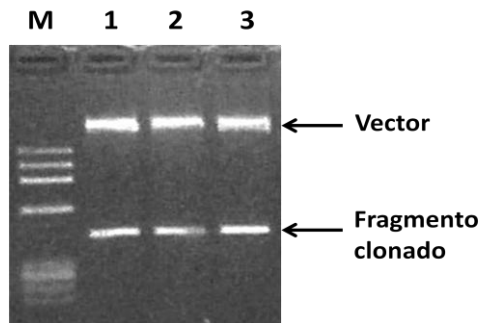


Figura 34: Imagen del resultado de la electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con las enzimas Apal y SacI en el vector de clonación. Se observa que en las muestras 1, 2 y 3 el vector ha sido clonado ya que al realizar la digestión aparecen dos bandas, una correspondiente al fragmento de mayor tamaño (vector) y otra de menor tamaño (fragmento clonado). M: Marcador.

Finalmente, se procedió a la determinación de la secuencia nucleotídica mediante secuenciación automática del inserto usando los oligonucleótidos universales del vector de clonación T7 y SP6 y comprobando la presencia o ausencia de las alteraciones encontradas previamente (figura 35).

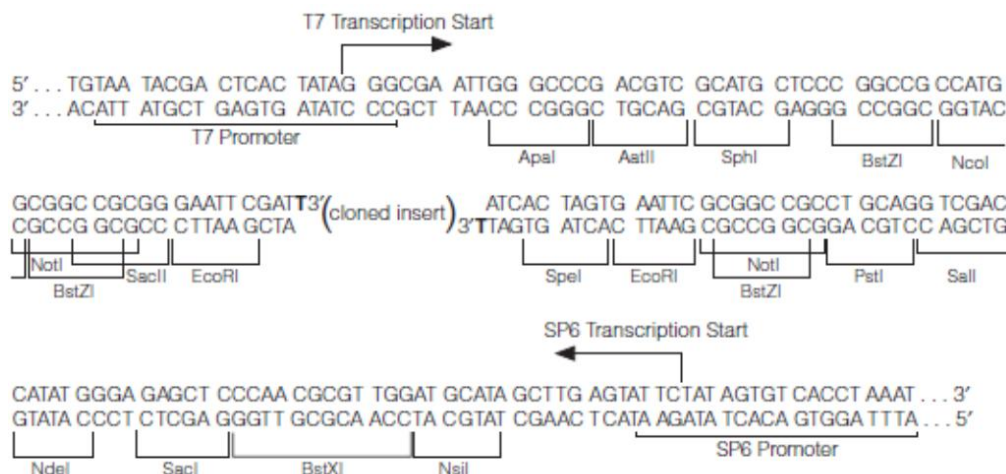


Figura 35: Secuencia de las zonas flanqueantes a la del inserto clonado en el vector pGEM®-T easy.

4.2 PROGRAMAS PARA EL ESTUDIO *IN SÍLICO* DE MUTACIONES NO DESCRITAS

Los estudios *in silico* permiten estudiar de manera predictiva el grado de patogenicidad de una mutación. Es importante su realización siempre que se encuentre una mutación no descrita anteriormente y sirve como estudio complementario a otros análisis. Los resultados de los estudios *in silico* nunca poseen un carácter determinante pero sí orientativo. Para el estudio de mutaciones tipo *missense* no silenciosas utilizamos 5 programas basados en la conservación en la evolución del aminoácido o secuencia de aminoácidos a los que afecta: PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVDG. Por otra parte, las mutaciones silenciosas encontradas fueron analizadas mediante los programas ESEfinder 3.0 y RESCUE-ESE 1.0; aquellas mutaciones observadas en zonas 5'-UTR ó 3'-UTR, los programas microRNA y TFSEARCH y la base de datos miRBASE; y para las mutaciones tipo delección o inserción se utilizó el programa de predicción de estructuras secundarias PSIPRED. El análisis de la conservación de los aminoácidos afectados se realizó con el programa PolyPhen.

4.2.1 POLYPHEN (POLYMORPHISM PHENOTYPING)

<http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen>

Este programa predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas^{378,379}.

Para realizar la predicción se lleva a cabo un alineamiento de secuencias pertenecientes a las proteínas homólogas en las especies que se encuentren descritas en BLAST. El resultado del alineamiento múltiple es empleado por el software PSIC (Position-Specific Independent Counts) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz son ratios (valores del perfil) logarítmicos que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo). El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas. PolyPhen también muestra el número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda. Este número indica la credibilidad de los cálculos del valor del perfil.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patógeno: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína.

- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura de la proteína.
- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico.
- Desconocido: en algunos casos, la carencia de datos no permite que el programa pueda hacer una predicción.

PolyPhen también muestra un número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda para el análisis de la conservación interespecie ordenadas de mayor a menor homología en la secuencia de la proteína dada.

4.2.2 SIFT (SHORTING INTOLERANT FROM TOLERANT)

<http://sift.jcvi.org/>

El programa SIFT es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína y predice si estos cambios provocarán un efecto en el fenotipo de la proteína.

Se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que los cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y forma un alineamiento múltiple de éstas, y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento, realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas “no toleradas” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido³⁸⁰.

Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge las secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar y luego obtiene el alineamiento de las secuencias escogidas. Por último, calcula las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menos de 0.05 serán clasificadas como deletéreas y las puntuaciones mayores o iguales a 0.05, “tolerables” o neutrales.

La precisión en las predicciones de SIFT es del 60-80%, obteniéndose un 30% aproximadamente de falsos positivos. No obstante, la precisión de las predicciones depende del alineamiento que se obtenga en cada caso.

4.2.3 PMUT

<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>

Pmut es un programa que predice si una mutación puede ser patogénica o neutral. Se basa en las características de la secuencia y en un software de una o dos redes neurales NN (*neural network*), que emplean bases de datos internas, predicción de estructura secundaria y conservación de la secuencia.

En los resultados proporciona una respuesta afirmativa o negativa y un índice de credibilidad³⁸¹. Estos resultados varían en un rango de 0 a 1, donde un valor 0 indica que se trata de una mutación neutral y los valores más altos son patogénicos. Además, muestra la mutación en relación a la estructura proteica. La tasa de error de esta predicción por falsos positivos es entre un 12 y un 21% y por falsos negativos entre un 10 y un 17%.

4.2.4 PANTHER (PROTEIN ANALYSIS THROUGH EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS- CLASSIFICATION SYSTEM)

<http://www.pantherdb.org>

Este programa estima la probabilidad que presenta un cambio nucleotídico, tipo SNP codificante, de causar un impacto funcional en la proteína. Calcula el subPSEC (*substitution position-specific evolutionary conservation*) que da una puntuación basándose en el alineamiento de proteínas evolutiva y funcionalmente relacionadas^{382,383}. Los valores del subPSEC abarcan desde el 0 cuando la mutación se considera neutra hasta el -10, donde se alcanza la mayor probabilidad de ser patogénica. Por tanto a valores más negativos el cambio se considera más patogénico. El valor -3 es considerado el límite a partir del cual valores inferiores indican una pérdida significativa de funcionalidad de la proteína. Cuando el cambio presenta un subPSEC > -3 se considera neutro³⁸⁴.

La precisión de este programa es del 40%, con una tasa de falsos negativos mayor que otros programas.

4.2.5 ALIGN-GVGD

<http://agvgd.iarc.fr/>

Align-GVGD es un programa en el cual se combina el grado de conservación de los aminoácidos (GV) con una medida bioquímica de la diferencia entre los aminoácidos silvestres y mutados con respecto al alineamiento (GD).

Se trata de una extensión de la Grantham Difference, la cual tiene en cuenta la composición (C), polaridad (P) y volumen (V) de los aminoácidos. Utiliza unos parámetros determinados como son la longitud Euclidiana para calcular tanto GV como GD y establece una escala en la que clasifica los cambios como neutros, patogénicos o inclasificables utilizando el siguiente criterio:

1. Si $GD = 0$: la composición, polaridad y volumen de aminoácido mutado no provoca una variación en el alineamiento, la mutación se considera neutra.
2. Si $GV > 61.3$ y $0 < GD \leq 61.3$: la posición tolera más de una sustitución conservacional y la composición, polaridad y volumen del aminoácido nuevo se sitúa cercano al rango de variación observado de acuerdo con el alineamiento. Por tanto la mutación se considera también neutra.
3. Si $GV = 0$ y $GD > 0$: la posición en la que se produce el cambio está conservada al 100% y no permite cambio alguno. La mutación en este caso es considerada patogénica.
4. Si $0 < GV \leq 61.3$ y $GD > 0$: Existe una pequeña variación entre el aminoácido silvestre y el mutado (bioquímica similar) pero el aminoácido mutante no se encuentra dentro del rango de variación, por tanto el cambio es considerado patogénico.
5. Si la mutación no se localiza en ninguno de los grupos anteriores, es considerada como inclasificable.

Por tanto los resultados que nos puede ofrecer este programa se resumen en:

$GD \geq 65 + \tan(10) \times (GV^{2.5}) \Rightarrow$ Class C65 \Leftrightarrow mayor probabilidad de afectar a la función

$GD \geq 55 + \tan(10) \times (GV^{2.0}) \Rightarrow$ Class C55

$GD \geq 45 + \tan(15) \times (GV^{1.7}) \Rightarrow$ Class C45

$GD \geq 35 + \tan(50) \times (GV^{1.1}) \Rightarrow$ Class C35

$GD \geq 25 + \tan(55) \times (GV^{0.95}) \Rightarrow$ Class C25

$GD \geq 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6}) \Rightarrow$ Class C15

Else ($GD < 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6})$) \Rightarrow Class C0 \Leftrightarrow menor probabilidad de afectar a la función

Se ha descrito que el 95% de los cambios considerados neutros por Align-GVGD son funcionales pero que, sin embargo, alrededor de un 61-64% de las mutaciones consideradas patogénicas son realmente no funcionales³⁸⁵.

4.2.6 MICRORNA

www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do

Este programa predice las secuencias diana sobre las que anillan los distintos microRNAs existentes. Estas predicciones se basan en el uso del algoritmo miRandal que incorpora una base de datos actualizada de microRNAs en mamíferos (miRBase) y una serie de reglas biológicas para la búsqueda de posibles secuencias diana en los genes. Este programa permite saber también los perfiles de aparición de los miRNAs en tejidos normales y de origen patológico³⁸⁶.

4.2.7 ESEFINDER 3.0

<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>

Los cambios tipo *missense* silenciosos, es decir, que no generaban cambio de aminoácido a pesar de existir un cambio de base, fueron analizados mediante el programa ESEfinder 3.0.

Este programa es empleado para estudiar si las variantes en la secuencia afectan a los sitios consenso de unión de las proteínas SR (*Serine/Arginine-rich proteins*) y si por tanto alteran la unión de éstas en los sitios ESE (*Exon Splicing Enhancers* o sitios exónicos de potenciación del procesamiento)^{387,388}. Este programa predice la unión de las proteínas SF2/ASF, SF2/ASF (IgM-BRCA1), SC35, SRp40 y SRp55 a la secuencia dada en base a los sitios consenso de unión de estas. Para ello, se introduce la secuencia normal y la secuencia con el cambio. En nuestro caso no se analizaron secuencias de 24 nucleótidos. El programa valora la presencia de sitios ESE tanto en ambas. A nivel general, se consideran significativos los cambios exónicos que hacen que desaparezca algún sitio ESE.

El programa tiene en cuenta un valor umbral para cada proteína que consiste en aquel valor mínimo en el que una secuencia determinada se considera significativa para la unión de alguna de las proteínas de procesamiento: 1.956 para SF2/ASF; 1.867 para SF2/ASF (IgM-BRCA1); 2.383 para SC35; 2.67 para SRp40; 2.676 para SRp55

El programa también permite obtener una representación gráfica de los sitios de unión de las proteínas en la secuencia estudiada. La secuencia analizada se representa en el eje X del gráfico. Sólo se muestran los valores que superan el umbral. La altura de las barras corresponde a los valores del motivo, la anchura corresponde a la longitud del motivo de unión (6, 7, 8 nucleótidos) y cada una de las proteínas tiene un código de color.

4.2.8 RESCUE-ESE 1.0

<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>

Este programa es un método híbrido computacional y experimental que ha sido desarrollado para identificar secuencia con actividad ESE. En esta aproximación las secuencias hexaméricas específicas son identificadas como candidato sitios ESE en base a que poseen una mayor frecuencia de presencia en los exones que en intrones y en concreto en exones con zonas no canónicas de procesamiento. En este programa se analizan 238 secuencia hexaméricas que son sitios ESE potenciales. Al igual que en el programa ESEfinder, RESCUE-ESE 1.0 permite valorar el efecto de la alteración mediante la comparación de la secuencia normal con la mutada. Después de las valoraciones, el programa emite una imagen en la que localiza las secuencias ESE dentro de la secuencia de análisis.

4.2.9 TFSEARCH 1.3 (SEARCHING TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES)

<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

El programa TFSEARCH fue creado en 1995 para la detección de posibles secuencias promotoras a las que se unen factores de transcripción conocidos. Este software detecta secuencias altamente correlacionadas con las contenidas en la base de datos de sitios de unión de factores de transcripción: TFMATRIX, incluida en las bases de datos TRANSFAC, desarrolladas en GBF-Braunschweig, Alemania³⁸⁹.

Se utilizó para el estudio de las mutaciones no descritas contenidas en la región 5'-UTR de los genes analizados. Los scores representaron el grado de correlación de las secuencias introducidas por nosotros y las contenidas en las bases de datos.

4.3 PROGRAMAS PARA EL ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES GENERADOS POR LAS MUTACIONES NO DESCRITAS

4.3.1 PSIPRED (PROTEIN SECONDARY STRUCTURE PREDICTION)

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

El estudio de la simulación de la estructura secundaria de las proteínas con mutaciones truncantes en fase de lectura se realizó con el programa PSIPRED.

Este programa utiliza un método de predicción de la estructura secundaria de las proteínas que se basa en los valores generados de la posición relativa de cada aminoácido en matrices de cálculos. Esta aproximación matemática se lleva a cabo con el software PSI-BLAST, donde los cálculos se comparan con los valores de un set de 187 plegamientos únicos, y tres tipos de validaciones cruzadas que aumentan la exactitud de los resultados. De esta manera consiguen basarse en estructuras similares de otras proteínas para la secuencia de aminoácidos dada³⁹⁰.

4.4 RT-PCR (REVERSE-TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION)

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo para el análisis de una delección observada en el gen *ARID1A* que afectaba al intrón 18 y exón 19 a fin de estudiar una posible alteración en el procesamiento del mRNA.

Las reacciones de transcripción inversa y PCR se realizaron en varios pasos. En primer lugar, se sintetizó cDNA a partir de RNA utilizando el kit *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, U.S.A.) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se desnaturalizó a 70 °C durante 5 minutos una mezcla de 1 µg de RNA total y 0.5 µg del oligo (dT)₁₅, oligonucleótido que anilla en la cola poli A de los RNAs mensajeros. Se añadió 1 U de transcriptasa inversa *ImProm-IITM*, buffer *ImProm-IITM* 1X, 4 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 20 U del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin[®]* y ddH₂O libre de RNAsas hasta un volumen final de 20 µL. La mezcla permaneció durante 5 minutos a 25 °C, temperatura que permite que el cebador anille con el RNA molde, y se incubó a 42 °C durante 1 hora para permitir la síntesis del cDNA mediante la transcriptasa inversa. Finalmente, la enzima fue inactivada desnaturalizando la mezcla durante 15 minutos a 70 °C. Por último, para comprobar que la síntesis de cDNA se había producido correctamente, se amplificó por PCR un fragmento del gen *GAPDH* que se expresa constitutivamente en todos los tejidos (tabla 3).

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Pacientes y Métodos

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de un fragmento del gen *GAPDH*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Región	Oligonucleótido sentido 5´-3´	Oligonucleótido antisentido 5´-3´	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
<i>GAPDH</i>	CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA	TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC	600	55	30	30

Mediante RT-PCR hemos analizado el efecto de una mutación de *splicing* identificada en el gen *ARID1A*. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el sistema *PCR Master Mix 2x* (Promega) mediante un programa de PCR convencional adaptado a la pareja de oligonucleótidos (tabla 4).

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de un fragmento del gen *ARID1A*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Región	Oligonucleótido sentido 5´-3´	Oligonucleótido antisentido 5´-3´	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
18CF-19R	GCT CAG CAA GGC ACC ATG T	GGG AAT GTC TCA TCT TTA GCC A	60	60	60

4.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

En aquellos tumores en los que detectamos mutaciones de significado desconocido y no descritas previamente en la literatura, estudiamos la expresión de la proteína producto del gen alterado a fin de detectar si ésta se veía alterada. Para ello usamos como control extractos proteicos de cuatro líneas celulares de carcinoma de endometrio.

4.5.1 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL

En la tabla 5 se muestran las líneas celulares con las que trabajamos.

Tabla 5: Líneas celulares de carcinoma de endometrio utilizadas como control en los análisis de expresión de proteínas mediante Western blot. Se especifican las mutaciones descritas en ellas y su posible efecto sobre la expresión.

Línea celular	Especie	Tipo celular	Alteraciones descritas				
			GEN	cDNA	Proteína	Apariencia	Afecta a expresión
HEC1B	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	<i>PIK3CA</i>	c.G3145C	p.G1049R	Heterocigosis	NO
KLE	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	---	---	---	---	---
AN3CA	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	<i>PTEN</i>	c.389_390delG	p.R130fsX3	Homocigosis	SÍ
SKUT1	<i>H. sapiens</i>	Leiomioma de útero	---	---	---	---	---

Las células de todas ellas crecían en monocapa de forma adherente y para ello fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal 10% (*Gibco BRL*-

Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.), Glutamina 1 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 U/mL.

Los cultivos fueron incubados a 37°C en un incubador (*Cultek S.L.U., Madrid, España*) en atmósfera húmeda con 5% CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos o tres días y las células resemebradas en nuevas placas de cultivo cuando alcanzaban la confluencia adecuada.

Para su conservación, las células fueron recogidas y almacenadas en crioviales en nitrógeno líquido (-179°C), donde sobreviven por periodos superiores a tres años en presencia del agente crioprotector DMSO, cuya función es la de sustituir las moléculas de H₂O para evitar la formación de cristales que puedan romper estructuras celulares. Este proceso requiere que el cultivo se encuentre en fase exponencial. Se realizan dos lavados de las células con tampón PBS 1X, se les añade 1 mL de Tripsina y se deja la placa 5 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugan a 1200 r.p.m. durante 5 minutos y se decanta el sobrenadante. El botón celular se resuspende en 700 µL de medio suplementado con 200 µL de suero bovino fetal y 100 µL de DMSO y después de una breve incubación en hielo, se deja a -20°C durante una o dos horas. Una vez transcurrido ese tiempo se mantiene a -80°C durante 24 horas y finalmente se almacena en nitrógeno líquido.

El proceso de descongelación para un nuevo uso del cultivo, ha de ser rápido puesto que el DMSO a temperatura ambiente es tóxico. Se prepara un tubo de 15 mL con 10 mL de medio completo atemperado, y se añade el contenido del criovial descongelado. Entonces se procura que las células se rehidraten y que el DMSO difunda cuanto antes.

4.5.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LÍNEAS CELULARES

Para la extracción de proteínas de placas de cultivo procedentes de líneas celulares se procedió a retirar el medio de cultivo y a realizar tres lavados sobre estos cultivos con PBS 1X. En cada placa de cultivo se añadieron 800 µL de tampón de lisis frío con inhibidores de proteasas (*GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia*). Después de 10 minutos de incubación en hielo, se recogieron las células mediante raspado y se pasaron a tubos Eppendorf®. Los lisados se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 10.000 g, para recoger después los sobrenadantes, que contienen los extractos proteicos totales, y utilizarlos inmediatamente o congelarlos para su conservación a -80°C. La concentración de cada extracto proteico se determinó mediante medición directa en Nanodrop® ND2000 a valores de absorbancia de 260 nm.

4.5.3 WESTERN BLOT

En aquellas muestras de carcinoma endometrial en las que aparecieron mutaciones de significado desconocido no descritas previamente en la literatura se recurrió al uso de la técnica Western blot por inmunodetección específica con anticuerpos, valorando la expresión de las proteínas posiblemente afectadas. Analizamos por tanto la expresión de las proteínas PTEN, PIK3CA y PPP2R1A. De p53 resulta difícil realizar estudios de Western blot debido a su continua expresión y degradación en la célula, es decir, a su corta vida media y a la acumulación de la proteína en el citoplasma en caso de existir una mutación patogénica. Por tanto el análisis de su expresión mediante esta técnica no se incluyó en el estudio.

PREPARACIÓN DEL GEL

La electroforesis en presencia de SDS se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se utilizaron minigeles 0.75 mm de espesor y 10 cm de anchura, siendo la longitud aproximada del gel separador 4.5-5 cm y 1.5 cm la del gel empaquetador. El gel separador se preparó al 8% y en un volumen de 5 mL contenía: 1.35 mL de solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (30%) (*BioRad, California, U.S.A.*), 1.25 mL de 1.5 M Tris/HCl (pH 8.8), 2.40 mL de ddH₂O y 50 µL de SDS al 10%. Para la polimerización de los geles, se añadieron 10 µL de AMPS al 25% y 2.5 µL de TEMED por cada 5 mL de gel. El gel empaquetador se preparó al 4% y contenía: 0.65 mL de la solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (30%), 1.25 mL de 0.5 M Tris/HCl (pH 6.8), 3.05 mL de ddH₂O y 50 µL de SDS al 10%. Para la polimerización de los geles se añadieron 10 µL de AMPS al 25% y 5 µL de TEMED por cada 5 mL de gel.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

Los extractos proteicos utilizados para el análisis fueron cuantificados en el Nanodrop[®]. Se prepararon muestras de 200 µg de proteína a las que se añadieron 3 µL de tampón Laemmli 4X (40% glicerol; 200 mM Tris-HCl (pH 6.8); 10% SDS; 4% β-mercaptoetanol y 0.04% azul de bromofenol). Cada muestra fue desnaturalizada durante 10 minutos a 100°C.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las muestras fueron cargadas en los pocillos del gel de acrilamida y se sometieron a electroforesis durante aproximadamente 1 hora a 150V (tiempo estimado en el cual el frente de electroforesis alcanza el final del gel) y a temperatura 20°C. El tampón de electroforesis en el que se mantuvo siempre sumergido el gel (Running Buffer) estaba compuesto por 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM glicina y 0.1% SDS. Como marcador de peso molecular se usó

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sur África*), donde los tamaños que muestra en kDa son: 170, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 y 10.

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la electrotransferencia de proteínas desde los geles a membranas de PVDF de 0.2 μm (Immun-Blot® PVDF, *BioRad, California, U.S.A.*), usando el sistema de transferencia húmeda de *BioRad (California, U.S.A.)* con un tampón (Buffer de Transferencia) compuesto por 192 mM glicina; 20% metanol y 25 mM Tris/HCl (pH 8.5). Las membranas fueron previamente activadas durante 1 minuto con metanol, hidratadas con agua destilada y humedecidas en tampón de transferencia antes de ser puestas en contacto con el gel. La electrotransferencia se realizó siempre a 4°C durante 1 hora y un voltaje constante de 100V.

TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE

Para verificar la eficiencia de la transferencia, las membranas fueron teñidas de manera reversible con solución Ponceau S durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación continua. Posteriormente, se lavaron en ddH₂O durante 2 minutos y se confirmó la tinción en color rojo del patrón de bandas correspondiente a las muestras bien transferidas. Para desteñir completamente las membranas se mantuvieron en agua destilada y en agitación durante 15 minutos adicionales.

Los geles se tiñeron con solución Azul de Coomassie durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante; y posteriormente se lavaron en ddH₂O durante 30 minutos para comprobar la ausencia de proteínas ya que fueron electrotransferidas previamente a la membrana.

INMUNODETECCIÓN ESPECÍFICA DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

Una vez realizada la transferencia, se lavaron las membranas suavemente con tampón TBS-T (150 mM NaCl; 10 mM Tris (pH 7,3); 0.1 % Tween-20 (*BioRad California, U.S.A.*)) antes de saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas con una solución de bloqueo preparada con 50 mL TBS-T y 5% de leche en polvo descremada. El bloqueo de las membranas se llevó a cabo a 4°C durante 3 horas como mínimo y en agitación suave. A continuación, se procedió a lavar el excedente de solución de bloqueo con tres lavados sucesivos de 5, 7 y 10 minutos cada uno con solución TBS-T y en agitación suave. Posteriormente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente, preparado a la dilución apropiada en TBS-T con 2.5% de BSA (*Bovine Serum Albumin, Sigma*

Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A). Esta primera incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C y en agitación suave. Seguidamente y con el objeto de eliminar el exceso de anticuerpo unido inespecíficamente, se lavaron las membranas tres veces con TBS-T, durante 5, 7 y 10 minutos cada una y en agitación suave. Es en este momento, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario preparado en 10 mL de TBS-T con 5% de leche en polvo descremada y a la dilución apropiada, durante 45 minutos a temperatura ambiente. De nuevo para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se llevaron a cabo tres lavados de 5, 7 y 10 minutos cada uno con TBS-T. La relación de anticuerpos y condiciones utilizados para este análisis de expresión se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección específica de proteínas y las concentraciones usadas para cada uno.

Tipo Ac	Anticuerpo	Origen	Dilución	Fabricante
Primario	Anti-PTEN	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotech
	Anti-PIK3CA	Rabbit	1:1000	Abcam
	Anti-PPP2R1A	Mouse	1:5000	Abcam
	Anti-β-actina	Mouse	1:10.000	Sigma-Aldrich
Secundario	Anti-Mouse	Sheep	1:5000-1:10.000	Sigma-Aldrich
	Anti-Rabbit	Goat	1:10.000-1:12.000	Chemicon International

REVELADO DE LAS MEBRANAS

La detección de la señal se llevó a cabo mediante el método Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (*Millipore, Massachusetts, U.S.A.*). Este método combina un sustrato suplementado por el fabricante que en presencia del anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa HRP (*Horseradish Peroxidase*) se genera un compuesto luminiscente capaz de impresionar una película autorradiográfica de alta sensibilidad Fuji Medical X-Ray Film (*FUJIFILM Corporation, Tokyo*) y que determina el lugar exacto de este. Una vez realizada esta impresión, siempre en ausencia de luz, se procedió al revelado de la película autorradiográfica por impregnación de ésta en soluciones para el revelado (Kodak X-ray developer 1x) y posteriormente con solución para el fijado de la película (Kodak X-ray fixer 1x).

Después de la impresión, las membranas donde se encuentran las proteínas electrotransferidas se deshidrataron y secaron, incubándolas en metanol durante 1 minuto para realizar posteriormente, la detección del control de carga. Para esta detección, se utilizó un anticuerpo anti-β-Actina que reconoce específicamente esta proteína endógena ubicada en el tejido y así se asegura la presencia y cuantificación exacta de las proteínas en la muestra (tabla 6). Esta detección se llevó sobre estas mismas membranas, tras la rehidratación, bloqueo y posterior inmunodetección específica con el método descrito anteriormente.

4.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MMR MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

El análisis de inmunohistoquímica se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Esta técnica permite observar la presencia o ausencia de las proteínas codificadas por los genes implicados en el sistema reparador mediante la tinción del tejido tumoral con anticuerpos específicos para cada proteína con una sensibilidad del 95%.

Se realizó a partir de finas láminas de tejido de tumor parafinado que se desparafinaron y se prepararon para la tinción con el anticuerpo específico para cada proteína. En la tabla 7 se describen los anticuerpos utilizados para la tinción de las proteínas hMLH1, hMSH2 y hMSH6.

Tabla 7: Anticuerpos utilizados para el análisis de la expresión de genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamiento erróneos mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante
Anti-hMLH1	1:20	Becton Dickinson
Anti-hMSH2	Prediluido	Biocare Medical
Anti-hMSH6	Prediluido	Biocare Medical

El análisis de las inmunohistoquímicas de estos genes implicados en el sistema MMR se comenzó a llevar a cabo a partir del año 2009 en las muestras parafinadas procedentes de pacientes con carcinoma de endometrio esporádico. Por ello, de los 86 casos estudiados en nuestro trabajo, sólo se cuenta con dicha información a partir de la muestra número 42 inclusive.

5. ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH)

Dada que la pérdida de heterocigosidad (LOH) resulta ser un evento muy frecuente en la patogénesis de los tumores de endometrio, en aquellos casos en los que aparecieron mutaciones en homocigosis no acompañadas por ningún otro cambio en heterocigosis en el mismo gen, se procedió a la comprobación de la presencia de ambos alelos. El análisis se puede realizar mediante dos métodos: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) o PCR a tiempo real cuantitativa comparativa. Para poder llevar a cabo la RFLP, tiene que darse el caso de que exista una endonucleasa que realice un corte justo en la parte de la secuencia en la que se encuentre el cambio o en algún polimorfismo situado en el mismo gen que aparezca con elevada frecuencia en la población. Para ello primero hay que localizar los sitios de corte de endonucleasas de restricción mediante el programa *SerialCloner 2.0* (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). Si no hay ninguna endonucleasa que corte en el sitio de interés, se procede al estudio mediante PCR cuantitativa comparando el DNA

procedente del tumor con el extraído a partir de la sangre periférica del mismo paciente, en caso de contar con ella.

5.1 MEDIANTE RFLP

En aquellas muestras en las que aparecieron mutaciones en homocigosis en el gen *PTEN* se procedió al estudio del polimorfismo localizado en el intrón 4 (IVS4+109ins5), consecuencia de la inserción de las bases ACTAA.

Para ello, primero se realizó la amplificación del intrón 4 del gen *PTEN* utilizando los oligonucleótidos y condiciones detalladas a continuación (tabla 8):

Tabla 8: Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación del intrón 4 del gen *PTEN* en el estudio de pérdida de heterocigosidad mediante RFLP.

Región	Oligonucleótido sentido 5'-3'	Oligonucleótido antisentido 5'-3'	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
Intrón 4	CTA ATT GCA TAC ACT TAA TC	TAG GAA AAA GTA TTG CAT AAA G	453	56	30	30

Posteriormente se llevó a cabo la digestión del fragmento amplificado con la endonucleasa AfIII (BspTI) (*Fermentas, Glen Burnie, MD*) según las especificaciones del fabricante en cuanto a concentración de reactivos, buffer utilizado (Buffer 0, *Fermentas, Glen Burnie, MD*), temperatura y tiempo necesario de incubación (6 horas a 37°C).

Esta endonucleasa produce un corte en la secuencia de DNA 5'-C*TTAAG-3' de tal forma que cuando no está presente la inserción del polimorfismo IVS4+109ins5, la endonucleasa no produce el corte en la secuencia y podemos ver un único fragmento de un tamaño de 453 pb. Cuando el polimorfismo de la inserción de 5 pb ocurre en ambos alelos se genera una secuencia de corte para la endonucleasa AfIII de tal forma que el resultado de la digestión produce un fragmento de 425 pb y 23 pb; y cuando el polimorfismo se encuentra en heterocigosis, el corte se producirá en un único alelo, generando fragmentos de tamaños 453 pb, 425 pb y 23 pb.

El resultado de la digestión de fragmentos de PCR se resolvió realizando una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% (figura 36).

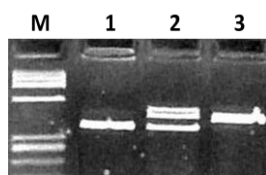


Figura 36: Resultado de la electroforesis en gel de agarosa de la digestión del fragmento de PCR del polimorfismo IVS4+109ins5 del gen *PTEN*. M: Marcador de peso molecular; 1: muestra homocigota con inserción; 2: muestra heterocigota para la inserción; 3: muestra homocigota sin inserción. La banda de 23 pb no se visualiza en los pocillos 1 y 2.

5.2 MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA

Para comprobar la presencia de los dos alelos en los genes *TP53*, *ARID1A* y *BRAF* en muestras de DNA tumoral de carcinoma endometrial, optamos por la técnica de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa. Esta técnica permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación a un termociclador de un lector de fluorescencia, que detecta la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al DNA. La monitorización de esta fluorescencia permite analizar la cinética de la PCR en cada uno de sus ciclos, determinando el número de copias del fragmento de interés al inicio de la reacción. Este valor se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct).

El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

La curva de fusión (*melting*) del producto es otro parámetro que sirve en esta técnica para la caracterización del producto amplificado por su valor de temperatura de fusión (T_m). Esta curva se obtiene tras al finalizar la amplificación y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de la temperatura del producto. La derivada de la curva de fusión revela un pico máximo que corresponde a esa temperatura (figura 37).

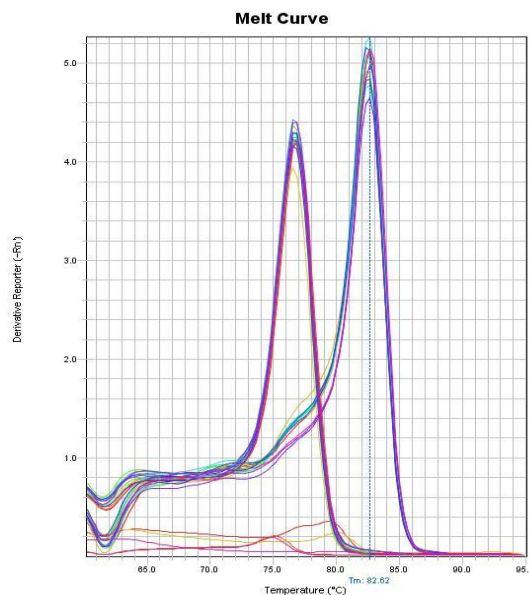


Figura 37: Gráfica de la curva de fusión del producto de amplificación donde se representa en el eje de abscisas la temperatura en grados centígrados y en el eje de ordenadas la fluorescencia en unidades arbitrarias. La T_m corresponde con el punto más alto de fluorescencia del pico de la curva.

El uso de la PCR a tiempo real cuantitativa comparativa relativa, por tanto, permite cuantificar la cantidad inicial de DNA de un determinado fragmento comparando esta amplificación con otra realizada simultáneamente. Para analizar estos cambios relativos, se elige como patrón un

fragmento de referencia en el DNA. Comparando los Ct del fragmento de referencia con el fragmento problema en la muestra de la paciente y de un control, se pueden determinar cambios relativos en la carga genética como pérdidas de heterocigosidad, grandes deleciones o amplificaciones en el gen de interés. De este modo, las cantidades relativas de los dos productos seguirán siendo las mismas si la cantidad de los fragmentos de DNA de partida son iguales; o por el contrario, si hubiera una discrepancia en estos valores iniciales, la cantidad de los fragmentos de DNA amplificados mostraría diferente cinética y por tanto diferente fluorescencia emitida.

Por estas razones, esta técnica requiere la amplificación de varios fragmentos: el fragmento correspondiente a la secuencia de interés, que en el caso de nuestro estudio correspondió los exones 6 y 7 del gen *TP53* y 17 del gen *ARID1A* y el fragmento de referencia, que en nuestro caso fue el gen de copia única *36b4*. Además, fue necesario utilizar un control (DNA de un muestra en la que sepamos que no existe LOH) que fue sometido a las mismas amplificaciones.

Para lograr obtener cantidades iniciales idénticas de todas las muestras a analizar, los DNAs fueron medidos en el Nanodrop®. A continuación se realizaron las diluciones pertinentes con la finalidad de dejar todos los DNAs a una concentración inicial de 15 ng/μL.

Las PCRs se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0.1 mL, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*). En cada placa se llevaron a cabo, por cada muestra, dos reacciones diferentes en pocillos diferentes: una reacción de amplificación del exón a estudiar y una reacción de amplificación del gen *36b4*. Se realizaron tres réplicas de cada amplificación para minimizar la variabilidad de concentración de las muestras.

Las placas fueron cubiertas con láminas transparentes ópticas para que se pudiese leer la fluorescencia a través de ellas (MicroAmp® Optical Adhesive Film, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*).

El equipo empleado para llevar a cabo la PCR a tiempo real fue StepOnePlus™ Real-Time PCR System (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*), compuesto por un termociclador y varios canales de lectura de fluorescencia. El programa utilizado fue el StepOne software 2.1 (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*).

El agente fluoróforo utilizado fue el SYBR Green incluido en la mezcla comercial SYBR® Green PCR Master Mix (*Roche, Basilea, Suiza*). El SYBR Green es un agente intercalante que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces.

Los oligonucleótidos empleados para las amplificaciones y las condiciones de cada una de ellas se muestran en la tabla 9:

Tabla 9: Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones analizadas mediante PCR cuantitativa en los ensayos de pérdida de heterocigosidad (LOH).

Región	Oligonucleótido sentido 5´-3´	Oligonucleótido antisentido 5´-3´	Tamaño (pb)	Tª de anillamiento (°C)
TP53 exón 6	AGC GCT GCT CAG ATA GCG AT	TAA GCA GCA GGA GAG AAA GCC C	331	60
TP53 exón 7	AAG GCG CAC TGG CCT CAT CTT	GAG GTG GAT GGG TAG TAG	266	63
ARID1A exón 17	GTG AGT AAA GCC TGG TCT CGG	CTG AAG AGC CAC GTC CTC AAT	342	62
BRAF exón 11	TCC CTC TCA GGC ATA AGG TAA	TAA CAC TGT TCA GTA TTA T	231	53
36b4	CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC	CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A	74	60

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con las siguientes condiciones: 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix, 0.7 µl de cada oligonucleótido, 1.0 µl de DNA a una concentración de 15 ng/µl y 9 µl de ddH₂O libre de nucleasas. También se realizaron controles negativos con todos los componentes de la reacción sin DNA para asegurar la ausencia de contaminación en las reacciones de amplificación.

El programa de amplificación utilizado para la obtención de las curvas de fusión se expone en la figura 38.

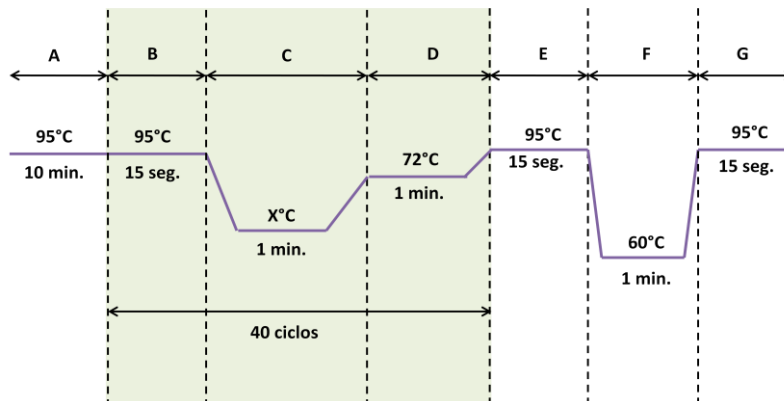


Figura 38: Esquema representativo del programa del termociclador para la cuantificación relativa de fragmentos de DNA mediante PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, donde A es el tiempo de desnaturalización previa, BCD son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación que se repiten 40 ciclos, y EFG es el programa para obtener las curvas de fusión (*melting*) de los fragmentos amplificados. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

6. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI)

Como ya hemos tratado anteriormente, los microsatélites son regiones del genoma que presentan una gran susceptibilidad a desarrollar un alto índice de mutaciones espontáneas tipo inserción o deleción de una de las unidades repetitivas en una población celular con respecto a la línea germinal. Este evento es lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (MSI) y su estudio es posible siempre que se cuente con muestra de DNA procedente de tumor y de sangre.

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Pacientes y Métodos

Nosotros pudimos analizar la MSI en 28 de las 86 pacientes estudiadas en este estudio; para ello se usaron ocho marcadores de microsatélites, entre los que se incluyeron los cinco recomendados en el panel de Bethesda: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250²⁵⁷ (tabla 10).

Tabla 10: Marcadores para el estudio de MSI donde se incluye la localización en el cromosoma y en el gen correspondiente, número de repeticiones que presenta, el fluorocromo modificando el oligonucleótido forward y señalado con un asterisco, así como la secuencia de ambos oligonucleótidos y el tamaño aproximado del producto de PCR.

Marcador	Locus	Secuencia	Nº repeticiones	Fluorocromo	Oligonucleótidos Sentido y antisentido 5'-3'	Tamaño (pb)
BAT25	4q12	Intrón del oncogén c- Kit	1 pb	TET	*TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC	110-130
BAT26	2p22-21	Intrón 5 del gen hMSH2	1 pb	HEX	*TGACTACTTTTGACTTCAGCCAC CATTCAACATTTTAAACCC	100-120
D5S346	5q21-22	Locus del gen APC	2 pb	FAM	*ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT	100-130
D2S123	2p16	Locus del gen hMSH2	2 pb	FAM	*AAACAGGATGCCTGCCTTTA GGACTTCCACCTATGGGAC	200-230
D17S250	17q11.2	Locus cromosoma 17	2 pb	FAM	*GGAAGAATCAAATAGACAAT GCTGGCCATATATATTTAAACCC	140-170
BAT40	1p12	Intrón 2 del gen 2-β-OH-EDH	1 pb	HEX	*ATTAACCTCCTACACCACAAC GTAGAGCAAGACCACCTTG	125-130
PAX6	11p13	Locus del gen Paired Box	1 pb	HEX	*ACTTCTAGGACTCATTTCCTC CTGAATTAACACAATATTTTC	130-140
MYCL1	1p34.4	Locus del gen MYCL	1 pb	HEX	*TGGCGAGACTCCATCAAAG CTTTTAAAGCTGCAACAATTTTC	160-170

Las reacciones de amplificación se realizaron con 0.08 µL de GoTaq™ DNA polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A.) 5U/µL, 1.0 µL de 5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 0.8 µL de solución de MgCl₂ 2.5mM, 1.0 µL de dNTPs 25 µM, 0.3 µL de cada oligonucleótido 0.3 µM y 1.0 µL de DNA obtenido por los métodos anteriormente descritos (concentración entre 0.1 y 0.2 µg/mL). El volumen final de reacción fue en todos los casos de 10 µL que se ajusto con ddH₂O libre de nucleasas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de *Life Technologies-Invitrogen* cuyas condiciones generales de amplificación se muestran en la figura 39.

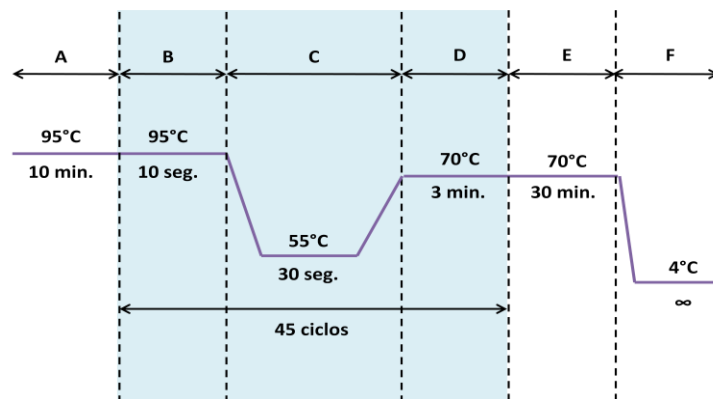


Figura 39: Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de fragmentos de DNA donde A es el tiempo de desnaturalización previa, BCD son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación que se repiten 45 ciclos y E es el tiempo de extensión final seguido de una bajada de temperatura para la conservación del producto (F). Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

El análisis de los fragmentos amplificados se llevó a cabo resuspendiendo en 1 μL de producto amplificado 12 μL de formamida desionizada y 0.2 μL de marcador de tamaños ROX (GenScan™ 500 ROX™, Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.). Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.) comparando los electroferogramas procedentes de las muestras de DNA de sangre periférica con los procedentes de tejido tumoral para ver diferencias de tamaño de secuencia o de pico³⁹¹ (figura 40).

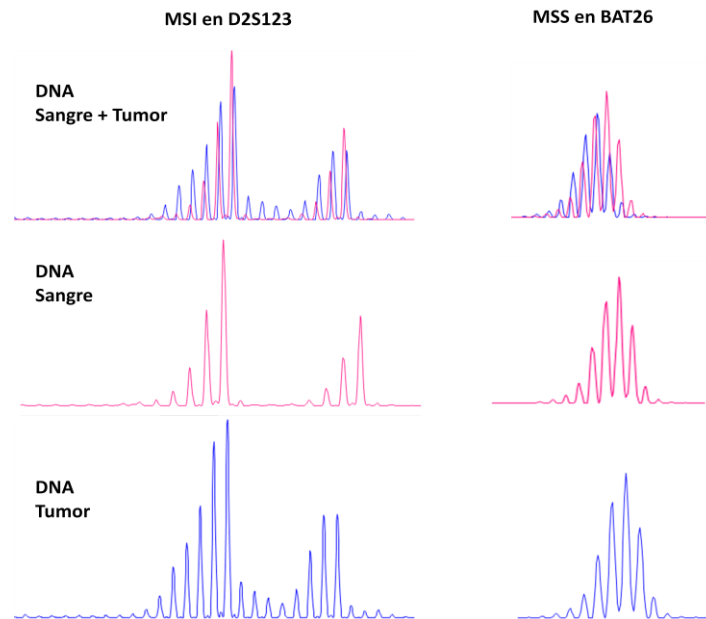


Figura 40: Ejemplo de los electroferogramas de dos microsatélites en los que se observa que, cuando se compara el DNA de la sangre con el del tumor, la existencia de una inestabilidad en el caso del microsatélite D2S123 y de estabilidad en el caso de BAT26.

7. ESTUDIO DE OTRAS ALTERACIONES EN EL MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR)

La inestabilidad de microsatélites y la ausencia de expresión de los genes implicados en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR), muchas veces no se corresponden con el número de mutaciones encontradas. Por tanto, con frecuencia, se recurre al estudio de otras modificaciones que pudiesen participar en la alteración de su función como son los grandes reordenamientos (amplificaciones y deleciones de grandes fragmentos del gen) o la metilación de sus promotores. En nuestro caso se llevó a cabo el estudio de grandes reordenamientos en aquellas muestras cuya inmunohistoquímica de hMLH1, hMSH2 y hMSH6, realizada en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, fue negativa y además no presentaron mutaciones

patogénicas en esos genes que pudiesen explicarla. El estudio del estado de metilación de sus promotores fue realizado en las 86 muestras.

7.1 ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS MEDIANTE MLPA EN LOS GENES *HMLH1*, *HMSH2* Y *HMSH6*

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* se empleó la técnica de amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)). Es un método empleado para establecer el número de copias existente en hasta 45 secuencias de DNA en una única reacción. Fue descrito por Schouten en 2002³⁹² y consta de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación.

Cada reacción de amplificación consta de dos tipos diferentes de sondas específicas (figura 41), que llevan incorporado uno de los oligonucleótidos universales empleados para la amplificación final de los fragmentos. Con ello se reduce la inespecificidad de la técnica, puesto que es imprescindible que ambas sondas reconozcan las regiones de unión para que se lleve a cabo la amplificación.

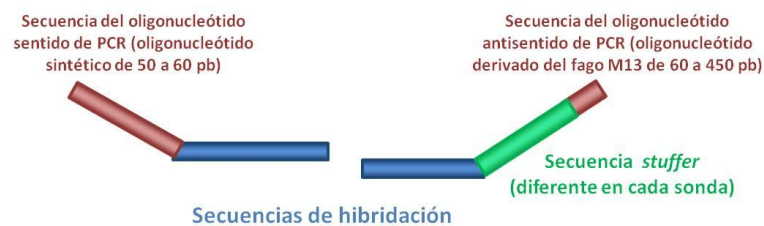


Figura 41: Esquema de las sondas utilizadas para los ensayos de MLPA.

En un primer paso, la mezcla de las sondas de MLPA se añade al DNA genómico previamente desnaturalizado. Las dos partes de la sonda hibridan con secuencias diana adyacentes y ligan mediante una enzima ligasa termoestable (figura 42).

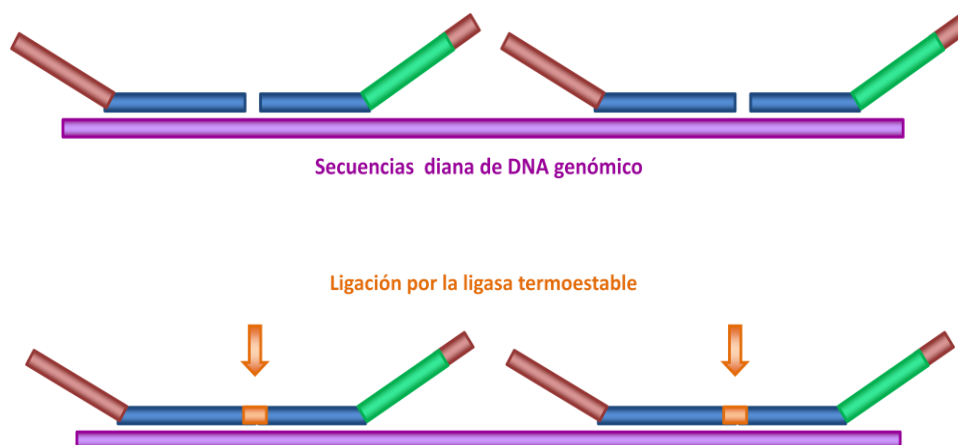


Figura 42: Hibridación en el DNA genómico y ligación de las sondas utilizadas para los ensayos de MLPA

La secuencia que proporcionan las dos sondas ligadas sirve como molde para la amplificación, utilizando oligonucleótidos universales y específicos de las sondas empleadas anteriormente marcados con un fluorocromo en uno de sus extremos. Los productos amplificados se someten a una cromatografía capilar y el resultado se visualiza en forma de electroferograma.

El kit utilizado para el análisis de deleciones o reordenamientos de los genes hMLH1 y hMSH2 es SALSA P003 MLH1/MSH2 y para hMSH6, SALSA P072 MSH6 (*MCR-Holland, Ámsterdam, Holanda*). En el de *hMLH1* y *hMSH2*, se incluye una mezcla de 46 sondas para los 19 exones de *hMLH1* y los 16 exones de *hMSH2* y 9 sondas para otras regiones cromosómicas que sirven de control interno del proceso. Además, incluye 4 fragmentos que sirven para determinar que la cantidad de DNA empleada, la desnaturalización e hibridación del proceso, son correctas. El total de material amplificado genera fragmentos de entre 130 a 490 pb, según especificaciones del fabricante. En el caso del estudio de *hMSH6*, la mezcla contiene 15 sondas para los 10 exones del gen y 14 sondas para los controles internos. Para la comprobación de la cantidad, desnaturalización e hibridación adecuadas, se incluyen 8 sondas más. Los fragmentos generados tienen un tamaño entre 130 y 436 pb. La relación de sondas utilizadas, los tamaños de amplificación así como la región donde se localizan están recogidos en las tablas contenidas en el anexo 2 de este trabajo.

La preparación de las muestras para los ensayos de MLPA parten de 100 ng de DNA diluidos en ddH₂O hasta un volumen de 5 µL y las condiciones de desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación fueron las estipuladas por el fabricante con unas ligeras modificaciones que se exponen en la figura 43.

Para comprobar la correcta amplificación, se realizó una electroforesis horizontal en un gel al 2% de agarosa mediante el procedimiento anteriormente descrito, cargando 6 µl de cada producto de PCR en los pocillos del gel.

El análisis de los fragmentos se realizó preparando cada muestra con 12 µL de formamida desionizada, 0.2 µL del marcador de tamaños ROX (GenScan™ 500 ROX™, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) y 2 µL del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*).

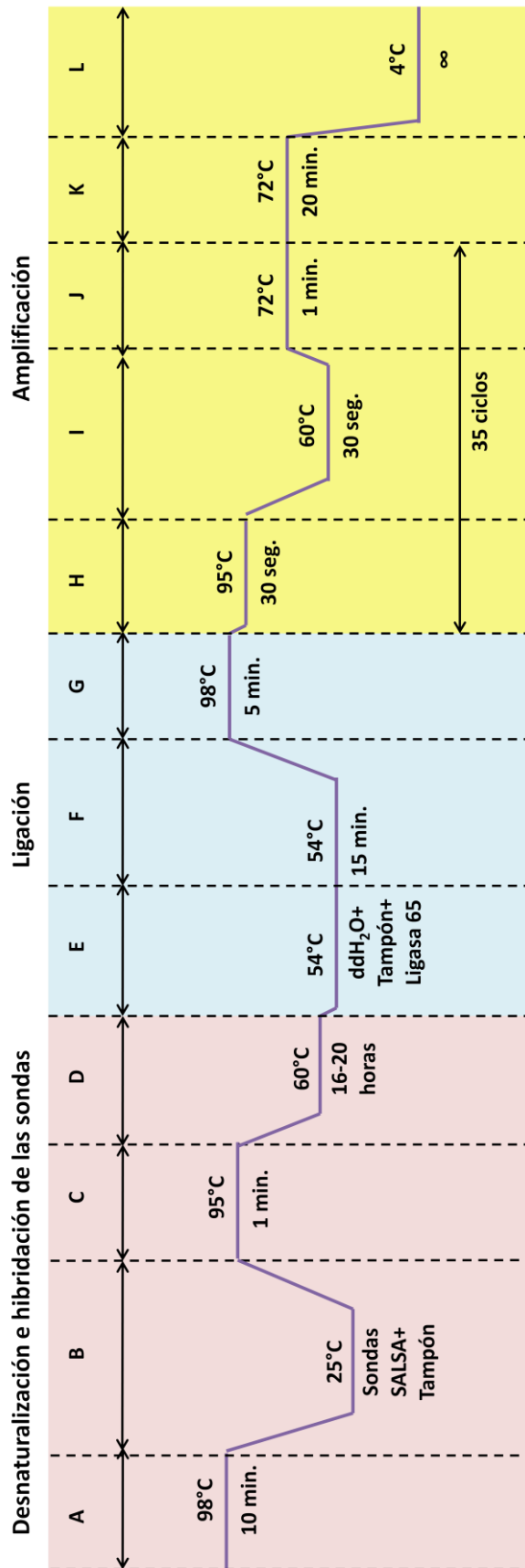


Figura 43: Esquema representativo del procedimiento para los pasos de desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación de los ensayos de MLPA, donde A es la fase de desnaturalización de DNA de la muestra. Posteriormente se añade el mix de sondas (B), seguido de la fase de hibridación de estas sondas (C y D). La fase de ligación consta de un primer periodo donde se añade los reactivos que contienen la enzima ligasa (E) seguido del periodo donde se produce la inactivación de esta enzima (F). En la etapa de amplificación, el esquema seguido es semejante a los anteriores descritos. En esta fase se añaden todos los reactivos necesarios suministrados por el proveedor (Taq Polimerasa, oligonucleótidos, tampones específicos, etc.). Consta de una primera etapa de desnaturalización de DNA (H), seguido de una etapa de anillamiento de los oligonucleótidos universales marcados (I) y un periodo de extensión por la Taq Polimerasa (J). Todo este proceso se repite durante 35 ciclos y se concluye con un último periodo de extensión final (K). El último periodo (L) está destinado a la conservación del producto generado.

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Pacientes y Métodos

Los resultados se analizaron mediante comparación del valor de las alturas de los picos generados en el electroferograma por los productos de amplificación de cada muestra y una media de los valores de la altura de esos mismos picos producto de la amplificación de tres muestras control que no presentan carcinoma endometrial. Para esta comparación se procedió a realizar un promedio de los valores generados para cada control mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Valor control} = \frac{\text{Altura de pico A/Media de las alturas del 1º,2º,etc.,pico control de los controles}}{\text{Altura de pico A/Media de las alturas de los picos A de los controles}}$$

De esta manera se generan 9 valores control por cada pico (9 amplificaciones de regiones cromosómicas diversas que sirven de control interno de la reacción) sobre los que se calculó la media. La falta de alteraciones (deleciones o inserciones) en los productos amplificados genera valores de 1 ± 0.2 . La presencia de deleciones de un alelo genera valores promedio de 0.5 ± 0.2 , y amplificaciones genera valores de $1.5 - 2 \pm 0.2$, en función del número de copias adquiridas. Cada muestra fue analizada mediante este método por duplicado.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante los ensayos de MLPA en los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*, se recurrió a la técnica de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa anteriormente expuesta en este trabajo utilizando los oligonucleótidos contenidos en la siguiente tabla (tabla 11):

Tabla 11: Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la comprobación, mediante PCR cuantitativa, de las regiones alteradas según los resultados obtenidos en los ensayos de MLPA.

Región	Oligonucleótido sentido 5´-3´	Oligonucleótido antisentido 5´-3´	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)
<i>hMLH1</i> ex 3	CAA GAA AAT GGG AAT TCA AAG AGA T	CTA ACA AAT GAC AGA CAA TGT CAT CAC	241	63
<i>hMLH1</i> ex 10	CTG AGG TGA TTT CAT GAC TTT GTG T	GAG GAG AGC CTG ATA GAA CAT CTG T	251	
<i>hMSH2</i> ex 8	TGA TGC TTG TTT ATC TCA GTC AAA ATT	AAT CTA CAA ACT TTC TTA AAG TGG CCT T	257	
<i>hMSH2</i> ex 11	ATA TGT TTC ACG TAG TAC ACA TTG CTT CTA	TCA AAT ATC ATG ATT TTT CTT CTG TTA CC	249	64
<i>hMSH6</i> ex 1*	TGT TGA TTG GCC ACT GGG	CAA CCC CCT GTG CGA GCC TC	463	
36b4	CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC	CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A	74	60

*La cantidad de oligonucleótido añadida fue la mitad tanto para el sentido como para el antisentido.

7.2 ESTUDIO DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES *HMLH1*, *HMSH2* Y *HMSH6*

El método MS-MLPA (*Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica especial derivada del MLPA donde se evalúa el estado de la metilación de los promotores de los genes sin necesidad de tratamientos previos del DNA con bisulfito, además de los cambios en el número de copias del gen³⁹³. Este método, al igual que en el MLPA también se compone de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación; salvo por una digestión previa al paso de amplificación final.

Las sondas utilizadas en MS-MLPA son similares a las utilizadas en MLPA excepto por una secuencia localizada en la región de hibridación que contiene un sitio de restricción para la endonucleasa específica de metilación Hha1 que reconoce y produce un corte en la secuencia 5'-GCGC-3' cuando esta no se encuentra metilada (figura 44).

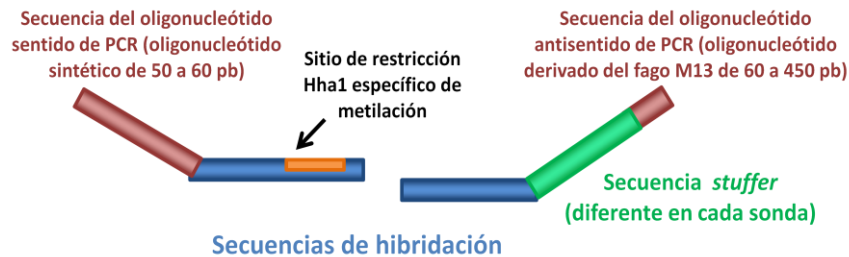


Figura 44: Esquema de las sondas utilizadas para los ensayos de MS-MLPA. A diferencia de las usadas para MLPA, estas sondas contienen un sitio de restricción para la endonucleasa Hha1.

El kit utilizado para el análisis del estado de la metilación de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* es SALSA ME011-B1 MMR (*MCR-Holland, Ámsterdam, Holanda*). Este kit contiene una mezcla de 38 sondas para 9 regiones del promotor del gen *hMLH1*, 4 regiones del gen *hMSH2* y 3 regiones del gen *hMSH6*; y 25 sondas para otras regiones promotoras de reparadores y regiones promotoras que sirven de control interno del proceso. Además, incluye 4 fragmentos que sirven para determinar que la cantidad de DNA empleada así como la desnaturalización e hibridación del proceso, son correctas. El total de material amplificado genera fragmentos de entre 130 a 418 pb, según especificaciones del fabricante. La relación de sondas utilizadas, los tamaños de amplificación así como la región donde se localizan están recogidos en anexo 3 de este trabajo.

Los ensayos de MS-MLPA se realizaron en los 86 DNA extraídos a partir de las muestras de carcinoma endometrial. La preparación de las muestras para los ensayos partió de 100 ng de DNA diluidos en ddH₂O hasta un volumen de 5 µL. Los ensayos se realizaron cumpliendo con las condiciones estipuladas por el fabricante de desnaturalización, hibridación, digestión-ligación y amplificación, en paralelo con los mismos ensayos donde no se realizó la fase de digestión para realizar posteriormente la comparación.

Para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos, se realizó una electroforesis horizontal en un gel al 2% de agarosa mediante el procedimiento anteriormente descrito, cargando 6 µl de cada producto de PCR en los pocillos del gel.

El análisis de los fragmentos se realizó preparando cada muestra con 12 µL de formamida desionizada, 0.2 µL del marcador de tamaños ROX (GenScan™ 500 ROX™, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) y 2 µL del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) (figura 45).

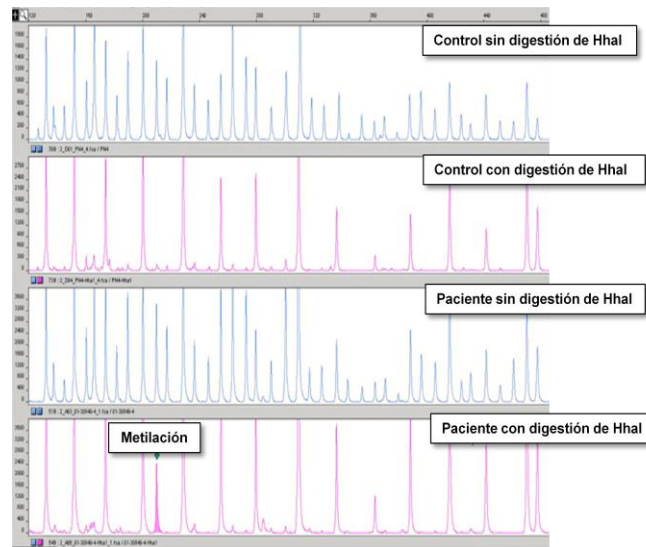


Figura 45: Electroferogramas obtenidos en los ensayos de MS-MLPA en los que se observan los patrones resultado de un control sin digerir y un control digerido por la endonucleasa HhaI, una muestra de un tumor sin metilación en el promotor del gen estudiado y un tumor metilado en el que sí existe digestión con la encima HhaI.

Los electroferogramas obtenidos se analizaron mediante el mismo método que el MLPA. Para el análisis del estado de la metilación de los promotores, los cálculos se realizaron comparando el valor obtenido de la normalización de los picos de las muestras no digeridas con las sometidas a la digestión (ratio de metilación). El estado de la metilación de cada promotor estudiado se realizó obteniendo el valor estadístico de la mediana. Los valores de mediana inferiores a 0.3 fueron considerados como promotor no metilado, los valores comprendidos entre 0.3 y 0.75 fueron considerados como promotor moderadamente metilado y los valores de mediana mayores de 0.75 fueron considerados como promotor altamente metilado.

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS HISTONAS DESACETILASAS (HDAC) 1, 2 Y 3.

El análisis de la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 se realizó mediante la técnica del Western blot en las 86 muestras de carcinoma de endometrio.

El protocolo desarrollado fue idéntico al descrito anteriormente en este trabajo para el estudio de expresión de proteínas cuyo DNA se veía afectado por alguna mutación de significado desconocido.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes (tabla 12):

Tabla 12: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección específica de las proteínas HDACs y las concentraciones usadas para cada uno.

Tipo Ac	Anticuerpo	Origen	Dilución	Fabricante
Primario	Anti-HDAC1	Rabbit	1:2000	Abcam
	Anti-HDAC2	Rabbit	1:2000	Abcam
	Anti-HDAC3	Rabbit	1:2000	Abcam
	Anti- β -actina	Mouse	1:10.000	Sigma-Aldrich
Secundario	Anti-Rabbit	Goat	1:10.000	Chemicon International

Como las HDACs estudiadas poseen pesos moleculares similares, las bandas específicas de las tres que aparecen en la membrana después del revelado se solapan. Por ello no es posible hacer un bloqueo después del primer revelado y volver a incubar con el siguiente anticuerpo sino que es necesario realizar la electroforesis de proteínas de nuevo cada vez que se quiera estudiar una HDAC diferente.

Para la comprobación de la presencia de extracto proteico se realizó también la segunda incubación con el anticuerpo específico para β -actina previo bloqueo de la membrana ya utilizada para el estudio de la HDAC.

9. ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA

El estudio de la medida de la longitud telomérica de las 86 muestras fue llevado a cabo durante la estancia de investigación realizada en el grupo de Oncogenetics dirigido por Professor Rosalind Eeles, cuyo laboratorio se sitúa en el Institute of Cancer Research de Sutton (Reino Unido).

El protocolo seguido fue distinto al descrito anteriormente en este trabajo para PCR cuantitativa comparativa ya que el experimento se desarrolló tal y cómo se estaba llevando a cabo en el laboratorio de Rosalind Eeles, aunque con idéntica base teórica³⁹⁴.

El gen de referencia utilizado fue de nuevo *36b4* con los mismos oligonucleótidos para su amplificación mostrados anteriormente. Los oligonucleótidos para la reacción de amplificación de los telómeros se muestran a continuación (tabla 13):

Tabla 13: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los telómeros mediante PCR cuantitativa.

Región	Oligonucleótido sentido 5'-3'	Oligonucleótido antisentido 5'-3'
Telómeros	GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT	CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT
	TAC CCT	GTT TGG GTT

La eficiencia de la PCR obtenida en la puesta a punto realizada anteriormente por el grupo fue de 76.67% para la amplificación de los telómeros y de 75.45% para la del gen *36b4*.

Nuestras muestras fueron preparadas en diluciones 1:10 y enviadas al Institute of Cancer Research para llevar a cabo su análisis una vez comenzada la estancia. Todas ellas fueron

cuantificadas en un Nanodrop® ND1000 (*Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sur África*). A continuación se realizaron los cálculos pertinentes para dejarlas a una concentración de 5 ng/μL en un volumen de 30 μL. La dilución se realizó en placa no óptica de 96 pocillos (SuperPlate™ Skirted 96-Well PCR Plate AB-2800, *Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sur África*), colocando cada muestra en un pocillo diferente y dejando uno vacío que serviría como negativo.

Se aplicó un *spin* para que todo el contenido de los pocillos se depositase en el fondo de los mismos y gracias al robot Hamilton Microlab STAR se distribuyeron 4 μL de las diluciones a 4 pocillos diferentes de una placa óptica de 384 pocillos. Esto se realizó previa programación con el MicroLab software. Una vez finalizado el proceso se volvió a aplicar un *spin* y se dejó la placa encima de la superficie de trabajo durante dos días y solo tapada con un pañuelo de papel. El objetivo de este paso fue la evaporación del agua y secado del DNA de todas las muestras.

Una vez transcurridos los dos días, se realizó la reacción de PCR cuantitativa comparativa relativa. Para ello se prepararon dos mezclas de reactivos cuya única diferencia fueron los oligonucleótidos y la cantidad añadida de cada uno de ellos. Cada pocillo constó de 5 μL de Kapa™ Syber® Fast qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism (*Kappa Biosystems, Massachusetts, U.S.A.*), 0.3 μL de oligonucleótido sentido (10 μM), 0.9 μL ó 0.5 μL de oligonucleótido antisentido (10 μM) para la reacción de amplificación de telómeros o de 36b4 respectivamente 20 ng de DNA seco (4 μL por 5 ng/μL) y ddH₂O hasta completar un volumen final de 10 μL.

De cada una de las muestras se realizaron dos réplicas por cada reacción de amplificación, es decir, dos réplicas para la amplificación de telómeros y dos réplicas para la reacción de amplificación del gen 36b4. Se prepararon las 2 mezclas de reacción en recipientes separados y con una pipeta multicanal se añadieron 20 μL de mezcla de reacción para telómeros a cada pocillo de una placa no óptica de 96 pocillos y otros 20 μL de mezcla de reacción para el gen 36b4 a cada pocillo de otra placa no óptica de 96 pocillos. Nuestras 86 muestras ocuparon 344 pocillos (86 muestras x 2 réplicas x 2 reacciones) más 4 pocillos que funcionaron de controles negativos al sólo añadirles los reactivos y no contener ningún DNA. Fue por ello por lo que utilizamos como placas finales, placas ópticas de 386 pocillos (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate With Barcode, *Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*).

La placa óptica de 384 pocillos con los DNAs secos y las placas de 96 pocillos con mezcla para telómeros y mezcla para 36b4 fueron colocadas en el robot Hamilton que realizó las mezclas oportunas previa programación con el mismo software (figura 46).

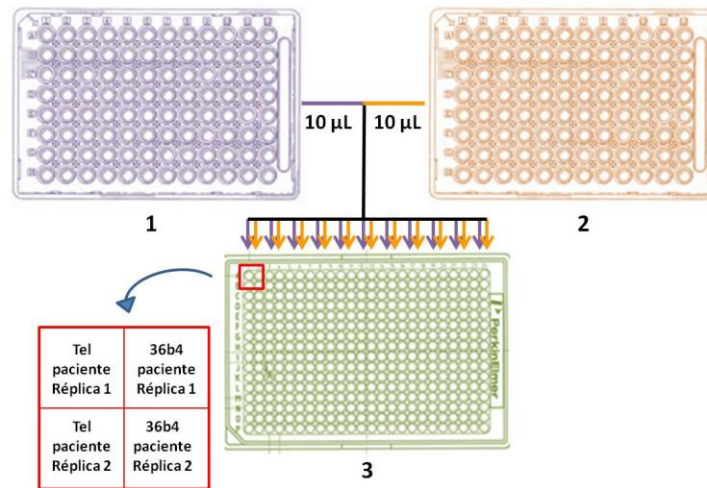


Figura 46: Representación de la confección de la placa de 384 pocillos con las réplicas correspondientes de cada tumor tanto para la reacción de amplificación de telómeros como para la del gen *36b4*.

Finalmente tapamos la placa de 384 pocillos con un adhesivo óptico (MicroAmp™ Optical Adhesive Film), le aplicamos un *spin* y la dejamos reposar durante una hora a 4°C con objeto de homogeneizar las mezclas lo máximo posible.

Una vez transcurrido este tiempo se realizó la reacción de amplificación de telómeros y *36b4* en el aparato Applied Biosystems 7900HT real-time PCR (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.) siguiendo las condiciones mostradas en la figura 47 y gracias al software RQ Manager software v. 1.2.

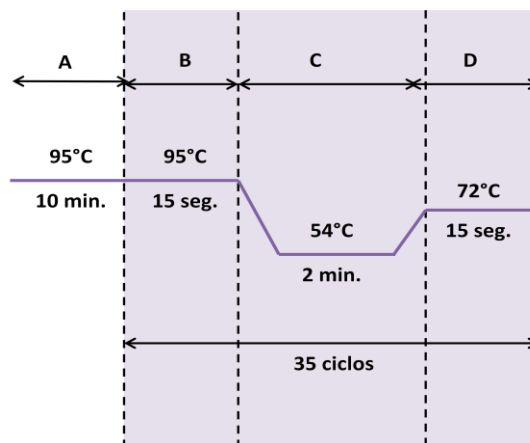


Figura 47: Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de telómeros mediante PCR cuantitativa donde A es el tiempo de desnaturalización previa y BCD son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación que se repiten 35 ciclos. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

Una vez terminado el proceso, se llevó a cabo el análisis de las amplificaciones con el mismo software que nos facilitó las gráficas de amplificación y los valores de las T_m para cada una de las reacciones (figura 48)

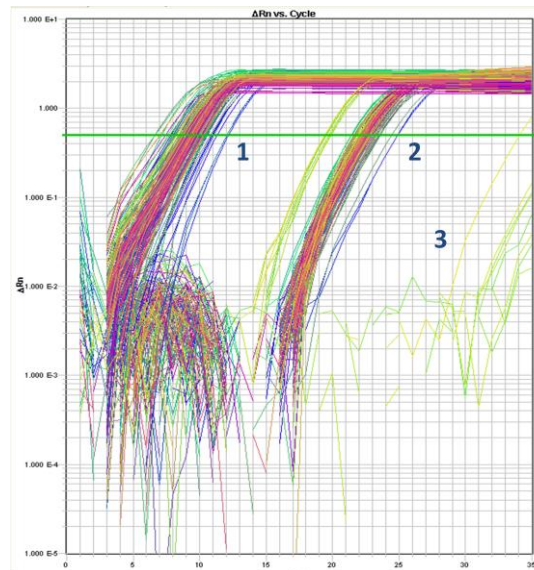


Figura 48: Gráficas resultado de la amplificación de los telómeros (1) y del gen 36b4 (2) mediante PCR cuantitativa. (3) Controles negativos.

10. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS *TERT-1327C>T* Y *TERC-63G>A* MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Realizamos el estudio de los polimorfismos *TERT-1327C>T* (rs2735940) y *TERC-63G>A* (rs2293607) en las 86 muestras de tumor de endometrio a fin de encontrar diferencias en la distribución alélica que pudiesen asociarse a patrones histológicos o grados tumorales diferentes. Ambos polimorfismos se han visto asociados a un acortamiento telomérico debido a una menor actividad de la telomerasa que conlleva una ralentización del alargamiento de los telómeros^{395,396}. Concretamente, el genotipo C/T de *TERT-1327C>T* y el alelo G en *TERC-63G>A* han sido descritos como factores asociados a telómeros más cortos en sangre periférica.

El análisis de la discriminación alélica se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real empleando sondas TaqMan MGB[®] (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*). Estas sondas son oligonucleótidos marcados que hibridan específicamente y constan de:

- Un donador (fluorocromo) en el extremo 5', que absorbe energía y pasa al estado excitado, de manera que al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.
- Un aceptor o *quencher* en el extremo 3' que acepta la energía de la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor. El espectro de emisión del fluorocromo correspondiente se ha de solapar con el espectro de absorción del

quencher. Para que la fluorescencia no sea emitida permanentemente, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas.

Junto al *quencher*, se encuentra una modificación MGB (*minor groove binding*) que permite aumentar la temperatura de los ensayos sin tener que ampliar la longitud de la sonda y, a su vez, mejora considerable la unión específica de la sonda aumentando la precisión de la discriminación alélica.

En los ensayos de discriminación alélica realizados para este estudio, los fluorocromos utilizados para el reconocimiento de cada alelo han sido VIC y FAM (tabla 14).

Tabla 14: Espectros de excitación y emisión de las sondas VIC y FAM utilizadas para PCR a tiempo real.

Sonda	Espectro de excitación (nm)	Espectro de emisión (nm)
VIC	528	546
FAM	492	515

Durante la PCR a tiempo real, mientras la sonda conserve su integridad, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda hibrida con su cadena complementaria de DNA. La enzima DNA polimerasa, al poseer actividad 5´exonucleasa, cuando se desplaza a lo largo de la cadena en su capacidad sintética, hidroliza el extremo libre 5´ de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor se encuentran en ese momento en una posición alejada el uno del otro de forma irreversible, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 49).

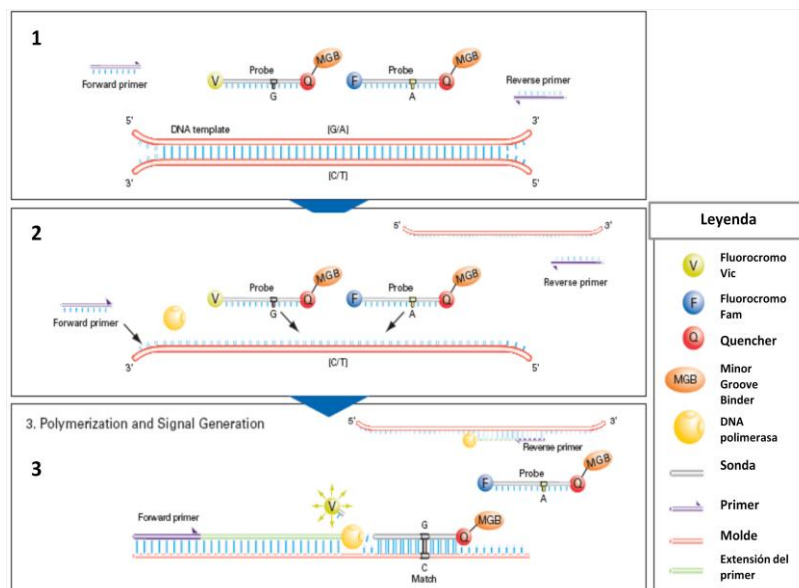


Figura 49: Mecanismo de la PCR con sondas *TaqMan*: 1. Componentes de la reacción, 2. Desnaturalización del DNA molde y alineamiento de los componentes de la reacción, 3. Polimerización y generación de la señal.

Las condiciones experimentales fueron las mismas para el estudio de los dos polimorfismos a excepción de las sondas y los oligonucleótidos utilizados. Cada reacción constó de 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.), 0.25 µL de la mezcla comercial compuesta por las sondas y los

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Pacientes y Métodos

oligonucleótidos (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*), 0.5 µL de DNA del tumor y ddH₂O hasta alcanzar un volumen final de 10 µL.

Las PCRs se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0.1 mL cubiertas con láminas transparentes ópticas MicroAmp® Optical Adhesive Film. Se utilizó el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System y el programa StepOne software 2.1. El programa aplicado fue el siguiente (Figura 50):

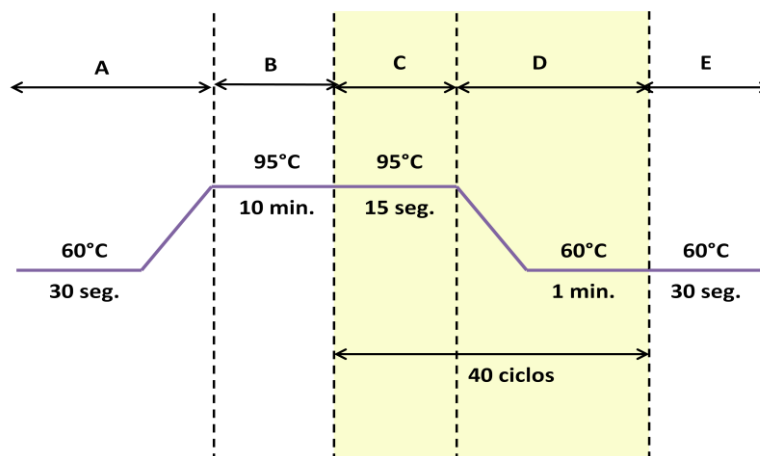


Figura 50: Esquema representativo del programa del termociclador para la realización del genotipado de los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A* mediante PCR a tiempo real, donde B es el tiempo de desnaturalización previa, C es el tramo de desnaturalización y anillamiento de los oligonucleótidos y la sonda y D el de elongación. C y D se repiten 40 ciclos. E es el tiempo de extensión final. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

Las secuencias de las sondas utilizadas se detallan a continuación (tabla 15):

Tabla 15: Secuencia de las sondas VIC y FAM en dirección (5'-3') utilizadas para el genotipado de los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A* mediante PCR a tiempo real.

Polimorfismo	Código comercial	Secuencia 5'-3'(VIC/FAM)
<i>TERT-1327C>T</i> (rs2735940)	C_1839086_10	TCGTCTTGTAATACTTAGGATTAC[AG]GGTCGCTCTTCTAGAAATCCCCTTA
<i>TERC-63G>A</i> (rs2293607)	C_16184740_10	AGGTTTGGGGGTTCAACAAGCCCCCA[C/T]TGCCGGCGAGGGGTGACGGATGCGC

Las gráficas de puntos resultantes permiten la discriminación alélica en cada uno de los tumores para el polimorfismo estudiado (figura 51).

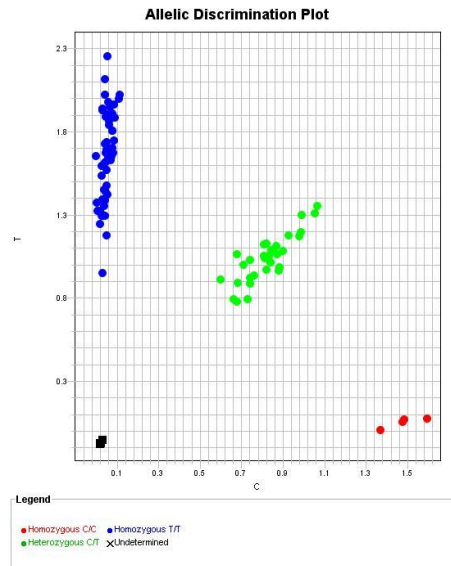


Figura 51: Representación de los resultados del genotipado en la que cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

11.1 SPSS

El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS v.18.0 para PC.

Las variables estudiadas fueron de tipo cualitativo. Se utilizó el análisis del chi-cuadrado (χ^2) para determinar las diferencias en frecuencia de aparición de las diferentes alteraciones entre los distintos grupos.

11.2 GENEX

El análisis estadístico de la medida de la longitud telomérica se realizó gracias a los programas StepOne software 2.1 (*Life Technologies, California, U.S.A.*) y GenEx 5.3.6 Enterprise (*MultiD Analyses AB, Göteborg, Suecia*).

El programa GenEx 5.3.6 Enterprise permite agrupar un elevado número de resultados obtenidos en diferentes placas de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa relativa, elaborando un estudio conjunto previa exportación de los datos desde el software StepOne al software GenEx.

GenEx es un programa adecuado para el análisis de datos de PCR cuantitativa a tiempo real comparativa relativa ya que permite realizar una corrección de las frecuencias de amplificación del fragmento a estudiar y del gen reportero. Además, normaliza las distintas réplicas de una

misma muestra y a su vez normaliza todos los resultados con el DNA de referencia presente en cada placa. Todo ello teniendo en cuenta la eficiencia de nuestra PCR según los datos obtenidos en la puesta a punto de la técnica.

Finalmente, dependiendo de que nuestros datos sean paramétricos o no paramétricos, realiza un análisis estadístico de los mismos con el test adecuado hallando la significación de los datos a comparar.

11.3 MULTBILOT

MULTBiplot (MULTivariate analysis using BIPLot) se trata de un programa utilizado para realizar análisis multivariante Biplot. Está diseñado por el Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca y contiene diferentes herramientas para la representación de datos multivariantes entre las que se encuentra CLASSICAL BIPLot. Realizamos una representación HJBiplot para analizar la afinidad existente entre las diferentes alteraciones y los tipos y grados de tumor. Para ello representamos los tipos y grados de tumor como variables y las frecuencias de aparición de las alteraciones estudiadas en el mismo plano³⁹⁷.

En nuestro trabajo hemos estudiado un total de 86 muestras de DNA procedentes de tumores de endometrio y muestras de DNA de sangre periférica de 28 de las pacientes incluidas en el estudio. Analizamos aquellas alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en cada una de ellas y realizamos un estudio global caracterizando cada uno de los tipos y subtipos tumorales según las clasificaciones clínico-patológica e histológica.

En primer lugar estudiamos los genes con una mayor implicación en la tumorigénesis del carcinoma de endometrio divididos en tres grupos: supresores tumorales (*PTEN*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1*, *PPP2R1A* y *ARID1A*), oncogenes (*PIK3CA*, *CTNNB1*, *KRAS*, *BRAF* y *EGFR*) y genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamiento erróneos (*hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*). Además también analizamos posibles reordenamientos en los genes implicados en el mecanismo MMR así como la inestabilidad de microsatélites en aquellos pacientes de los que dispusimos muestra de tejido tumoral y sangre.

En segundo lugar, realizamos un análisis de algunos procesos epigenéticos que puedan afectar al desarrollo del tumor tales como la metilación de las regiones promotoras de los genes MMR o la expresión de las HDAC

Finalmente quisimos determinar las posibles diferencias en la longitud de los telómeros de los diferentes tipos y grados de tumor, así como su relación con los polimorfismos de la telomerasa *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A*.

A continuación exponemos los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados en este trabajo.

RESULTADOS



1. ESTUDIO DE GENES ASOCIADOS A CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

El número total de mutaciones encontradas en nuestro trabajo fue de 213 en 14 genes estudiados, de las cuales 99 estaban descritas y 114 se consideraron de significado desconocido o patogénicas (tabla 16).

Tabla 16: Resumen del número de mutaciones patogénicas descritas, polimorfismos descritos y alteraciones no descritas observadas en nuestro trabajo para cada uno de los genes estudiados.

TIPO	GEN	DESCRITAS		NO DESCRITAS
		PATOGÉNICAS	POLIMORFISMOS	
SUPRESORES DE TUMORES	<i>PTEN</i>	26	1	22
	<i>TP53</i>	18	8	1
	<i>CDKN2A</i>	0	1	3
	<i>CDH1</i>	0	5	8
	<i>PPP2R1A</i>	3	0	27
	<i>ARID1A</i>	9	0	43
ONCOGENES	<i>PIK3CA</i>	8	1	7
	<i>CTNNB1</i>	7	0	0
	<i>KRAS</i>	4	0	0
	<i>BRAF</i>	1	0	1
	<i>EGFR</i>	0	1	1
MMR GENES	<i>hMLH1</i>	2	2	0
	<i>hMSH2</i>	0	2	1
	<i>hMSH6</i>	0	0	0

1.1 GENES SUPRESORES DE TUMORES

1.1.1 ESTUDIO DEL GEN *PTEN*

El estudio del gen *PTEN* se llevó a cabo estudiando los 9 exones y sus regiones intrónicas adyacentes; además se realizaron estudios de pertenencia alélica en los casos en los que se encontraron diferentes mutaciones en el mismo exón y se caracterizaron las mutaciones no descritas mediante los programas de predicción de patogenicidad y el estudio de la expresión de la proteína PTEN en dichos tumores.

El estudio del gen *PTEN* mostró un elevado porcentaje de mutaciones. Fue frecuente la aparición de más de una alteración en un mismo tumor y algunas de ellas aparecían en más de un caso. Tan sólo tres mutaciones aparecieron en homocigosis. El estudio del DNA procedente de la sangre periférica de los pacientes 3, 17, 21, 23, 37, 42, 44, 52, 54, 65, 80 y 86 no mostró ninguna mutación, descartando que se tratase de mutaciones germinales (tabla 17).

Resultados

Tabla 17: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *PTEN*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Las mutaciones descritas por nosotros como patogénicas, en amarillo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco. (H): mutación en homocigosis.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
2 y 26	c.405_406insA	p.C136fsX1	5	Inserción	Fosfatasa	Sí	Patogénica
2	c.956_959delCTTT	p.T319fsX24	8	Delección	C2	Sí	Patogénica
3	c.641_662del	p.Q214_K221del	7	Delección	C2	No	Desconocida*
4	c.C283A	p.P95T	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida*
4	c.C328T	p.Q111X	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
4	c.G376A	p.A126T	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
5	c.515_517delGC	p.R172fsX5	6	Delección	Fosfatasa	No	Desconocida*
6	c.388_389delinsT	p.R130fsX16	5	Delins	Fosfatasa	Sí	Patogénica
7, 21 y 56	c.G389C	p.R130P	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
8	IVS(6)-12insT	---	Intrón 5	Inserción	---	Sí	Polimorfismo
10 y 12	c.757_759delAT	p.I253fsX2	7	Delección	C2	Sí	Patogénica
10	c.T959C	p.L320S	8	Sustitución	C2	No	Desconocida*
12 y 80	c.G395A	p.G132D	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
13, 18, 23, 37, 42, 60	c.C388G	p.R130G	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
14 y 22	c.G395C	p.G132A	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
17	c.C743G	p.P248R	7	Sustitución	C2	No	Desconocida*
17	c.G752T	p.G251V	7	Sustitución	C2	Sí	Patogénica
22	c.G493A	p.G165R	6	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
27 (H)	c.G513C	p.Q171H	7	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
30	c.A456G	p.L152L	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida*
31	c.900_901insTC	p.D300fsX6	8	Inserción	C2	No	Desconocida*
35 (H) y 75	c.C697T	p.R233X	7	Sustitución	C2	Sí	Patogénica
36	c.530_536delATTAT	p.Y176fsX2	6	Delección	Fosfatasa	Sí	Patogénica
38	c.742_743insA	p.P248fsX5	7	Inserción	C2	Sí	Patogénica
39	c.G766T	p.E256X	7	Sustitución	C2	Sí	Patogénica
44, 52, 72, 76	c.G389A	p.R130Q	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
44	c.A391C	p.T131P	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida
47 y 54	c.968_969insAfsX1	p.N323fsX1	8	Inserción	C2	Sí	Patogénica
48	c.C1003T	p.R335X	8	Sustitución	C2	Sí	Patogénica
51	c.G895T	p.E299X	8	Sustitución	C2	No	Desconocida
52	c.C424T	p.R142W	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida
52	c.517_518delICGinsTA	p.R173Y	6	Delins	Fosfatasa	No	Desconocida
56 y 60	c.G389T	p.R130L	5	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
60	c.A474G	p.V158V	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida
63	c.1029_1032delGAA	p.344delK	9	Delección	C2	No	Desconocida
64 y 80	c.261_263delIAT	p.Q87fsX2	5	Delección	Fosfatasa	No	Desconocida
65	IVS6+1G>A	---	Intrón 6	Sustitución	---	Sí	Patogénica
67 (H)	IVS3+5G>T	---	Intrón 3	Sustitución	---	No	Desconocida
74	c.255_257delGCinsT	p.A86fsX4	5	Delins	Fosfatasa	No	Desconocida
76	c.G754T	p.D252Y	7	Sustitución	C2	No	Desconocida
78	c.955_956insA	p.T319fsX5	8	Inserción	C2	Sí	Patogénica
82	c.G853T	p.E285X	8	Sustitución	C2	No	Desconocida
82	c.T202C	p.T68H	3	Sustitución	Fosfatasa	Sí	Patogénica
84	c.G821A	p.W274X	8	Sustitución	C2	Sí	Patogénica
85	c.923_924delG	p.R308fsX8	8	Delección	C2	No	Desconocida
85	c.*+2insT	---	5'-ÚTR	Inserción	---	No	Desconocida
86	c.G274C	p.D92H	5	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida
86	c.954_958delACTT	p.T318fsX1	8	Delección	C2	Sí	Patogénica
86	c.T125C	p.L42P	2	Sustitución	Fosfatasa	No	Desconocida

*Estas mutaciones fueron descritas previamente en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio³⁷⁴.

Resultados

Los casos 27, 35 y 67 mostraron cambios en homocigosis no acompañados por otras alteraciones en heterocigosis, lo cual sugiere una posible pérdida de alguno de los dos alelos. Por tanto, llevamos a cabo en estos casos estudios de pérdida de heterocigosis. Para ello recurrimos a la técnica de RFLP estudiando el polimorfismo localizado en el intrón 4 (IVS4+109ins5). Los resultados obtenidos se observan en la figura 52:

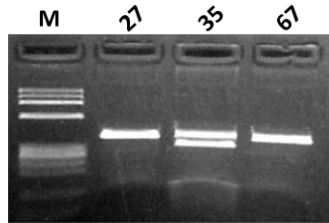


Figura 52: Patrón de bandas observado en la electroforesis de las digestiones realizadas con la endonucleasa de restricción AflII en los fragmentos de PCR que contenían el polimorfismo IVS4+109ins5 del gen *PTEN*. En el pocillo 1 se muestra el marcador de peso molecular. Los tumores 27 y 67 mostraron la presencia del polimorfismo en homocigosis mientras que el tumor 35 era heterocigoto para la inserción.

Como podemos observar, tan sólo el tumor 35 presentó un patrón heterocigoto confirmando la existencia de los dos alelos así que para los otros dos tumores aplicamos la técnica de la PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, utilizando como control endógeno el gen *36b4* (figura 53A y 53B):

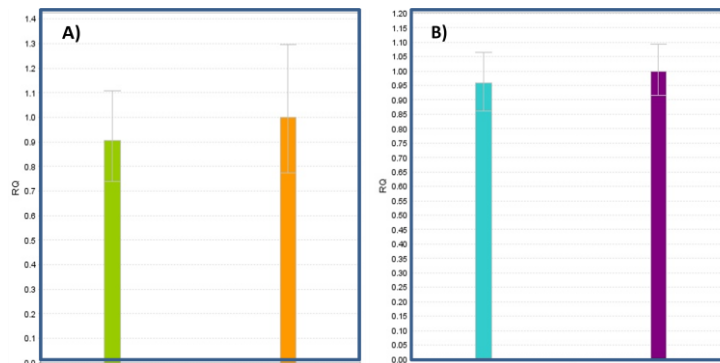


Figura 53: Resultado de la PCR cuantitativa realizada para la amplificación del exón 7 del gen *PTEN* en las muestras 27 (A) y 67 (B). A la muestra control se le asignó, en ambos casos, el valor=1.

Al comparar la amplificación del exón 7 de ambos tumores con la de una muestra control. Ninguno de los casos presentó una pérdida parcial o total de uno de los dos alelos lo que confirma la no existencia de pérdida de heterocigosis.

Las mutaciones c.1029_1032delGAA en el tumor 63 y c.261_263delAT en los tumores 64 y 80 se localizan al inicio de los exones 9 y 5 respectivamente. Al tratarse de mutaciones tipo deleción, la lectura de la secuencia generada resultó difícil debido a la aparición de un patrón doble desde el comienzo de la misma. La lectura en dirección 3´-5´ tampoco era posible ya que la mutación aparecía al final de la secuencia no permitiendo su correcta identificación. Por tanto, subclonamos ambos productos de PCR en el vector pGEM®-T easy consiguiendo finalmente caracterizar ambas mutaciones.

En los casos 4, 17, 44, 52, 56, 60 y 86 se observó más de una mutación en el mismo exón por lo que se llevaron a cabo estudios de pertenencia alélica, mediante subclonación en pGEM®-T y posterior secuenciación para comprobar si las dos mutaciones se encontraban en alelos diferentes. En los casos 4 y 17 las mutaciones aparecieron en el mismo alelo y en los casos 44, 52, 56, 60 y 86 en alelos diferentes.

En aquellos tumores que presentaron más de una mutación en diferentes exones, fue imposible el estudio de pertenencia alélica ya que no se disponía de RNA; no obstante, el análisis hubiera resultado muy difícil debido a la existencia del pseudogén NR_023917 que presenta una homología del 98% con el transcrito del gen *PTEN*³⁹⁸.

A parte de las mutaciones detalladas anteriormente, encontramos dos alteraciones con un patrón triple en la secuencia que no nos permitió descifrar el cambio producido, en los exones 7 y 8 de los tumores 45 y 79 respectivamente. Ninguna de las alteraciones se halló en la sangre de los pacientes (figuras 54a y 54b).

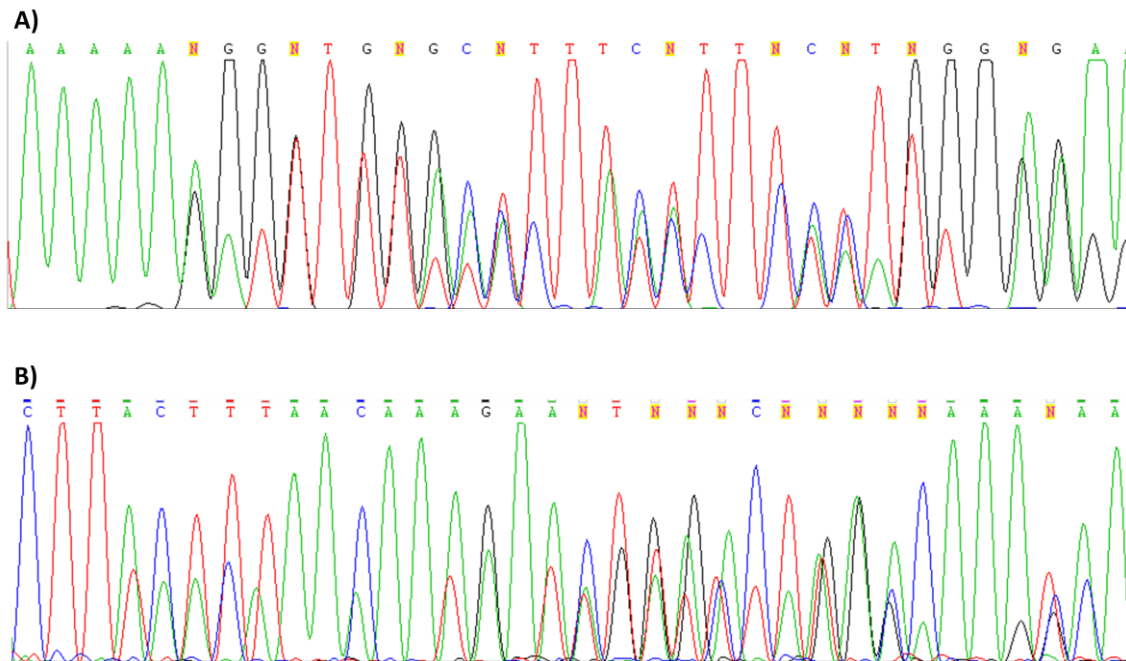


Figura 54: Secuencias resultado de la amplificación del exón 7 del tumor 45 (A) y del exón 8 del tumor 79 (B) en las que se observa la aparición de un patrón triple a partir de un determinado punto de las mismas.

En ambos casos se subclonó el producto de PCR con el vector pGEM®-T easy para separar los diferentes alelos. El experimento fue repetido hasta tres veces obteniendo un bajo número de colonias con inserto (fueron secuenciadas 15 en cada caso) y observando siempre la secuencia del alelo silvestre en todas ellas. Los otros fragmentos detectados nunca pudieron ser caracterizados.

Por otro lado, de todas las mutaciones encontradas, tan sólo una se encuentra descrita en la bibliografía como polimorfismo. Es el caso de la mutación IVS5-12insT en el tumor 8. Las mutaciones silenciosas c.A456G (p.L152L) y c.A474G (p.V158V) presentes en los

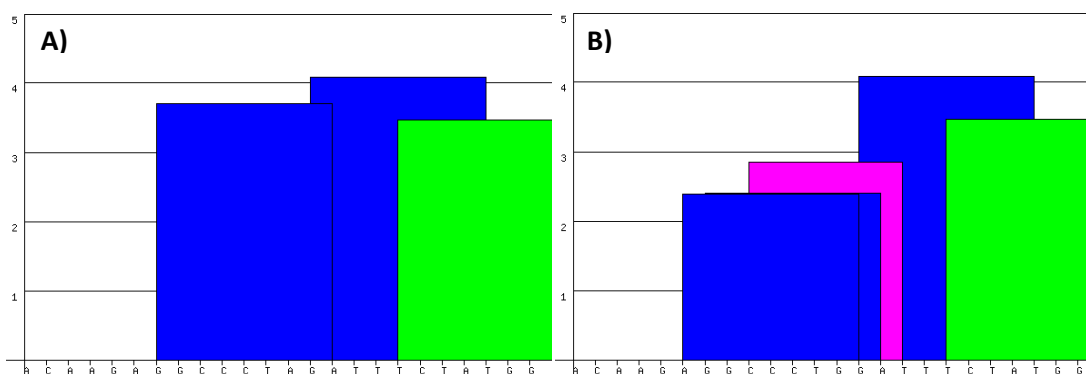
Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Resultados

casos 30 y 60 respectivamente, sugieren la posibilidad de que también sean polimorfismos. Se procedió por tanto a la realización de estudios *in silico* en los que se determinó si la mutación alteraba sitios ESE mediante los programas ESEfinder 3.0 y RESCUE-ESE 1.0.

El programa ESEfinder 3.0 mostró una alteración de los sitios ESE en la mutación c.A456G observando que el cambio de la Adenina por la Guanina crea un nuevo sitio para la unión la proteína SF/ASF (IgM-BRCA1) y dos para la proteína SC35 sustituyendo a uno existente en la secuencia silvestre (tabla 18 y figuras 55A y 55B). Sin embargo el programa RESCUE-ESE no mostró ninguna pérdida de sitios ESE (dato no mostrado).

Tabla 18: Secuencias de los fragmentos silvestre y mutado para el cambio c.A456G en el gen *PTEN*, sitios de unión de proteínas SR contenidos en las mismas y su valor de unión según el programa ESEfinder.

Secuencia	SF/ASF		SF/ASF (IgM-BRCA1)		SC35		SRp40		SRp55	
	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor
Silvestre ACAAGAGGCCCTAGATTCTATGG	---		---		GGCCCTAG	3.69953	TCTATGG	3.46238	---	
				GATTCTA	4.08190					
Mutada ACAAGAGGCCCTGATTCTATGG	---		CCCTGGA	2.85239	AGCCCTG	2.39201	TCTATGG	3.46238	---	
				GGCCCTGG	2.40264	GATTCTA				



■	SF/ASF
■	SF/ASF (IgM-BRCA1)
■	SC35
■	SRp40
■	SRp55

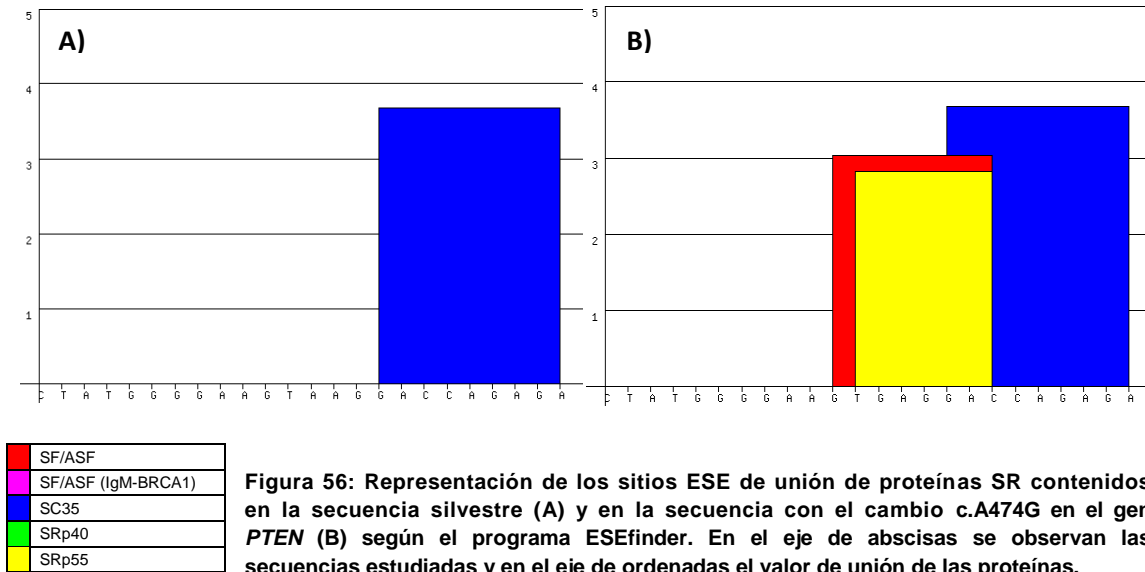
Figura 55: Representación de los sitios ESE de unión de proteínas SR contenidos en la secuencia silvestre (A) y en la secuencia con el cambio c.A456G en el gen *PTEN* (B). En el eje de abscisas se observan las secuencias estudiadas y en el eje de ordenadas el valor de unión de las proteínas.

Por otra parte, el programa ESEfinder 3.0 mostró una ganancia de dos sitios ESE: uno para la unión de la proteína SF/ASF y otro para la unión de SRp55 al analizar la mutación c.A474G (tabla 19 y Figuras 56a y 56b).

Tabla 19: Secuencias de los fragmentos silvestre y mutado para el cambio c.A474G en el gen *PTEN*, sitios de unión de proteínas SR contenidos en las mismas y su valor de unión según el programa ESEfinder.

Secuencia	SF/ASF		SF/ASF (IgM-BRCA1)		SC35		SRp40		SRp55	
	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor
Silvestre CTATGGGGAAGT ^A AGGACCAGAGA	---		---		GACCAGAG	3.67997	---		---	
Mutada CTATGGGGAAGT ^G AGGACCAGAGA	GTGAGGA	3.03891	---		GACCAGAG	3.67997	---		TGAGGA	2.81710

Resultados



Por otro lado el programa RESCUE-ESE 1.0 mostró una pérdida de dos sitios ESE (figura 57).

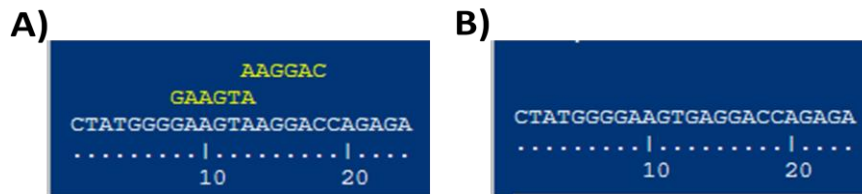


Figura 57: Resultado del análisis realizado con el programa RESCUE-ESE del efecto del cambio c.A474G en el gen PTEN sobre los sitios ESE: A) Sitios ESE presentes en la secuencia normal; B) Sitios ESE presentes en la secuencia mutada.

Estos resultados sugieren un efecto no patogénico sobre la proteína pero serían necesarios estudios en el RNA para poderlo corroborar.

Muchas de las mutaciones no descritas encontradas en nuestro trabajo fueron deleciones o inserciones que provocan un cambio en la fase de lectura y, como consecuencia, un codón de parada prematuro. Todas ellas, al igual que las mutaciones *nosense* observadas, fueron consideradas como patogénicas ya que afectan a la estructura y función de la proteína al dar lugar a proteínas de menor longitud y encontrarse en exones claves para la función de PTEN.

También hemos caracterizado mutaciones de tipo *missense* no descritas anteriormente en la literatura. Para ello utilizamos los programas de predicción de patogenicidad PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVDG. Entre ellas se incluyó a la mutación tipo delins c.517_518delCGinsTA (p.R173Y) cuyo cambio de dos nucleótidos no altera el marco de lectura pero da lugar a un aminoácido diferente al original (tabla 20):

Tabla 20: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína PTEN según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVDG.

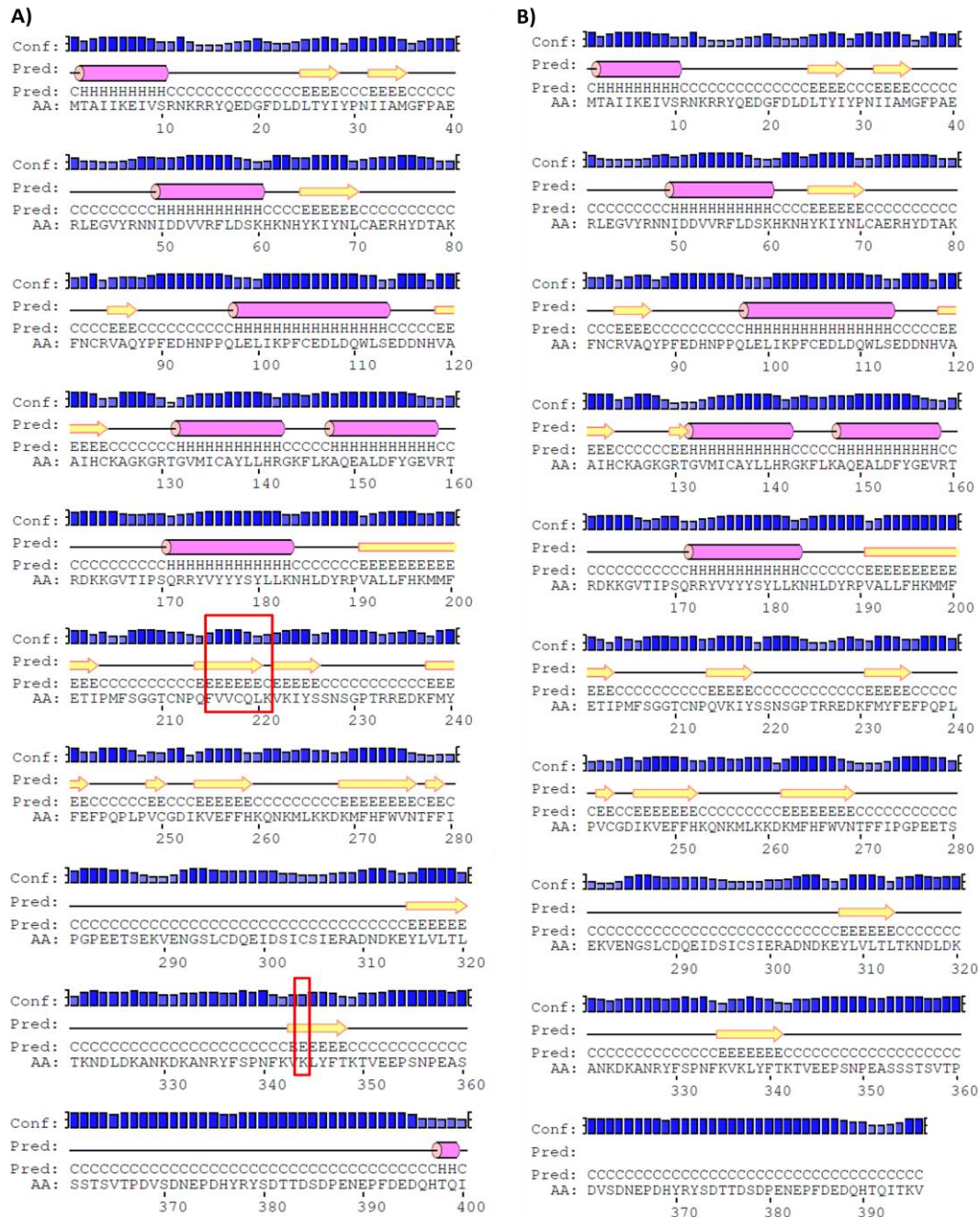
Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVDG	Valor
p.L42P	Probablemente patogénica	0.999	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.1061	Patogénica	-3.79714	Altamente patogénica	C65
p.D92H	Probablemente patogénica	1.000	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.5099	Patogénica	-6.67494	Altamente patogénica	C65
p.P95T	Probablemente patogénica	1.000	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.5600	Neutra	-2.34356	Poco patogénica	C35
p.T131P	Probablemente patogénica	1.000	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.4846	Patogénica	-6.11385	Poco patogénica	C35
p.R142W	Probablemente patogénica	1.000	Tolerada	0.06	Patogénica	0.9347	Patogénica	-4.57705	Altamente patogénica	C65
p.R173Y	Probablemente patogénica	0.993	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.2745	Patogénica	-7.45808	Altamente patogénica	C65
p.P248R	Probablemente patogénica	1.000	Tolerada	0.07	Patogénica	0.92	Neutra	-2.50681	Altamente patogénica	C65
p.D252Y	Probablemente patogénica	1.000	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.8670	Patogénica	-7.69417	Altamente patogénica	C65
p.L320S	Probablemente patogénica	1.000	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.7000	Patogénica	-5.34941	Altamente patogénica	C65

En nuestro trabajo hemos considerado patogénicas aquellas mutaciones en las que al menos tres programas de predicción lo indicaban; por lo que todas las mutaciones se consideraron patogénicas siendo necesario realizar estudios funcionales para su confirmación.

Las cuatro mutaciones restantes no pertenecían a ninguno de los tipos descritos anteriormente. Dos de ellas fueron mutaciones que no originaban cambios en el marco de lectura y no nos proporcionaban información suficiente para deducir su posible patogenicidad. Fue el caso de c.641_662del (p.Q214_K221del) y c.1029_1032delGAA (p.344delK) en los tumores 3 y 63 respectivamente. Ambas son descritas por primera vez en nuestro trabajo.

La mutación p.Q214_K221del se localiza en el exón 7 del gen *PTEN* (dominio C2) y consiste en una delección de 7 aminoácidos. La mutación p.344delK se encuentra en el exón 9 y también corresponde al dominio C2. En nuestro trabajo es la única mutación que se localiza en dicho exón. El estudio de ambas mutaciones se llevó a cabo con el programa de predicción de estructuras secundarias de proteínas PSIPRED con el fin de poder determinar los posibles efectos sobre la estructura y plegamiento (figuras 58A, B y C).

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Resultados



= helix Conf: [Bar chart icon] = confidence of prediction
 = strand Pred: [Diagram icon] = predicted secondary structure
 = coil AA: [Text icon] = target sequence

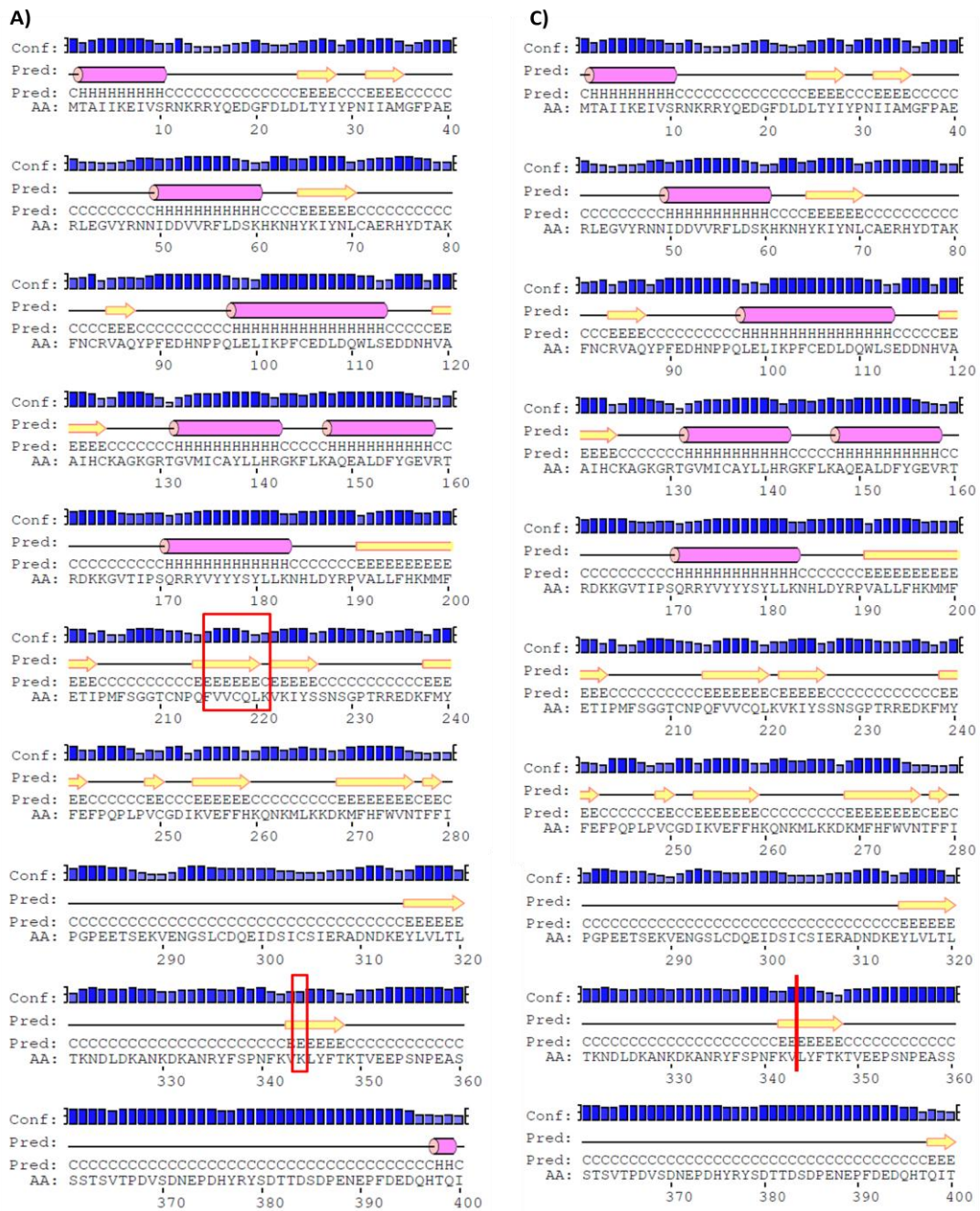


Figura 58: Estructura secundaria de las proteínas PTEN germinal (A) y PTEN mutada (B: p.Q214_K221 y C: p.344delK) desde el aminoácido 1 al 400/402, generadas por el programa PSIPRED donde se señalan las zonas delecionadas (cajas y línea roja).

La proteína generada por la deleción genómica Q214_K221del pierde un fragmento de una cinta β de una región que contiene hasta 6 cintas β , que forman una estructura de mayor complejidad en forma de lámina β ⁷¹ (figuras 58A y B). Sin embargo, la deleción de una Lisina en la posición 344 no da lugar a ningún cambio en la estructura bidimensional sugiriendo que dicho cambio pudiera tratarse de una mutación no patogénica (figuras 58A y C).

El estudio *in silico* de la conservación evolutiva de la región delecionada realizado mediante el programa PolyPhen determinó que los aminoácidos que forman la región afectada en la mutación Q214_K221del, mantienen un alto grado de de conservación a lo largo de la

evolución, siendo el aminoácido C218 el que menor grado de preservación muestra. Por otro lado, el aminoácido K344 deletado en la otra mutación está altamente conservado en la evolución (figuras 59A y B), lo que sugiere que ambas mutaciones pudieran ser patogénicas.

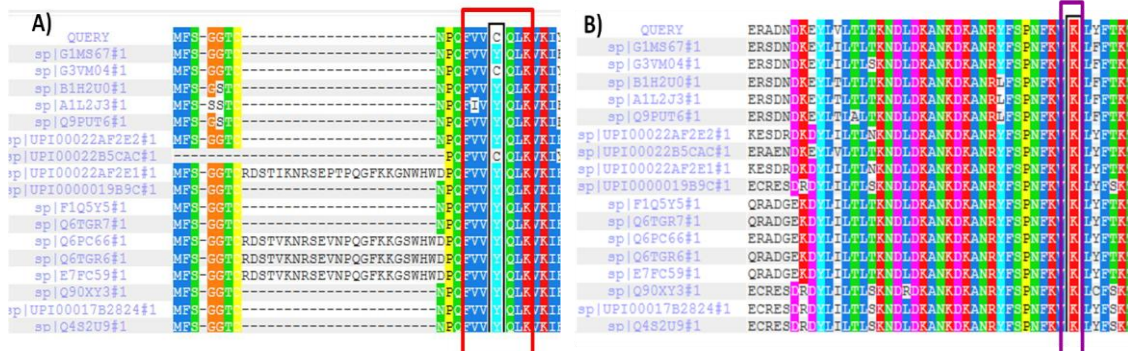


Figura 59: Alineamiento de secuencias de la proteína PTEN en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación de A) la región p.Q214_K221 (remarcada con el rectángulo rojo) y B) del aminoácido p.344K (remarcado con el rectángulo morado).

Por último, encontramos dos mutaciones no exónicas no descritas en la bibliografía y localizadas en regiones adyacentes a los exones.

La primera consistía en un cambio en homocigosis de una Guanina por una Timina en la posición +5 del intrón 3 en el tumor 67. Para su estudio necesitaríamos contar con muestra de RNA extraída del tumor de la paciente con el objetivo de analizar si dicho cambio afecta a la maduración del RNA.

La segunda mutación fue una inserción en heterocigosis de una Timina en la posición +2 del extremo 3'-UTR del gen (c.*+2insT) en el tumor 85. Las regiones 5'-UTR y 3'-UTR son las zonas colindantes a la región transcripcional de los genes y poseen una gran importancia en la regulación de la expresión génica. Concretamente, el extremo 3'-UTR se encuentra implicado en la correcta expresión espacial y temporal de los genes así como en la regulación de la estabilidad, localización y traducción de los RNAs mensajeros. Para el estudio de esta mutación recurrimos al programa microRNA, el cual no encontró secuencias de anillamiento de miRNAs ni en la secuencia normal ni en la secuencia mutada. En este caso también sería interesante el estudio del RNA a fin de analizar si el cambio produce alteraciones en la estabilidad del mRNA.

Para completar el estudio se analizó la expresión de la proteína PTEN, mediante Western blot, en 23 tumores que presentaban al menos una mutación no descrita incluyendo también en el estudio extractos proteicos de cuatro líneas celulares de endometrio: HEC1B, KLE, SKUT1 y AN3CA. Las tres primeras líneas mostraron un patrón de expresión normal mientras que en AN3CA no se detectó expresión de PTEN como consecuencia de la mutación en homocigosis: c.389_390delG (p.R130fsX3) (figura 60).

Resultados

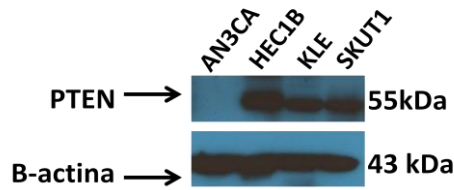


Figura 60: Western blot con inmunodetección de la proteína PTEN en cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial (AN3CA, HEC1B, KLE y SKUT1). La detección de proteína β-actina corresponde al control de carga.

El análisis de expresión de la proteína PTEN en los 23 extractos proteicos de carcinoma endometrial, cuantificados y normalizados, mostró que los tumores con mutaciones de cambio de fase de lectura y mutaciones de tipo *nonsense*, presentaban una disminución en la cantidad de proteína detectada (figura 70 y tabla 21).

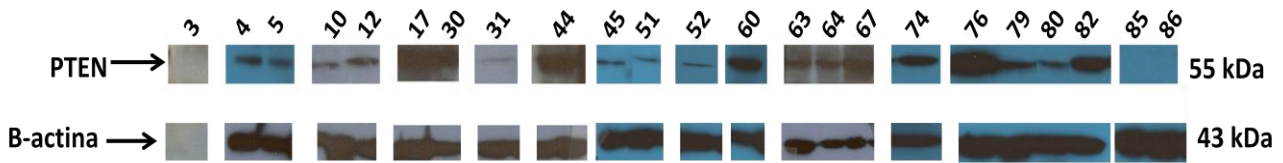


Figura 70: Western blot con inmunodetección de la proteína PTEN en los 23 extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones no descritas. La detección de proteína β-actina corresponde al control de carga.

Tabla 21: Resultados del análisis de expresión de la proteína PTEN en los 23 extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones no descritas. Se indican las mutaciones no descritas y las mutaciones patogénicas descritas en cada uno de ellos. (H) muestra las alteraciones homocigotas.

Caso	Ausencia de expresión	Expresión disminuida	Expresión normal	Mutaciones no descritas en PTEN	Mutaciones patogénicas descritas en PTEN
3	ND	ND	ND	p.Q214_K221del	
4		X		p.P95T	p.Q111X/p.A126T
5		X		p.R172fsX6	
10		X		p.I253fsX2/p.L320S	
12		X		p.I253fsX2	p.G132D
17			X	p.P248R	p.G251V
30			X	p.L152L	
31		X		p.D300fsX6	
44			X	p.T131P	p.R130Q
45		X		Indeterminada	
51		X		p.E299X	
52		X		p.R142W/pR173Y	p.R130Q
60			X	p.V158V	p.R130G/p.R130L
63		X		p.344delK	
64		X		p.87_88delATfsX2	
67			X	IVS3+5G>T (H)	
74		X		p.A262TfsX4	
76			X	p.D252Y	p.R130Q
79		X		Indeterminada	
80		X		p.87delATfsX4	p.G132D
82			X	p.E285X	p.T68H
85	X			p.R308LfsX8	
86	X			p.L42P/p.D92H	p.T318_320fsX

Nuestros resultados muestran que prácticamente todas las mutaciones tipo *frameshift* o *nonsense* producen una disminución de la expresión de la proteína. Las mutaciones *missense* en heterocigosis, cuando no existe otra mutación acompañante tipo *frameshift* o *nonsense*, no

provocan alteraciones en la expresión (casos 17, 30, 44, 60, 76 por ejemplo). Por otra parte, el cambio IVS3+5G>T en homocigosis presente en la tumor 67, no produce una disminución de la expresión de PTEN lo cual sugiere que dicha mutación no afecta a la expresión de la proteína. Finalmente, los tumores en los cuales observamos secuencias triples (casos 45 y 79) presentaban un defecto en la expresión de PTEN, lo que estaría reflejando la existencia de una alteración con un efecto patogénico sobre la proteína y confirma la necesidad de realizar más estudios para caracterizar la alteración molecular de estos tumores.

1.1.2 ESTUDIO DEL GEN *TP53*

El estudio del gen *TP53* comprendió el análisis de los exones 4 al 10 y sus regiones intrónicas adyacentes, así como estudios de pertenencia alélica en aquellos casos en los que se encontraron más de una mutación en el mismo exón. En este caso no se realizaron estudios de expresión de la proteína. P53 está sometida a un proceso de expresión y degradación continua lo que le confiere una corta vida media y los estudios de expresión proteica presentan unos resultados equívocos ya que dependerían del estado en el que se encontrase la proteína en la célula en el momento del estudio y no de las alteraciones génicas que pudieran estar interfiriendo.

Nuestro trabajo mostró que 19 de los 86 tumores (22.09%) presentaban mutaciones patogénicas en el gen *TP53*, incluyendo un cambio intrónico (caso 59). Todas ellas han sido descritas previamente y la mayoría son sustituciones de aminoácidos localizados en el dominio de unión al DNA. Dos tumores mostraron más de una mutación patogénica en el gen (casos 27 y 70) lo cual eleva el número de mutaciones patogénicas a 21. Las mutaciones de estos dos tumores se encontraban en exones diferentes y, por tanto, no se pudieron realizar estudios de pertenencia alélica al no contar con muestra de RNA. Dos tumores mostraron mutaciones patogénicas en homocigosis (casos 11 y 20) sin presentar ninguna otra mutación en *TP53* en heterocigosis. Las muestras de sangre de estas pacientes no mostraban las mutaciones patogénicas, confirmando que se trataba de mutaciones somáticas (casos 16, 52, 53, 70 y 79). Además, se detectaron 8 polimorfismos de los cuales 3 aparecieron con una elevada frecuencia y no se incluyeron en la tabla 22: c.G215C (p.R72P), IVS3ins16 y IVS6+62G>A.

Tabla 22: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *TP53*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco. (H): mutación en homocigosis.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
3, 4, 20 (H) y 60	c.A639T	p.R213R	6	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Polimorfismo
9	c.C665T	p.P222L	6	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Polimorfismo
9	c.C328T	p.R110C	4	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
9	c.C916T	p.R306R	8	Sustitución	Unión al DNA/Tetramerización	Sí	Polimorfismo
11 (H)	c.C722T	p.S241F	7	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
16	c.527_528insC	p.C176fsX180	5	Inserción	Unión al DNA	Sí	Patogénica
20 (H)	c.G818A	p.R273H	8	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
26, 29 y 73	c.G744A	p.R248Q	7	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
27	c.458_459insG	p.P153fsX179	5	Inserción	Unión al DNA	Sí	Patogénica
27	c.C832T	p.P278S	8	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
29 y 35	c.G108A	p.P36P	4	Sustitución	Transactivación	Sí	Polimorfismo
32	c.T821C	p.V274A	8	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
48	c.G796A	p.G266R	8	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
52	c.C523T	p.R175C	5	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
53	c.A715G	p.N239D	7	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
57	c.C451T	p.P151S	5	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
58	c.C637T	p.R213X	6	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
59	IVS6+2T>C	---	Intrón 6	Sustitución	---	No	Desconocida
62	c.C668A	p.A223D	5	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
70	c.A639G	p.R213R	6	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Polimorfismo
70	c.G524A	p.R175H	5	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
70	c.G796C	p.G266R	8	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
79	c.G404A	p.C135Y	5	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica
84	c.G747T	p.R249S	7	Sustitución	Unión al DNA	Sí	Patogénica

Los tumores 11 y 20 mostraron mutaciones en homocigosis no acompañadas por otras alteraciones en heterocigosis. Realizamos, por tanto, un estudio de pérdida de heterocigosidad para comprobar la posible ausencia de alguno de los dos alelos. La técnica utilizada fue la PCR cuantitativa (figuras 71A y B).

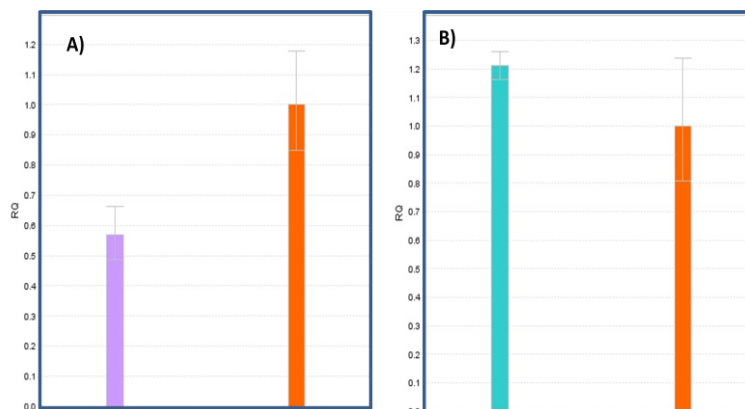


Figura 71: Resultado de la PCR cuantitativa realizada para la amplificación de los exones 7 en el tumor 11 (A) y 8 en el tumor 20 (B) del gen *TP53*. A la muestra control se le asignó el valor RQ=1. Se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

Como se observa en la figura 71A en el caso del tumor 11 podría existir una posible pérdida de heterocigosidad ya que la amplificación del exón 7 mostró un patrón correspondiente a la pérdida de uno de los dos alelos.

La mutación c.C665T (p.P222L) se ha descrito como una variante sin función patogénica ya que no modifica la actividad de la proteína. Los cambios c.G215C (p.P72R) y la inserción de 16 pb en el intrón 3 corresponden a dos polimorfismos que se presentan en la población de forma muy frecuente y que han demostrado tener mayor actividad proapoptótica y aumentar la susceptibilidad de desarrollo del cáncer respectivamente³⁹⁹.

La mutación intrónica IVS6+2T>C no se ha descrito hasta el momento; el hecho de que se localice en la posición +2, en una secuencia conservada, indica que puede alterar el *splicing* del mRNA. Es necesario el estudio del RNA del tumor para confirmar el efecto patogénico.

1.1.3 ESTUDIO DEL GEN *CDKN2A*

Siete de los 86 tumores incluidos en nuestro trabajo presentaron alguna alteración en el gen *CDKN2A*. Sólo la mutación c.G217A (p.A73T) no había sido descrita anteriormente en la literatura. Por otra parte encontramos un cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 445 en los tumores 4 y 62 que se encontraba descrito anteriormente como polimorfismo pero asociado, por algunos autores, a un posible riesgo a desarrollar melanoma maligno^{400,401}. De igual forma, hallamos dos mutaciones en regiones intrónicas alejadas del exón 1 (-53 y +37), lo que sugiere que se trata de polimorfismos (tabla 23).

Tabla 23: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *CDKN2A*. Las mutaciones descritas por nosotros como patogénicas se destacan en amarillo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Descrita	Función
3	IVS(2)-53T>G	---	Intrón 1	Sustitución	No	Desconocida*
4 y 62	c.G445A	p.A148T	2	Sustitución	Sí	Polimorfismo
9	c.G217A	p.A73T	2	Sustitución	No	Desconocida*
24, 26 y 56	IVS1+37G>C	---	Intrón 1	Sustitución	No	Desconocida*

*Estas mutaciones fueron descritas previamente en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio³⁷⁴.

Procedimos al estudio *in silico* de la mutación *missense* de significado desconocido mediante los programas bioinformáticos de predicción (tabla 24).

Tabla 24: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína p16 según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVGD.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVGD	Valor
p.A73T	Probablemente patológica	0.995	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.0315	Neutra	-1.78871	Patológica	C55

Los programas Panther y Pmut la describían como neutra pero los otros tres utilizados, la caracterizaron como patológica. Además el estudio de conservación de aminoácidos realizado con el programa PolyPhen mostró cómo el aminoácido Alanina de la posición 73 se encontraba muy conservado en la evolución (figura 72).



Figura 72: Alineamiento de secuencias de la proteína p16 en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación del aminoácido Alanina en la posición 73 (remarcado con un rectángulo rojo).

Por tanto, de todas las mutaciones encontradas en el gen *CDKN2A*, sólo la mutación c.G217A (p.A73T) presentó un carácter patológico tras el análisis bioinformático.

1.1.4 ESTUDIO DEL GEN *CDH1*

El análisis del gen *CDH1* se realizó tras la amplificación por PCR de sus 16 exones y regiones intrónicas adyacentes. La mayoría de los cambios encontrados fueron mutaciones silenciosas, algunas de ellas descritas como polimorfismos y otras no descritas. Hallamos además dos mutaciones tipo *missense* (tabla 25).

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Resultados

Tabla 25: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *CDH1*. No se encontraron mutaciones patogénicas.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
18	c.C933G	p.L311L	7	Sustitución	Extracelular	Sí	Polimorfismo
18	c.G253A	p.V85I	3	Sustitución	Precursor	No	Desconocida*
22	c.C1896T	p.H632H	12	Sustitución	Extracelular	Sí	Polimorfismo
29	c.G271A	p.R90Q	3	Sustitución	Precursor	No	Desconocida*
42, 48, 61, 72, 82 y 85	IVS1+6C>T	---	Intrón 1	Sustitución	---	No	Desconocida
45, 55 y 71	IVS4+10G>C	---	Intrón 4	Sustitución	---	No	Desconocida
42, 44, 50, 57, 79, 61 y 78	IVS(14)-13T>C	---	Intrón 13	Sustitución	---	No	Desconocida
72	c.C2253T	p.N715N		Sustitución		Sí	Polimorfismo
72, 80 y 85	c.-71C>G	---	5'-UTR	Sustitución	---	Sí	Polimorfismo
79	c.G2451A	p.A817A	16	Sustitución	Citoplasmática	No	Desconocida
83	c.T1845C	p.I615I	12	Sustitución	Extracelular	No	Desconocida
29	c.T2076C	p.A692A	16	Sustitución	Citoplasmática	Sí	Polimorfismo

*Estas mutaciones fueron descritas previamente en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio³⁷⁴.

Aparte de dichas alteraciones, encontramos la mutación c.T2076C (p.A692A) previamente descrita como polimorfismo y presente en la mayoría de los casos estudiados en nuestro trabajo.

El estudio de las dos mutaciones *missense* no descritas (casos 18 y 29) fue realizado mediante programas *in silico* de predicción de patogenicidad (tabla 26).

Tabla 26: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína E-cadherina según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVGD.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVGD	Valor
p.V85I	Benigna	0.116	No afecta a la función	0.24	Neutra	0.05	No alineamiento	---	Muy poco patogénica	C25
p.R90Q	Benigna	0.000	No afecta a la función	0.21	Patogénica	0.58	No alineamiento	---	Poco patogénica	C35

Como se observa en la tabla 26, estos dos cambios no tienen un efecto patogénico sobre la E-cadherina a pesar de corresponder a alteraciones que afectan al precursor de la proteína madura. Los resultados en PolyPhen mostraron una conservación en la evolución del aminoácido afectado muy débil (figura 73A y B), por lo que los consideramos polimorfismos.

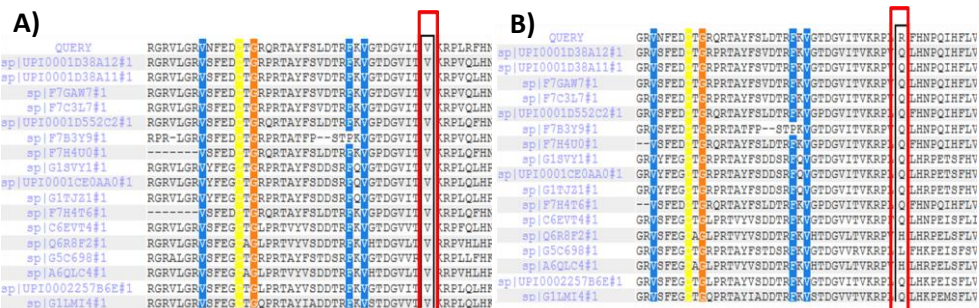


Figura 73: Alineamiento de secuencias de la proteína E-cadherina en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación de los aminoácidos: A) Valina en la posición 85 y B) Arginina en la posición 90 (remarcados ambos con un rectángulo rojo).

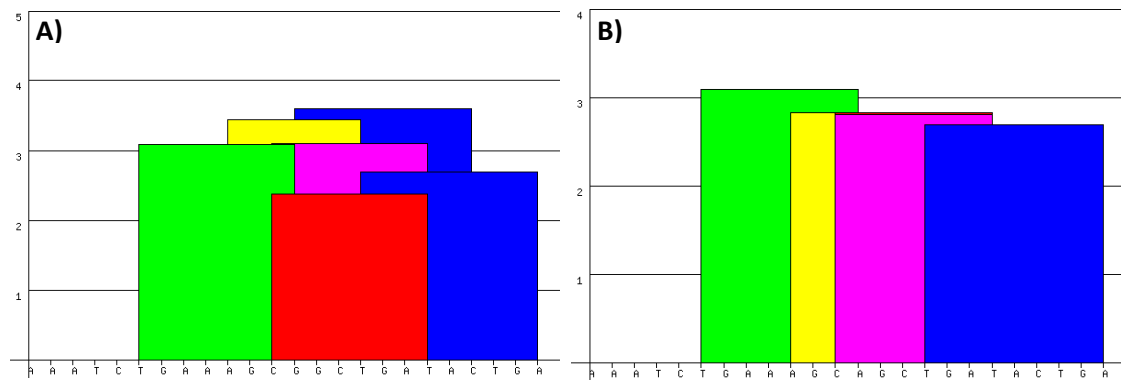
Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Resultados

Por otro lado, hemos estudiado dos mutaciones silenciosas (casos 79 y 83) mediante los programas ESEfinder 3.0 y RESCUE-ESE 1.0.

El estudio de la mutación c.G2451A con el programa ESEfinder 3.0 mostró un cambio significativo en los sitios ESE observando la pérdida de un sitio para la unión de la proteína SC35 (tabla 27 y figuras 74A y B).

Tabla 27: Secuencias de los fragmentos silvestre y mutado para el cambio c.G2451A en el gen CDH1, sitios de unión de proteínas SR contenidos en las mismas y su valor de unión según el programa ESEfinder.

Secuencia	SF/ASF		SF/ASF (IgM-BRCA1)		SC35		SRp40		SRp55	
	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor
Silvestre AAATCTGAAAGC G GCTGATACTGA	C G GCTGA	2.37836	C G GCTGA	3.10027	G GCTGATA TGATACTG	3.59645 2.68808	TGAAAGC	3.09119	AGC G GC	3.43523
Mutada AAATCTGAAAGC A GCTGATACTGA	C A GCTGA	2.82558	C A GCTGA	2.80204	TGATACTG	2.68808	TGAAAGC	3.09119	AGC A GC	2.82657



	SF/ASF
	SF/ASF (IgM-BRCA1)
	SC35
	SRp40
	SRp55

Figura 74: Representación de los sitios ESE de unión de proteínas SR contenidos en la secuencia silvestre (A) y en la secuencia con el cambio c.G2451A en el gen CDH1 (B). En el eje de abscisas se observan las secuencias estudiadas y en el eje de ordenadas el valor de unión de las proteínas.

Sin embargo el programa RESCUE-ESE 1.0 señaló la aparición de dos sitios ESE más cuando se producía el cambio por la Adenina (figura 75A y B).

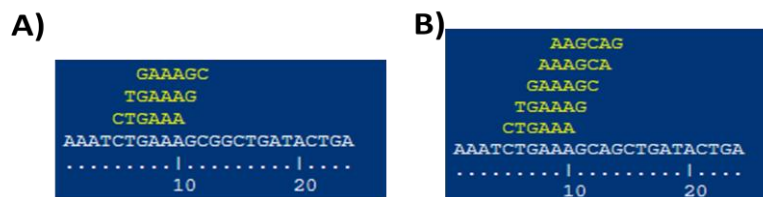


Figura 75: Resultado del análisis realizado con el programa RESCUE-ESE del efecto del cambio c.G2451A en el gen CDH1 sobre los sitios ESE: A) Sitios ESE presentes en la secuencia normal; B) Sitios ESE presentes en la secuencia mutada.

Según ambos programas, la alteración c.T1845C no alteró ningún sitio ESE observando idénticos datos y gráficos para la secuencia silvestre y para la mutada (dato no mostrado).

Para completar el estudio de ambas mutaciones silenciosas, al igual que para la mutación intrónica IVS1+6C>T, sería conveniente el análisis del RNA a fin de identificar posibles alteraciones en su procesamiento. Los dos cambios restantes: IVS4+10G>C y IVS13-13T>C podrían considerarse polimorfismos teniendo en cuenta que aparecen en una elevada cantidad de tumores y que se encuentran alejados de las regiones exónicas.

Por tanto, ninguna de las mutaciones observadas en el gen *CDH1* en nuestro trabajo presenta un carácter patogénico, necesitando realizar un estudio más amplio de algunas mutaciones para analizar posibles efectos sobre el *splicing* del RNA.

1.1.5 ESTUDIO DEL GEN *PPP2R1A*

PPP2R1A ha sido recientemente descrito, gracias a estudios de ultrasecuenciación, como un gen asociado a carcinoma de endometrio esporádico. Su análisis se centra principalmente en los exones 5 y 6 que codifican los motivos HEATS 5, 6 y 7, donde se han observado todas las mutaciones patogénicas descritas hasta el momento.

Nosotros hemos estudiado el gen completo en los tumores de grado 3, incluidos los endometrioides grado 3, y sólo los exones 5 y 6 en los endometrioides grado 1 y grado 2. De los 86 tumores, seis de ellos presentaron mutaciones patogénicas ya descritas, pero detectamos otras mutaciones descritas por primera vez en nuestro trabajo (tabla 28).

Tabla 28: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *PPP2R1A*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Las mutaciones descritas por nosotros como patogénicas, en amarillo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco. (H): mutación en homocigosis.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
9, 20, 38, 39, 59, 67 y 72	c.-52A>G	---	5'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida
9	c.-44G>C	---	5'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida
9, 20, 38, 39, 59 y 72	c.-73T>C	---	5'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida
9	c.G378A	p.A126A	4	Sustitución	HEAT 4	No	Desconocida
9, 59, 67 y 72	IVS6-21C>G	---	Intrón 6	Sustitución	---	No	Desconocida
9, 67 y 72	IVS8+44A>G	---	Intrón 8	Sustitución	---	No	Desconocida
9	IVS7+31A>G	---	Intrón 7	Sustitución	---	No	Desconocida
9, 67 y 72	IVS11-14T>C	---	Intrón 11	Sustitución	---	No	Desconocida
9, 59, 67 y 72	c.C1722T	p.D574D	14	Sustitución	HEAT 15	No	Desconocida
15, 24, 30, 50, 73 y 75	IVS5+57G>A	---	Intrón 5	Sustitución	---	No	Desconocida
16, 19, 23, 24, 25, 27, 29, 32, 39, 70 y 80	c.-52insC	---	5'-UTR	Inserción	---	No	Desconocida
16	IVS3-12T>G	---	Intrón 3	Sustitución	---	No	Desconocida
19	IVS2-45C>T	---	Intrón 2	Sustitución	---	No	Desconocida
20	c.-53C>T	---	5'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida
20	c.*+136C>T	---	3'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida
27 (H)	IVS2+76T>G	---	Intrón 2	Sustitución	---	No	Desconocida
27 (H)	IVS2+87T>A	---	Intrón 2	Sustitución	---	No	Desconocida
29	c.C767T	p.S256T	6	Sustitución	HEAT 7	Sí	Patogénica
37	c.G548A	p.R183Q	5	Sustitución	HEAT 5	Sí	Patogénica
38	c.-52insCCC	---	5'-UTR	Inserción	---	No	Desconocida
45	c.G582T	p.K194N	5	Sustitución	HEAT 5	No	Desconocida
48, 49, 59 y 70	c.C536G	p.P179R	5	Sustitución	HEAT 5	Sí	Patogénica
52	c.G1436A	p.R48Q	2	Sustitución	HEAT 2	No	Desconocida
59 y 70	IVS7+42A>G	---	Intrón 7	Sustitución	---	No	Desconocida
59	IVS14+21A>C	---	Intrón 14	Sustitución	---	No	Desconocida
67, 73 y 80	c.-53insC	---	5'-UTR	Inserción	---	No	Desconocida
70	IVS8+109C>T	---	Intrón 8	Sustitución	---	No	Desconocida
70	c.C477T	p.S158S	4	Sustitución	HEAT 4	No	Desconocida
80	IVS3+31A>G	---	Intrón 3	Sustitución	---	No	Desconocida
86	IVS7+29T>A	---	Intrón 7	Sustitución	---	No	Desconocida

Detectamos tres de las mutaciones patogénicas más frecuentemente encontradas hasta el momento en carcinoma de endometrio seroso y cáncer de ovario: p.S256T, p.R183Q y p.P179R. La primera se localiza en el HEAT 7 y las dos siguientes en el HEAT 5. De las tres, p.P179R fue hallada en cuatro tumores, de los cuales tan sólo el caso 48 no era un carcinoma seroso sino un endometriode grado 1. El estudio del gen en el DNA procedente de la sangre periférica de las pacientes 29, 37, 49 y 70 no mostró ninguna de las mutaciones patogénicas observadas en el tumor, lo que confirma que son mutaciones somáticas.

Por otra parte, el análisis del gen *PPP2R1A* mostró un gran número de cambios intrónicos (IVS6-21C>G, IVS8+44A>G, IVS7+31A>G, IVS11-14T>C, IVS5+57G>A, IVS3-12T>G, IVS2-45T>C, IVS2+76T>G, IVS2+87T>A, IVS7+42A>G, IVS14+21A>C, IVS8+109C>T, IVS3+31A>G y IVS7+29T>A) que, por su localización alejada de los exones, podrían considerarse no patogénico.

En nuestro estudio hemos encontrado dos mutaciones *missense* de significado desconocido: p.R48Q (en un tumor endometriode grado 3) y p.K194N (en un tumor endometriode grado 2) localizadas en los exones 2 y 5 respectivamente. En la sangre periférica de los pacientes 52 y 45 no aparecían dichas mutaciones. Se realizó un análisis *in silico* mediante los programas de predicción de patogenicidad que mostraron que el cambio p.R48Q puede considerarse una mutación patogénica a pesar de encontrarse en el exón 2, que codifica el HEAT 2, y no en la zona donde se han observado las mutaciones patogénicas descritas hasta el momento (HEATs 5 y 7). Por otra parte, la mutación p.K194N que al localizarse en el exón 5 podría resultar patogénica, se comporta como un cambio neutro (tabla 29):

Tabla 29: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína PPP2R1A según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVGD.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVGD	Valor
p.K194N	Benigna	0.205	Afecta a la función	0.03	Neutra	0.2498	Neutra	-2.77613	Altamente patogénica	C65
p.R48Q	Probablemente patogénica	0.984	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.5263	No alineamiento	---	Poco patogénica	C35

. Analizando la conservación de estos aminoácidos se observa que ambos aparecen altamente conservados filogenéticamente (figuras 76A y B).

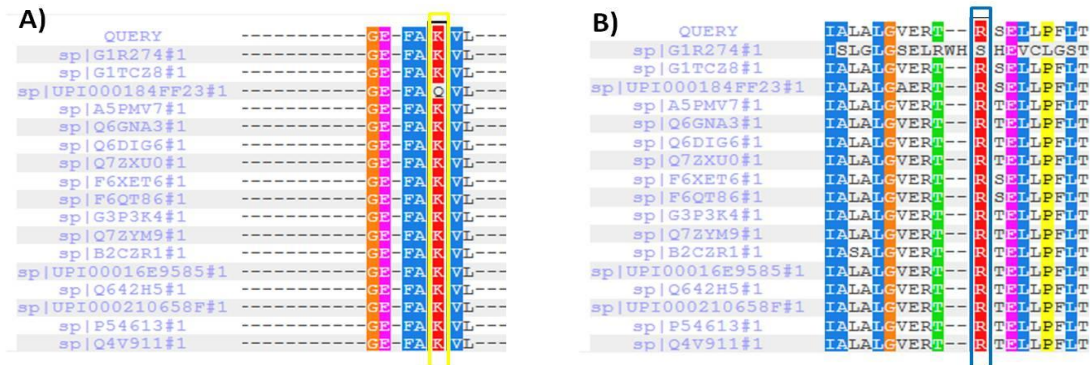


Figura 76: Alineamiento de secuencias de la proteína PPP2R1A en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación de los aminoácidos: A) Argnina en la posición 48 (remarcado con un rectángulo amarillo) y B) Lisina en la posición 194 (remarcados ambos con un rectángulo azul).

Por otra parte, hemos caracterizado por primera vez tres mutaciones silenciosas: p.A126A (c.G378A), p.D574D (c.C1722T), p.S158S (c.C477T). Aunque dan lugar a un cambio de aminoácido analizamos si afectaban sitios ESE de unión de proteínas con los programas ESEfinder 3.0 y RESCUE-ESE 1.0.

En el caso de la mutación c.G378A, la sustitución de una Guanina por una Adenina tan sólo produce un cambio en la afinidad de unión de las proteínas SRs pero no hay pérdida ni aparición de nuevos sitios ESE (datos no mostrados). En la mutación c.C1722T desaparecen tres sitios ESE y tan sólo se mantiene un sitio de unión de la proteína SRp55 (tabla 30, figura 77). Por último, la mutación c.C477T provoca la disminución de la afinidad de un sitio ESE para

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico
Resultados

la unión de una proteína SC35, y la sustitución de un sitio de unión de SRp40 por dos de unión al mismo tipo de proteína (tabla 30, figura 78).

Tabla 30: Secuencias de los fragmentos silvestre y mutado para los cambios c.C1722T y c.C477T en el gen *PPP2R1A*, sitios de unión de proteínas SR contenidos en las mismas y su valor de unión según el programa ESEfinder.

Secuencia	SF/ASF		SF/ASF (IgM-BRCA1)		SC35		SRp40		SRp55			
	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor	Sitio	Valor		
c.C1722T	Silvestre CCAGGATGTGGA C GTCAAATACTT		TGGACGT	2.59191	TGGACGT	1.98512	---	---	TGTGGA	3.40507		
	Mutada CCAGGATGTGGA T GTCAAATACTT		---	---	---	---	---	GAC G TGC	2.71795			
									TGTGGA	3.40507		
c.C477T	Silvestre CCCCCGAGTGT C AGTGCTGTGAA		CCCCCGA	3.87008	CCCCCGA	4.31507	GTCC C AGTG	4.41626	CC C AGTGC	3.15502	AGTGC	2.69741
					CCCCGAG	1.89212						
					CCGAGTG	2.15300						
	Mutada CCCCCGAGTGT T AGTGCTGTGAA		CCCCCGA	3.87008	CCCCCGA	4.31507	GTCT A AGTG	4.18541	TGTC T AG	3.64203	AGTGC	2.69741
					CCCCGAG	1.89212						
					CCGAGTG	2.15300			CT A AGTGC	2.84297		

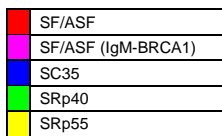
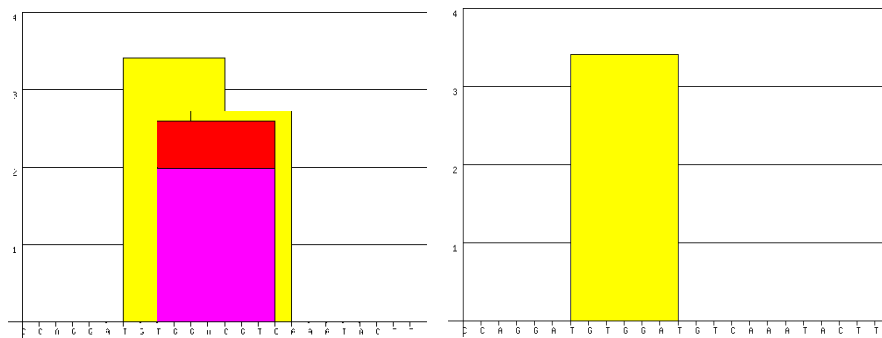


Figura 77: Representación de los sitios ESE de unión de proteínas SR contenidos en la secuencia silvestre (A) y en la secuencia con el cambio c.C1722T en el gen *PPP2R1A* (B). En el eje de abscisas se observan las secuencias estudiadas y en el eje de ordenadas el valor de unión de las proteínas.

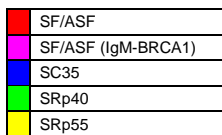
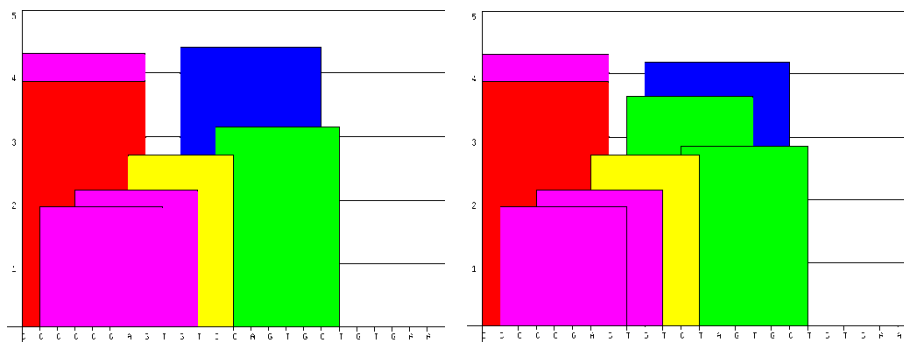


Figura 78: Representación de los sitios ESE de unión de proteínas SR contenidos en la secuencia silvestre (A) y en la secuencia con el cambio c.C477T en el gen *PPP2R1A* (B). En el eje de abscisas se observan las secuencias estudiadas y en el eje de ordenadas el valor de unión de las proteínas.

El programa RESCUE-ESE 1.0 no encontró cambios en las secuencias de unión en ninguno de los tres casos. Por tanto, ninguna de las tres mutaciones silenciosas halladas en el gen *PPP2R1A* se considerarían patogénicas por no producir cambios agresivos sobre los sitios de unión de proteínas SR, pero al igual que lo descrito anteriormente, sería conveniente el estudio del RNA a fin de observar posible efectos sobre su procesamiento.

Los cambios contenidos en las regiones UTR no han sido descritos anteriormente, tal vez porque en la mayoría de las veces sólo se estudian los exones 5 y 6 y no se analizan dichas zonas. Tres de estas mutaciones aparecían en una gran cantidad de muestras como es el caso de las observados en la región 5'-UTR: c.-52A>G (7 casos), c.-73T>C (6 casos), c.-52insC (11 casos). Otros cambios aparecieron con una menor frecuencia, como en el caso de los localizados en la región 5'-UTR: c.-44G>C (1 caso), c.-53C>T (1 caso), c.-52insCCC (1 caso) y c.-53insC (3 casos) y el observado en la zona 3'-UTR: c.*136C>T (1 caso).

Estudiamos, mediante el programa microRNA, si existían miRNAs que se uniesen a estas secuencias de los extremos 5' y 3'-UTR no observando ninguno excepto cuando se producía el cambio c.-73T>C, que se formaba la secuencia adecuada para la unión del miRNA hsa-miR-765 con un score de 75 según la base de datos miRBASE pero con efecto no validado según el programa microRNA.

Por otra parte, las mutaciones localizadas en la región 5'-UTR fueron analizadas, de forma individual, con el programa TFSEARCH a fin de comprobar si las zonas afectadas por los cambios contenían regiones a las que se uniesen factores de transcripción y si las mutaciones observadas alteraban la interacción de los mismos. TFSEARCH indicó la existencia de un sitio de unión para para MZF1 con un score del 85.5, en la secuencia silvestre comprendida entre los nucleótidos -48 y -59. MZF1 es un factor de transcripción que actúa sobre la región promotora de algunos genes tales como CDH2 y PADI1 que regulan el desarrollo hematopoyético⁴⁰². Cuando se introducía sólo la mutación c.-52A>G, el sitio de unión para MZF1 desaparecía al igual que ocurría cuando se introducía sólo la mutación c.-53C>T. La inserción de una Citosina en la posición c.-53 no cambiaba el sitio de unión para el factor de transcripción MZF1 ni su score. Si la inserción se producía en la posición c.-52 el score de unión de MZF1 aumentaba a 87.1 y, además, aparecía una secuencia de unión para SP1 (score 86.3). SP1 es un factor de transcripción que se une a regiones ricas en GC que puede actuar como activador o represor de diferentes procesos celulares tales como la diferenciación celular, el crecimiento celular, la apoptosis, la respuesta inmune, respuesta a daño en el DNA, etc⁴⁰³. La inserción de tres Citosinas en la misma región (c.-52) también daba lugar a un aumento en el score de unión de MZF1 (87.9) y a la aparición de un sitio de unión para SP1 con un score de 86.3. El programa TFSEARCH no mostró ningún sitio de unión para factores de transcripción en las regiones silvestres en las que se observaron los otros cambios (c.-44 y c.-73). Sin embargo, al introducir en la secuencia la mutación c.-44G>C, aparecía una región comprendida entre los nucleótidos -37 y -41 de unión para la proteína RUNX1/AML-1A con un score del 100%. Esta proteína, también denominada CBF, interacciona con los elementos core de un elevado número de *enhancers* y promotores y se piensa que se encuentra envuelta en el desarrollo normal de la hematopoyesis⁴⁰⁴. Cuando analizamos la mutación c.-73T>C se observó la aparición de un sitio de unión localizado entre las posiciones c.-62 y c.-69 para el factor de transcripción IKZF1/LYF-1/IKAROS con un score del 85.7%. IKAROS es un factor de

transcripción asociado a la remodelación de la cromatina que actúa como regulador de la diferenciación de linfocitos interactuando con diferentes complejos incluidos NuRD y SWI/SNF⁴⁰⁵. Por tanto, todas las mutaciones observadas en la región 5'-UTR pueden influir en la unión de factores de transcripción importantes para la actividad remodeladora de la cromatina e implicados en multitud de procesos alterados durante el proceso de tumorigénesis.

En los tumores portadores de las dos mutaciones *missense* no descritas hasta el momento, decidimos estudiar la expresión de la proteína PPP2R1A mediante la técnica de Western blot. Para ello, analizamos primero cuatro líneas celulares de endometrio, obteniendo un patrón con bandas de expresión a la altura de los 65 kDa como se ha descrito para esta proteína (figura 79).

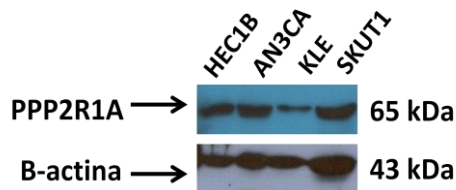


Figura 79: Western blot con inmunodetección de la proteína PPP2R1A en cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, AN3CA, KLE y SKUT1). La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

Sin embargo, el estudio de los dos tumores que contenían las mutaciones *missense* no descritas (casos 45 y 52), mostró una banda de expresión más intensa a una altura correspondiente a los 110 kDa aproximadamente (figura 80 y tabla 31).

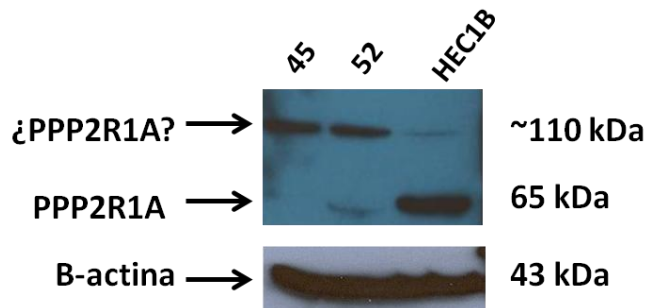


Figura 80: Western blot con inmunodetección de la proteína PPP2R1A en los dos extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones *missense* no descritas (casos 45 y 52) y la línea celular HEC1B. La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

Tabla 31: Resultados del análisis de expresión de la proteína PPP2R1A en los dos extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones *missense* no descritas. Se indica el tipo de tumor en cada caso. E3: carcinoma endometrioides de grado 3. E2: carcinoma endometrioides de grado 2.

Caso	Tipo de tumor	Expresión a 65 kDa	Expresión a 110 kDa	Mutación no descrita en PPP2R1A	Otras mutaciones patogénicas descritas en PPP2R1A
45	E3	---	Normal	p.K194N	---
52	E2	Disminuida	Normal	p.R48Q	---

Por tanto, incluimos en el estudio por Western blot otros tumores (casos 48, 49, 52, 59, 67 y 70) que presentaban alteraciones en el gen *PPP2R1A* (figura 81 y tabla 32).

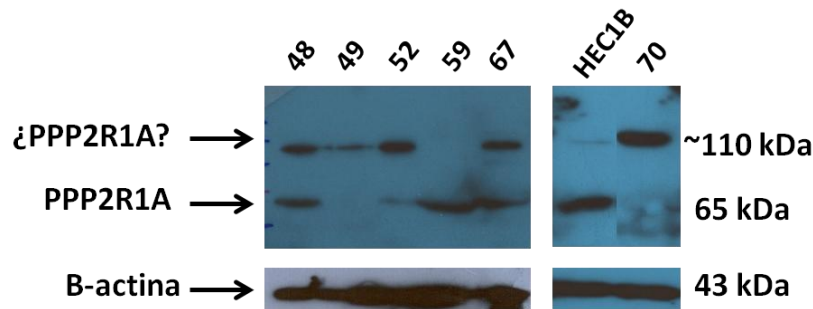


Figura 81: Western blot con inmunodetección de la proteína PPP2R1A en los extractos proteicos de 6 tumores (casos 48, 49, 52, 59, 67 y 70) y una línea celular de carcinoma de endometrio (HEC1B). La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

Tabla 32: Resultados del análisis de expresión de la proteína PPP2R1A en los extractos proteicos de 6 tumores de diverso tipo y grado histológico y con presencia de diferentes alteraciones. Se indica el tipo de tumor en cada caso. E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3.

Caso	Tipo de tumor	Expresión a 65 kDa	Expresión a 110 kDa	Mutaciones encontradas en PPP2R1A	Mutaciones patogénicas descritas en PPP2R1A
48	E1	Normal	Normal	---	p.P179R
49	Seroso	---	Disminuida	---	p.P179R
52	E2	Disminuida	Normal	p.R48Q	---
59	Seroso	Normal	---	c.-52A>G, c.-73T>C, IVS7-21C>G, IVS7+42A>G, IVS14+21A>C, p.D574D	p.P179R
67	E3	Normal	Normal	c.-52A>G, c.-53insC, IVS8+44A>G, p.D574D, IVS12-14T>C,	---
70	Seroso	---	Normal	c.-52insC, IVS7+42A>G, p.S158S	p.P179R

Como se muestra en la figura 81 y en la tabla 32, la mayoría de los tumores expresaban un fragmento de 110 kDa reconocido por el anticuerpo empleado en nuestro estudio independientemente de las mutaciones presentes en el DNA

1.1.6 ESTUDIO DE GEN *ARID1A*

El estudio del gen *ARID1A* nos permitió caracterizar 42 mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas por su naturaleza, de las cuales una fue recurrente. Se observaron seis casos con más de una mutación, lo cual supone un total de 37 tumores portadores de mutación en *ARID1A* (43.02%). Además se detectaron 10 cambios posiblemente catalogables como polimorfismos.

ARID1A es un gen caracterizado recientemente en estudios de ultrasecuenciación. La mayoría de las mutaciones encontradas en nuestro estudio no se han descrito anteriormente, siendo muchas de ellas de tipo *nosense* y *frameshift* que dan lugar a codones de parada prematuros y, por tanto, a proteínas truncadas (tabla 33).

Tabla 33: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *ARID1A*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Las mutaciones descritas por nosotros como patogénicas, en amarillo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco. (H): mutación en homocigosis.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
1, 32 y 33	IVS4+51A>G	---	Intrón 4	Sustitución	---	No	Desconocida
2	c.1650_1651insC	p.Y651fsX72	3	Inserción		No	Desconocida
3	c.C3826T	p.R1276X	15	Sustitución		Sí	Patogénica
5, 28 y 29	IVS(8)-18G>C	---	Intrón 7	Sustitución	---	No	Desconocida
5	c.2665_2667delG	p.G889fsX2	8	Delección		No	Desconocida
5 y 84	c.5547_5549delG	p.D1850fsX32	20	Sustitución		Sí	Patogénica
5, 12, 17, 27, 29, 39, 54, 58, 71, 72, 75 y 79	c.*+35_36insC	---	3'-UTR	Inserción	---	No	Desconocida
6	c.643_645delA	p.Y215fsX17	1	Delección		No	Desconocida
10 (H)	IVS17+42C>T	---	Intrón 17	Sustitución	---	No	Desconocida
14	c.256_286del	p.G86fsX14	1	Delección		No	Desconocida
17 y 18	IVS4+28delC	---	Intrón 4	Delección	---	No	Desconocida
17	c.3056_3057insA	p.E1019fsX12	11	Inserción	Unión al DNA	No	Desconocida
21	c.4689_4690insC	p.M1564fsX7	18	Inserción		Sí	Patogénica
22	c.6747_6748insA	p.E2250fsX27	20	Inserción		No	Desconocida
23	c.5334_5336delG	p.E1779fsX3	20	Delección		No	Desconocida
23	c.3977_3978insC	p.P1326fsX11	16	Inserción		No	Desconocida
26	c.4001_4002dupGCA	p.Q1334_R1335dupQ	16	Inserción	Poli-Gln	Sí	Patogénica
28	IVS17+14C>T	---	Intrón 17	Sustitución	---	No	Desconocida
30	c.826_828delG	p.G276fsX86	1	Delección		Sí	Patogénica
31	c.C1348T	p.Q450X	2	Sustitución		No	Desconocida
35	c.2271_2273delC	p.Q758fsX75	7	Delección		No	Desconocida
36	c.4408_4012delGATT	p.D337fsX143	17	Delección		No	Desconocida
39	c.3518_3520delC	p.I1173fsX6	13	Delección		No	Desconocida
39	c.C6343T	p.Q2115X	20	Sustitución		No	Desconocida
40	c.2184_2189delCCCA	p.P729fsX12	6	Delección		No	Desconocida
40	c.G5717A	p.R1906Q	18	Sustitución		No	Desconocida
41	c.5346_5347insT	p.E1783X	20	Inserción		No	Desconocida
44	c.3977_3978insC	p.P1326fsX11	16	Inserción		No	Desconocida
45	c.1635_1637delC	p.Q546fsX72	3	Delección		No	Desconocida
45	c.C4582T	p.R1528X	18	Sustitución		Sí	Patogénica
45	c.G3327A	p.R1109R	12	Sustitución		No	Desconocida
48	c.4840_4842delA	p.Q1614fsX20	18	Delección		No	Desconocida
52	c.G4610A	p.G1549D	18	Sustitución		No	Desconocida
54	IVS16+35C>T	---	Intrón 16	Sustitución	---	No	Desconocida
55	c.G5329T	p.E1776X	20	Sustitución		No	Desconocida
58	c.C2999A	p.S1000Y	11	Sustitución	Poli Ser	No	Desconocida
60	c.C4336T	p.R1446X	18	Sustitución		Sí	Patogénica
61	c.394_399del	p.V132fsX99	1	Delección		No	Desconocida
66	c.317_332del	p.N106fsX5	1	Delección		No	Desconocida
67	c.437_438insC	p.P146fsX253	1	Inserción		No	Desconocida
68	c.4311_4313delA	p.T1438fsX6	18	Delección		No	Desconocida
69	c.G6273A	p.W2091X	20	Sustitución		No	Desconocida
75	c.1112_1114delG	p.G371fsX19	1	Delección		No	Desconocida
76	c.3343_3345delC	p.P1115fsX44	12	Delección		Sí	Patogénica
78	c.471_500del	p.P158fsX65	1	Delección		No	Desconocida
79	c.3523_3525delC	p.P1175fsX4	13	Delección		Sí	Patogénica
79	c.5590_5593delAG	p.E1864fsX35	20	Delección		No	Desconocida
80	c.3241_3243delA	p.N1081fsX11	12	Delección	Unión al DNA	No	Desconocida
82	c.6340_6342delC	p.P2114fsX20	20	Delección		No	Desconocida

Resultados

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
85	IVS(11)-61G>T	---	Intrón 10	Sustitución	---	No	Desconocida
86	IVS5+57G>A	---	Intrón 5	Sustitución	---	No	Desconocida
86	g.5346_5377del	p.G1665A	Intrón 18- Exón19	Delección	---	No	Desconocida

El estudio del tumor 10 mostró un cambio intrónico en homocigosis. Aún tratándose de un posible polimorfismo, decidimos estudiar, mediante la técnica de la PCR cuantitativa, la posible pérdida de heterocigidad ya que se trata un evento muy frecuente en el gen *ARID1A* (figura 82).

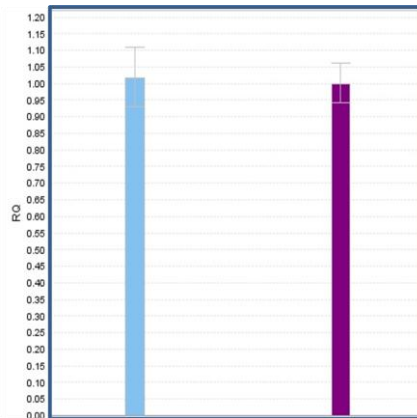


Figura 82: Resultado de la PCR cuantitativa realizada para la amplificación del exón 17 del gen *ARID1A* en el tumor 10. A la muestra control se le asignó el valor RQ=1. Se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

Como se observa en la figura 82, no existe pérdida de heterocigidad en este locus.

Nueve de las mutaciones encontradas en este trabajo estaban descritas previamente por otros grupos. Los cambios intrónicos situados en regiones alejadas de los exones los hemos considerado polimorfismos dado que la mayoría aparecía en un elevado número de tumores, entre los que se encontraban algunos que ya presentaban otras mutaciones patogénicas. Por tanto los cambios IVS4+51A>G, IVS(8)-18G>C, IVS17+42C>T, IVS4+28delC, IVS17+14C>T, IVS16+35C>T, IVS(11)-61G>T, IVS5+57G>A fueron considerados polimorfismos.

La mutación localizada en el extremo 3'-UTR c.*+35_36insC fue hallada en 12 de los 86 tumores (13.95%) y también en el DNA de la sangre periférica de los pacientes de los que disponíamos muestra. El análisis con el programa microRNA mostró ausencia de miRNAs que reconociesen a secuencia alterada. Además esta mutación se encontró en el 62% de los controles estudiados (50 individuos sanos, mayores de 60 años y no fumadores).

El estudio de las mutaciones *frameshift* y *nosense* en la sangre periférica de los casos en los que disponíamos de muestra (casos 3, 17, 21, 23, 40, 41, 44, 45, 55, 68, 69, 79, 80 y 86) mostró que todas ellas eran somáticas. La mutación c.3977_3978insC p.P1326fsX11 no se ha descrito previamente pero sí se ha descrito como patogénica una delección de una Citosina en el mismo nucleótido del exón 16³³². Las mutaciones p.N1081fsX11 y p.E1019fsX12

se localizan en el sitio de unión a la región rica en ATs del DNA localizada entre los aminoácidos 1017 y 1108. Todas las mutaciones que producen un codón de parada en codones anteriores al 1017, generan una proteína sin este dominio, imprescindible para que el complejo SWI/SIF lleve a cabo su función. Ninguna de las mutaciones caracterizadas en nuestro trabajo se localizó en las regiones ricas en Leucina.

No hemos encontrado mutaciones recurrentes, pero el tumor 36 es portador de una delección de cuatro nucleótidos GATT (c.4408_4012delGATT, p.D337fsX143) habiendo sido descrita por otros grupos la delección de las dos Timinas³³³. Por este motivo decidimos realizar un estudio de pertenencia alélica a fin de determinar si existía una delección de GA en uno de los alelos y una delección de TT en el alelo contrario. El análisis de las secuencias clonadas en el vector pGEM-T corroboró la delección de los cuatro nucleótidos en tándem en uno de los dos alelos y la ausencia de alteraciones en el contrario.

En este trabajo hemos encontrado tres mutaciones *missense*, no descritas hasta el momento, mediante el análisis *in silico* con programas de predicción (tabla 34). En los casos 40 y 52 se pudo comprobar que ambas mutaciones eran somáticas y no aparecen en la sangre periférica.

Tabla 34: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína ARID1A según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVGD.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVGD	Valor
p.R1906Q	Posiblemente patogénica	0.718	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.2429	No alineamiento	---	Poco patogénica	C35
p.G1549D	Posiblemente patogénica	0.915	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.2706	Neutra	-2.06754	Altamente patogénica	C65
p.S1000Y	Probablemente patogénica	0.998	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.9502	Patogénica	-4.90347	Altamente patogénica	C65

Como se observa en la tabla 34, los programas de predicción muestran que la mutación R1906Q no es patogénica. Además, el estudio de la conservación del aminoácido Arginina mediante el programa PolyPhen muestra una baja conservación de dicho residuo. En el caso de la mutación G1549D el aminoácido Glicina tampoco se encuentra conservado pero, sin embargo, tres de los cinco programas lo calificaron como patogénico. Sin embargo, el aminoácido Serina en la posición 1000 aparece altamente conservado lo que coincide con los resultados obtenidos en el estudio *in silico* (figura 83A, B y C).

<p>A)</p> <pre> QUERY TTDQEGPPPDGPPEK R ITATMDI sp F7DX53#1 TTDQEGPPPDGPPEK R ITATMDI sp UPI0001D54EB6#1 TTDQEGPPPDGPPEK R ITATMDI sp G3WJ89#1 GGDKEAPLPDGPPEK R ITATMDI sp F6T7C8#1 MKDREGPLPDGPPEK R ITATMDI sp F6T776#1 MKDREGPLPDGPPEK R ITATMDI sp F6T785#1 MKDREGPLPDGPPEK R ITATMDI sp F1ST82#1 TTEQEGPPPDGPPEK R ITATMDI sp UPI0001849FBA#1 TREGALPSDSSSEK R ITATMDI sp UPI0000E81F6E#1 TREGALPSDSSSEK R ITATMDI sp F7DC46#1 -----AED TPTTID sp UPI0001DE75C1#1 -----AED TPTTID sp UPI00017B0C05#1 RSSERSPPEEAPPPP LIATIDI sp UPI00017B0C04#1 RSSERSPPEEAPPPP LIATIDI sp G3NXQ1#1 ----ATEAETKSNGA PVTATIDI sp UPI00016E676F#1 -VTENS-EKKA--PP LIATIDI sp UPI00017B190C#1 ATGSSASGEERKADF E TNATER sp UPI00016E8897#1 KTSPPVHGEGKTDPE TNVIER </pre>	<p>B)</p> <pre> QUERY QRANHEGSWPSH- G TRQP--- sp F7DX53#1 QRANHEGFWPSH- G TRQP--- sp UPI0001D54EB6#1 QRANHEGFWPSH- G TRQP--- sp G3WJ89#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp F6T7C8#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp F6T776#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp F6T785#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp F1ST82#1 QRANHEGFWPSH- G TRQP--- sp UPI0001849FBA#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp UPI0000E81F6E#1 QRVNHEGFWPSH- G TRQP--- sp F7DC46#1 QRLSHEGQWQPHV N RQQP--- sp UPI0001DE75C1#1 QRLSHEGQWQPHV N RQQP--- sp UPI00017B0C05#1 QRMNHEGQWPGHY S DRQP--- sp UPI00017B0C04#1 QRMNHEGQWPGHY S DRQP--- sp G3NXQ1#1 QRMNHEGQWPGHY N DRQP--- sp UPI00016E676F#1 QRMNHEGQWPSHY N DRQP--- sp UPI00017B190C#1 QRMNHDGQWGGQM G PRQP--- sp UPI00016E8897#1 QRMNHDGQWGGQM G PRQP--- </pre>
---	---

Resultados

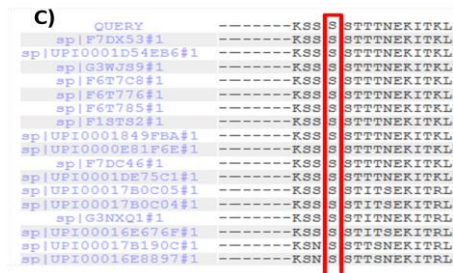


Figura 83: Alineamiento de secuencias de la proteína ARID1A en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación de los aminoácidos: A) Arginina en la posición 1906, B) Glicina en la posición 1549 y C) Serina en la posición 1000 (remarcados todos ellos con un rectángulo rojo).

Nuestro estudio permitió caracterizar dos mutaciones *inframe*, una de ellas (c.4001_4002dupGCA) en el tumor 26 ya descrita previamente como patogénica. Consistía en una duplicación del triplete GCA que daba lugar a la inserción de una Glutamina en una región del exón 16 rica en este aminoácido mostrando un tándem de 8 Glutaminas consecutivas que con la duplicación detectada se convertían en 9. La otra mutación (g.5346_5377del) fue observada en el caso 86 y consistió en una delección de 30 nucleótidos, 18 de ellos en la región intrónica más próxima al exón 19 y los 12 restantes en el comienzo del mismo (figura 84).

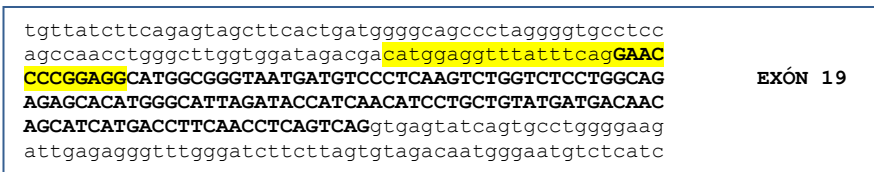


Figura 84: Secuencia del exón 19 del gen ARID1A y región intrónica más próxima, donde se observó la mutación g.5346_5377del sombreada en color amarillo.

La mutación hace que se delecionen los aminoácidos GTPE en el exón 19 pero no origina un codón de *stop* en dicho exón. El hecho de que también se deleccione parte de la región intrónica más próxima al exón puede ocasionar un cambio en el *splicing* del RNA que dé lugar a un producto alterado. Además, su localización es próxima a la región señal de localización nuclear (NLS) que abarca desde el aminoácido 1651 al 1657 (PVLKQRR), situados al final del exón 18. Por tanto, decidimos realizar un estudio en el RNA para comprobar el efecto de la mutación.

Para ello, se sintetizó cDNA a partir de RNA del tumor. En primer lugar se amplificó mediante PCR una región extensa que incluyó el exón afectado (exón 19) utilizando para ello una pareja de oligonucleótidos exónicos: 18DF y 20AR. Las condiciones de la PCR se pusieron a punto en un cDNA control observando amplificación a una temperatura de anillamiento de 61°C durante un minuto (figura 85A). En segundo lugar se realizó la amplificación con las mismas condiciones en el cDNA del tumor portador de la delección no observando producto amplificado (figura 85B). Ante la posible existencia de un procesamiento aberrante del mRNA que pudiese incluir la transcripción de nucleótidos intrónicos realizamos una segunda prueba utilizando la pareja de oligonucleótidos 18CF (exónico) y 19R (intrónico). La amplificación de dicha región

no fue posible en el caso del cDNA control debido al correcto procesamiento de su RNA y por tanto a la ausencia de regiones intrónicas (figura 85B). Sin embargo en el cDNA del tumor existió amplificación a una temperatura de anillamiento de 61°C durante un minuto. La secuenciación del fragmento amplificado mostró que los intrones 18 y parte del 19 habían sido transcritos y estaban presentes en el cDNA del tumor. También se observaba la delección de los 30 nucleótidos origen del procesamiento aberrante (figura 86).

El intrón 19 consta de 3315 pb. En caso de que se hubiese transcrito completamente sería imposible amplificar la región comprendida entre los oligonucleótidos 18DF y 20AR mediante una PCR normal. Realizamos una PCR con oligonucleótidos exónicos 20BF y 20BR a fin de comprobar si el exón 20 había sido transcrito. Obtuvimos producto de PCR en el caso del cDNA control pero no del cDNA del tumor (figura 85D). Dedujimos entonces que había una pérdida de exón 20 debido a un codón de *stop* contenido en la región del intrón 19. Aún así realizamos la amplificación con los oligonucleótidos 20AF (intrónico) y 20AR (exónico) (figura 85C). Nuestros resultados mostraron ausencia de amplificación del exón 20. Por tanto, la delección de 30 nucleótidos altera el procesamiento del RNA y causa la transcripción de los intrones 18 y 19 del gen y la pérdida del exón 20, generado así una proteína aberrante que pierde regiones importantes para el funcionamiento de la misma.

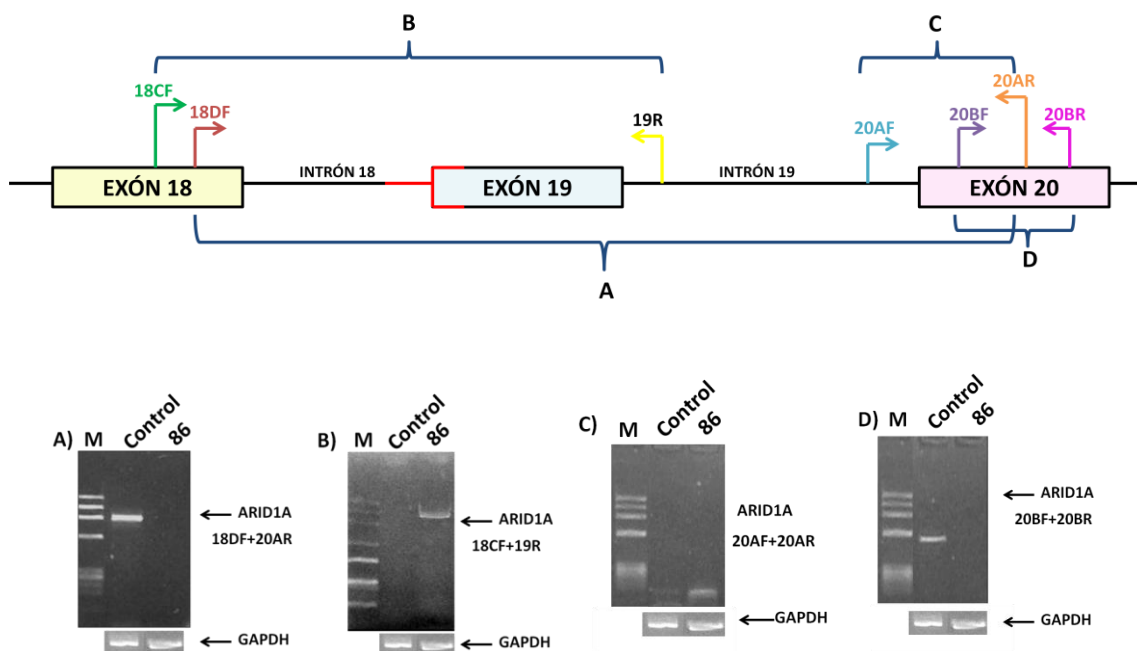


Figura 85: Imagen superior: esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para el estudio de la mutación g.5346_5377del en el cDNA del tumor 86; en rojo zona donde se produce la delección de 30 nucleótidos; A, B, C y D: PCRs realizadas a partir de la combinación de los diferentes oligonucleótidos. Imágenes inferiores: resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de cDNA resultantes de la amplificación, mediante PCR, de la región comprendida entre los oligonucleótidos 18DF+20AR (A), 18CF+19R (B), 20AF+20AR (C) y 20BF+20BR (D) del gen *ARID1A* en la muestra tumoral 86 y en una muestra control. La amplificación del gen *GAPDH* se realizó como control positivo en el proceso de síntesis de cDNA.

Resultados

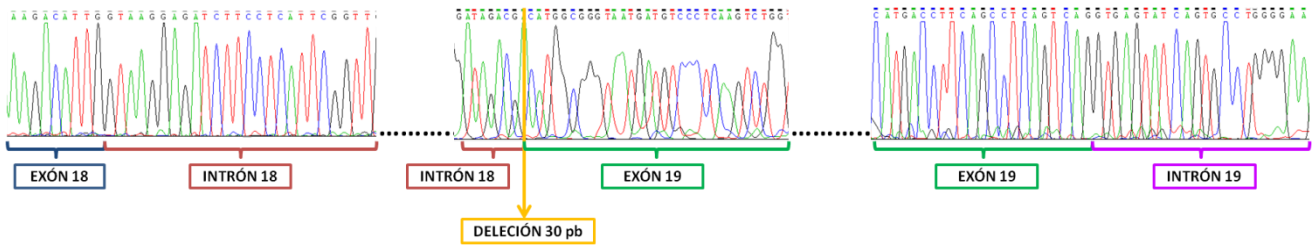


Figura 86: Secuencia del fragmento amplificado en el cDNA del tumor 86 con los oligonucleótidos 18CF (exónico)+19R (intrónico) del gen *ARID1A* en el que se observa la transcripción de los exones e intrones 18 y 19 del gen.

Por último, hemos encontrado una mutación silenciosa (c.G3327A, p.R1109R) en el tumor 45. La mutación se encuentra en el exón 12 en un tumor con otras dos mutaciones patogénicas tipo *frameshift* y *nonsense*. Este hecho sugiere que se trate de un cambio no patogénico. No obstante, realizamos estudios con los programas ESEfinder 3.0 y RESCUE-ESE 1.0 para estudiar si existían alteraciones en la secuencia ESE de unión de proteínas SR. Según el programa ESEfinder, el cambio de nucleótido no da lugar a alteraciones en los sitios ESE (dato no mostrado). El programa RESCUE-ESE mostró la aparición de dos sitios ESE más pero los cambios no fueron significativos ya que no desaparecieron sitios ya existentes ni hubo grandes alteraciones observables (figura 87A y B).

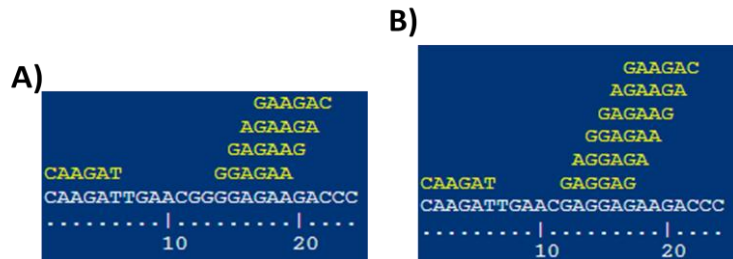


Figura 87: Resultado del análisis realizado con el programa RESCUE-ESE del efecto del cambio c.G3327A en el gen *ARID1A* sobre los sitios ESE: A) Sitios ESE presentes en la secuencia normal; B) Sitios ESE presentes en la secuencia mutada.

1.2 ONCOGENES

1.2.1 ESTUDIO DEL GEN *PIK3CA*

El estudio del gen que codifica la subunidad α de PI3K mostró un elevado número de mutaciones en los tumores incluídos en nuestro estudio, casi todas ellas tipo *missense*. En total hemos encontrado 16 mutaciones en 16 tumores, teniendo en cuenta que dos de ellos presentaron más de una mutación y que tres mutaciones aparecieron en más de un tumor (tabla 35).

Tabla 35: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *PIK3CA*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Las mutaciones descritas por nosotros como patogénicas, en amarillo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
3	c.1353_1380del	p.G451_460del	7	Delección	C2	No	Desconocida*
8	c.T3061C	p.Y1021H	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
9	c.C2974T	p.R992X	20	Sustitución	Kinasa	No	Desconocida*
10, 46 y 82	c.A3127G	p.M1043V	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
12	c.T3132G	p.N1044K	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
22 y 31	c.A3140G	p.H1047R	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
40	c.G1635T	p.E545D	9	Sustitución	Hélice	Sí	Patogénica
42	c.A3194T	p.H1065L	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
50 y 52	c.A3073G	p.T1025A	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
52	c.G3072T	p.K1024N	20	Sustitución	Kinasa	No	Desconocida
58	c.G3129T	p.M1043I	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica
65	IVS20+29C>T	---	Intrón 20	Sustitución	---	No	Desconocida
73	IVS9+17T<G	---	Intrón 9	Sustitución	---	No	Polimorfismo
78	c.G3166A	p.D1056N	20	Sustitución	Kinasa	No	Desconocida
78	c.A3172T	p.I1058F	20	Sustitución	Kinasa	No	Desconocida
78	c.*+5A<C	---	3'-UTR	Sustitución	---	No	Desconocida

*Estas mutaciones fueron descritas previamente en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio³⁷⁴.

La mayoría de las mutaciones aparecieron en el exón 20, que codifica parte del dominio kinasa de la proteína. De todas ellas, 8 no estaban descritas anteriormente, aunque las localizadas en los intrones 9 y 20 podrían considerarse polimorfismos al estar en regiones lejanas a los exones. Consideramos patogénica la mutación *nosense* p.R992X que da lugar a un codón de *stop* en el exón 20 que produciría una proteína truncada carente del dominio kinasa imprescindible para realizar su función. Destacar que la mutación p.H1047R observada en los casos 22 y 31, carcinomas endometrioides de grado 2 y 1 respectivamente, ha sido descrita por otros autores en carcinomas de endometrio de mayor grado asociada a un peor pronóstico y a una mayor tasa de recaída⁴⁰⁶

Los casos 52 y 78 mostraron dos mutaciones en el exón 20 y, por tanto, procedimos a realizar el estudio de pertenencia alélica confirmando que en ambos casos los cambios aparecían en el mismo alelo.

El estudio del exón 7 en el caso 3 mostró una delección de 9 aminoácidos que no cambiaba el marco de lectura (p.G451_460del). El estudio en sangre periférica no mostró la mutación, por lo que es considerada somática. Realizamos un estudio *in silico* con el programa de predicción de estructuras secundarias de proteínas PSIPRED observando cómo la mutación produce la delección de un fragmento de una pequeña cinta β y modifica el plegamiento de las estructuras adyacentes. Ese segmento del dominio C2 de la proteína contiene, en su variante germinal, hasta 4 cintas β que componen una estructura de mayor complejidad en forma de lámina β ⁴⁰⁷, importante para la unión a otros intermediarios celulares como los receptores tirosín-kinasa, RAS, etc., y a la membrana plasmática. En su variante mutada, esta región forma 5 cintas β y en diferente disposición pudiendo afectar a la funcionalidad de la proteína (figura 88A y B).

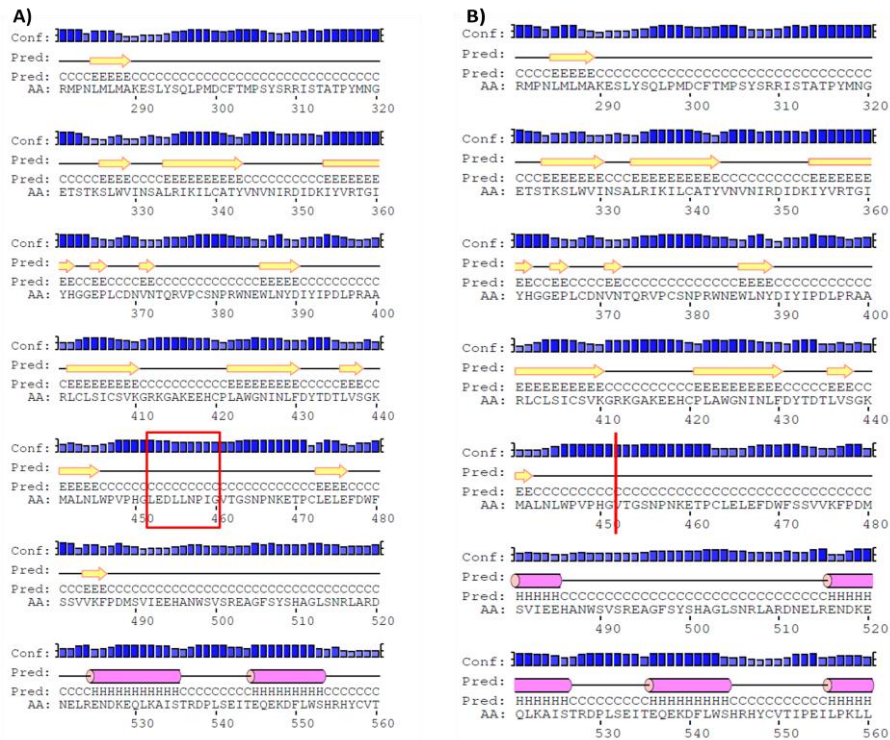


Figura 88: Estructura secundaria de las proteínas PIK3CA germinales (A) y PIK3CA mutada (B: p.G451_460del) desde el aminoácido 281 al 569, generadas por el programa PSIPRED donde se señalan las zonas delecionadas (caja y línea roja).

El programa PolyPhen nos mostró una elevada conservación filogenética de los aminoácidos delecionados y por tanto podrían tener una función importante en la proteína. Esto nos sugiere que la alteración presente en este tumor podría estar causando un efecto patogénico sobre la proteína (figura 89)

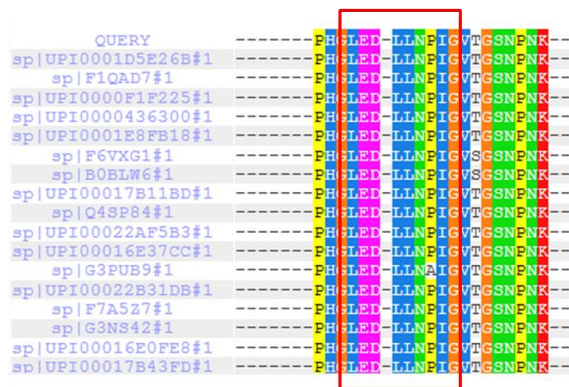


Figura 89: Alineamiento de secuencias de la proteína PIK3CA en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación de la región p.G451_460 (remarcada con un rectángulo rojo).

Por otra parte, describimos por primera vez 3 mutaciones tipo *missense* en el exón 20 del gen, de las cuales pudimos comprobar que la mutación p.K1024N no aparecía en la sangre periférica de la paciente (caso 52). Para su estudio realizamos el análisis *in silico* mediante los programas de predicción comprobando que sólo las mutaciones p.K1024N y p.D1056N causan un efecto patogénico sobre la proteína (tabla 36).

Tabla 36: Comportamiento teórico de las mutaciones tipo *missense*, no descritas anteriormente, observadas en la proteína PIK3CA según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVDG.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVDG	Valor
p.K1024N	Posiblemente patogénica	0.726	Afecta a la función	0.00	Patogénica	0.5127	Patogénica	-3.17	Altamente patogénica	C65
p.D1056N	Probablemente patogénica	0.993	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.4140	Patogénica	-4.81	Neutra	C15
p.I1058F	Benigna	0.004	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.2946	Patogénica	-4.23	Neutra	C15

Finalmente, hemos caracterizado una mutación en heterocigosis en el extremo 3'-UTR en el tumor 78: c.*+5A<C. El estudio *in silico* de sitios de unión de miRNAs con el programa MicroRNA y la base de datos miRBASE nos indicaron que en la secuencia silvestre no existía ningún miRNA. Por tanto, esta mutación podría considerarse como no patogénica, aunque son necesarios estudios en el RNA para corroborar estos resultados.

Para estudiar si las mutaciones de significado desconocido del gen *PIK3CA* observadas en nuestro trabajo afectaban a la expresión de la proteína, decidimos realizar un análisis de Western blot de la subunidad α de la proteína PI3K. En las cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial observamos un patrón de expresión similar, a pesar de que la línea celular HEC1B es portadora de una mutación en el exón 20 (c.G3145C, p.G1049R)⁴⁰⁸ (figura 90).

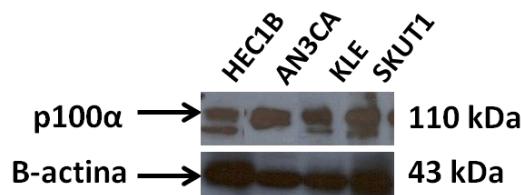


Figura 90: Western blot con inmunodetección de la proteína PIK3CA en cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, AN3CA, KLE y SKUT1). La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

En segundo lugar, analizamos las muestras tumorales que presentaban las mutaciones descritas por primera vez en nuestro trabajo: casos 3, 9, 52 y 78 (figura 91, tabla 37).

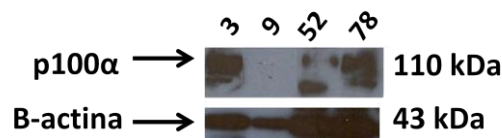


Figura 91: Western blot con inmunodetección de la proteína PIK3CA en los 4 extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones no descritas (casos 3, 9, 52 y 78). La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

Tabla 37: Resultados del análisis de expresión de la proteína PIK3CA en los 4 extractos proteicos de los tumores que mostraron mutaciones no descritas. Se indican las mutaciones no descritas y las mutaciones patogénicas descritas en cada uno de ellos.

Caso	Ausencia de expresión	Expresión disminuida	Expresión normal	Alteración en PIK3CA no descrita	Otras alteraciones en PIK3CA patogénicas descritas
3			X	p.G451_460del	
9	X			p.R992X	
52		X		p.K1024N	p.T1025A
78			X	p.D1056N/ p.I1058F/ c.*+5A<C	

La muestra 9, a pesar de presentar sólo una mutación *nosense* en heterocigosis en el exón 20 del gen, que codifica el dominio kinasa de la proteína, no mostró expresión de la misma. El tumor 52 presentó una expresión disminuida, tal vez consecuencia de que el tumor es portador de dos mutaciones *missense*. Por otra parte, en el tumor 78 se observaron tres mutaciones de significado desconocido. Sosteniendo la posibilidad de que el cambio p.D1056N fuese patogénico y los otros dos neutros, la expresión normal de la subunidad α de PI3K, al igual que en el tumor 52, sugiere que son necesarias mutaciones más “agresivas” –tipo *frameshift* o *nosense*- para dar lugar a proteínas truncadas que vean anuladas su expresión.

1.2.2 ESTUDIO DEL GEN *CTNNB1*

El estudio del gen *CTNNB1*, que codifica la proteína β -catenina, reveló la presencia de 7 mutaciones patogénicas, ya descritas por otros grupos, en 13 de los 86 tumores (15.12%) (tabla 38).

Tabla 38: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *CTNNB1*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
4	c.G94A	p.D32N	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
10, 31, 49, 50 y 68	c.C111T	p.S37F	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
12 y 24	c.A122G	p.T41A	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
22, 34 y 68	c.G101A	p.G34R	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
41	c.C98G	p.S33C	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
56	c.C134T	p.S45F	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica
69	c.C111G	p.S37F	3	Sustitución	Regulador	Sí	Patogénica

Todas las mutaciones fueron *missense* localizadas en sitios de fosforilación de la β -catenina y modificaban los residuos de Serina 33 y 37 y Treonina 41 del dominio regulador, los residuos adyacentes 32 y 34, todos ellos sitios consenso para el marcaje que realizan GSK-3 β y HIPK2 para la degradación de la proteína^{122,409} y la Serina 45, clave en el proceso de fosforilación independiente de estas dos moléculas⁴¹⁰.

El tumor 68 mostró dos mutaciones patogénicas (p.S37F y p.G34R) y, por tanto, se realizó un estudio de pertenencia alélica a fin de estudiar si ambas se encontraban en diferentes alelos o

estaban situadas en el mismo. La secuenciación confirmó que ambas aparecían en el mismo alelo.

En los casos 41, 49, 50, 68 y 69 se estudió el DNA procedente de sangre periférica y se corroboró la naturaleza somática de dichas mutaciones.

1.2.3 ESTUDIO DEL GEN *KRAS*

El estudio de los exones 2 y 3 del gen *KRAS* mostró cuatro mutaciones patogénicas diferentes ya descritas en los codones 12 y 13 de la proteína. 14 tumores (16.28%) eran portadores estas mutaciones y ninguno de ellos mostró más de una alteración (tabla 39).

Tabla 39: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *KRAS*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
15, 28, 38 y 65	c.G35T	p.G12V	2	Sustitución	Efeotor	Sí	Patogénica
23, 35, 67 y 68	c.G38A	p.G13D	2	Sustitución	Efeotor	Sí	Patogénica
34, 45, 54, 60 y 82	c.G35A	p.G12D	2	Sustitución	Efeotor	Sí	Patogénica
80	c.G35C	p.G12A	2	Sustitución	Efeotor	Sí	Patogénica

No se halló ningún cambio en el codón 61, otro de los *hotspots* más frecuentes descritos en este gen.

En los tumores 15, 23, 45, 54, 65, 68 y 80, de los cuales disponíamos de sangre periférica, realizamos el estudio de las mutaciones observando una ausencia de las mismas y por tanto confirmando su origen somático.

1.2.4 ESTUDIO DEL GEN *BRAF*

Hemos estudiado los exones 11 y 15 del gen *BRAF* observando un cambio intrónico no descrito en la bibliografía (IVS15+17delT) y una mutación patogénica (c.G1407C) descrita en homocigosis diferente a V600E, la alteración en *BRAF* más frecuentemente encontrada en diversos tipos de tumor (tabla 40).

Tabla 40: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *BRAF*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo. Los cambios descritos como polimorfismos, en blanco. (H): mutación en homocigosis.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
8	IVS15+17delT	---	Intrón 15	Delección	---	No	Desconocida
73 (H)	c.G1407C	p.G469A	11	Sustitución	Kinasa	Sí	Patogénica

La delección observada en el intrón 15 podemos considerarla como polimorfismo al no producir en la secuencia codificante y no situarse en los extremos flanqueantes próximos al exón 15.

La mutación p.G469A se localiza en la región rica en Glicinas del dominio kinasa de BRAF y está descrita como patogénica en otros tipos de tumor ya que el cambio de una Glicina por una Alanina produce una sobreactivación de la función kinasa de la proteína. Este evento produce una desregulación de las rutas mediadas por la interacción RAS-RAF cuyo efector más próximo es ERK, promoviendo así un aumento en la proliferación celular¹¹⁴. En nuestro estudio fue detectada en homocigosis en el tumor 73 y por tanto llevamos a cabo un estudio de pérdida de heterocigosidad mediante PCR cuantitativa observando la presencia de ambos alelos y por tanto ausencia de pérdida de heterocigosidad (figura 92).

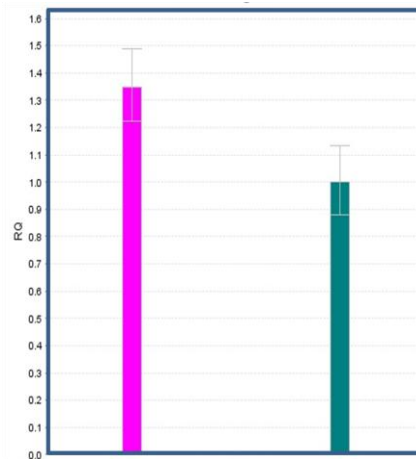


Figura 92: Resultado de la PCR cuantitativa realizada para la amplificación del exón 11 del gen *BRAF* en el tumor 73. A la muestra control se le asignó el valor RQ=1. Se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

1.2.5 ESTUDIO DEL GEN *EGFR*

El estudio del gen *EGFR* en los casos incluidos en nuestro trabajo mostró una mutación silenciosa muy frecuente en el exón 20 c.G2361A (p.Q787Q) presente en la mayoría de los tumores, algunas veces en heterocigosis (29 casos) y otros en homocigosis (40 casos). Se trata de un polimorfismo de aparición frecuente en otros tipos de tumores estudiados como por ejemplo el cáncer de pulmón⁴¹¹.

También detectamos una mutación en el intrón 18 IVS18+19G>A en dos de los tumores (casos 53 y 76) Este cambio no ha descrito hasta el momento pero podría considerarse un polimorfismo al estar localizado en una región intrónica alejada del exón 18 (tabla 41).

Tabla 41: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *EGFR*. No se detectaron mutaciones patogénicas.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
69 casos	c.G2361A	p.Q787Q	20	Sustitución	Kinasa	Sí	Polimorfismo
53 y 76	IVS18+19G>A	---	Intrón 18	Sustitución	---	No	Desconocida

1.3 ESTUDIO DE GENES DEL SISTEMA MMR (*MISMATCH REPAIR*)

El estudio de los genes *hMLH1* y *hMSH2* se llevó a cabo en una primera fase del estudio en todos los tumores (casos 1 al 41). Posteriormente se decidió realizarlo, junto con el de *hMSH6*, tan sólo en aquellos cuyos estudios inmunohistoquímicos no mostraron expresión de las proteínas. Los tumores 44, 45, 48, 55, 64, 67, 71, 75, 78, 82 y 84 no presentaban expresión de *hMLH1* y el caso 76 no expresaba *hMSH6*.

1.3.1 ESTUDIO DEL GEN *hMLH1*

Se estudiaron los 19 exones y las regiones intrónicas más próximas del gen *hMLH1* observando, en la primera fase, la presencia del polimorfismo c.G1959T p. p.L653L (casos 6 y 25) y de dos mutaciones patogénicas ya descritas por otros autores: c.1852_1853AA>GC (caso 8) y IVS3+5G>A (caso 30).

El análisis realizado de los 11 casos que no expresaban *hMLH1*, mostró la existencia del mismo polimorfismo encontrado anteriormente en otro tumor (caso 55) y la presencia de otra alteración ya descrita como polimorfismo en la bibliografía en los casos 48, 67, 82 y 84: c.A655G (p.I219V) (tabla 42).

Tabla 42: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *hMLH1*. Las mutaciones patogénicas ya descritas se señalan en color rojo.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
6, 25 y 55	c.G1959T	p.L653L	17	Sustitución	Interacción con EXO1	Sí	Polimorfismo
8	c.1852_1853AA>GC	p.K618A	16	Sustitución	Interacción con EXO1	Sí	Patogénica
30	IVS3+5G>A	---	Intrón 3	Sustitución	---	Sí	Patogénica
48, 67, 82 y 84	c.A655G	p.I219V	8	Sustitución	Estructural	Sí	Polimorfismo

Al no disponer de las sangres periféricas de los pacientes 8 y 30, no pudimos comprobar si las mutaciones eran germinales.

1.3.2 ESTUDIO DEL GEN *HMSH2*

El análisis de los 16 exones del gen *hMSH2* mostró dos variantes intrónicas polimórficas y una mutación *missense* de significado desconocido en el estudio de los tumores 1 a 41. Ante la ausencia de inmunohistoquímicas negativas para este gen en el segundo grupo, no se realizó el estudio de ninguno de los casos (tabla 43).

Tabla 43: Alteraciones encontradas en el análisis del gen *hMSH2*. No se detectaron mutaciones patogénicas.

Casos	Mutación DNA	Mutación proteína	Región	Tipo de mutación	Dominio afectado	Descrita	Función
9	c.G460A	p.A154T	3	Sustitución	Estructural	No	Desconocida*
24	IVS(13)-6T>C	---	Intrón 12	Sustitución	---	Sí	Polimorfismo
13	IVS1+9C>G	---	Intrón 1	Sustitución	---	Sí	Polimorfismo

*Estas mutaciones fueron descritas previamente en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio³⁷⁴.

La mutación p.A154T fue descrita por primera vez en nuestro estudio y con la finalidad de estudiar su posible naturaleza patogénica realizamos los estudios *in silico* con programas de predicción (tabla 44):

Tabla 44: Comportamiento teórico de la mutación tipo *missense*, no descrita anteriormente, observada en el gen *hMSH2* según los programas de predicción PolyPhen, SIFT, Pmut, Panther y GVGD.

Mutación	PolyPhen	Valor	SIFT	Valor	Pmut	Valor	Panther	Valor	GVGD	Valor
p.A154T	Benigna	0.000	Afecta a la función	0.00	Neutra	0.1396	Neutra	-1.47901	Patogénica	C55

Tres de los cinco programas utilizados sugirieron que el cambio p.A154T poseía un valor neutro mientras que los programas SIFT y GVGD lo catalogaron como patogénico.

El análisis de conservación de aminoácidos nos muestra cómo el codón 154 no se encuentra muy conservado en la evolución existiendo una gran variabilidad y observando que diversas especies contienen una Treonina en vez de una Alanina. Por tanto este cambio no produciría una alteración con efecto muy agresivo en la proteína considerándose en nuestro estudio como polimorfismo (figura 93).



Figura 93: Alineamiento de secuencias de la proteína *hMSH2* en diferentes especies, empleando el programa PolyPhen, para el estudio de la conservación del aminoácido Alanina en la posición 154 (remarcado con un rectángulo morado).

Al no disponer de la sangre periférica de la paciente 9 no pudimos de nuevo comprobar la naturaleza somática de la mutación.

1.3.3 ESTUDIO DEL GEN *HMSH6*

Se analizaron los 10 exones y las regiones intrónicas flanqueantes del gen *hMSH6* en el tumor 76, el único que mostró resultados negativos para la inmunohistoquímica, sin observar polimorfismos ni mutaciones patogénicas.

1.4 ANÁLISIS GLOBAL DEL ESTUDIO DE MUTACIONES

La única clasificación establecida, hasta hace unos años, para los carcinomas de endometrio se basaba en las características clínico-patológicas y los dividía en tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides. Se trataba de una división poco concreta debido a la heterogeneidad molecular existente en ambos grupos. Posteriormente, se establecieron perfiles según el grado molecular, incluyendo en los grado 3 a los endometrioides grado 3 junto con el resto de carcinomas no endometrioides. Este grupo abarcaría los llamados tumores de alto grado mientras que los de grado 1 (endometrioides grado 1) y los de grado 2 (endometrioides grado 2) formarían el grupo de los carcinomas de endometrio de bajo grado. Sin embargo, nosotros hemos observado que cada subtipo histológico tumoral posee unas características moleculares determinadas que conviene especificar.

Una vez caracterizadas las mutaciones detectadas en nuestro estudio, se realizó un análisis conjunto según tipo de tumor siguiendo la clasificación clínico-patológica (tipo 1 y tipo 2), la clasificación histológica por grados (grado 1, 2 y 3) y la clasificación histológica por tipos (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas).

En la tabla 45 se observa el número de mutaciones patogénicas descritas en la literatura que nosotros identificamos para cada gen y el número total de mutaciones patogénicas encontradas después de nuestro estudio. También se señala el número de tumores mutados para cada gen, independientemente de que presentasen una o más mutaciones en él.

Tabla 45: Resumen del número de mutaciones patogénicas descritas antes y después de la caracterización llevada a cabo en nuestro estudio y número de tumores mutados para cada uno de los genes estudiados.

TIPO	GEN	Nº DE MUTACIONES		Nº DE TUMORES MUTADOS
		PATOGÉNICAS DESCRITAS	PATOGÉNICAS TOTALES*	
SUPRESORES DE TUMORES	<i>PTEN</i>	28	46	44 (51.16%)
	<i>TP53</i>	21	21	18 (20.93%)
	<i>CDKN2A</i>	0	1	1 (1.16%)
	<i>CDH1</i>	0	0	0 (0.00%)
	<i>PPP2R1A</i>	3	4	7 (8.14%)
	<i>ARID1A</i>	9	41	37 (43.02%)
ONCOGENES	<i>PIK3CA</i>	8	12	15 (17.44%)
	<i>CTNNB1</i>	7	7	13 (15.12%)
	<i>KRAS</i>	4	4	14 (16.28%)
	<i>BRAF</i>	1	1	1 (1.16%)
	<i>EGFR</i>	0	0	0 (0.00%)
MMR GENES	<i>hMLH1</i>	1	1	2 (2.32%)
	<i>hMSH2</i>	0	0	0 (0.00%)
	<i>hMSH6</i>	0	0	0 (0.00%)

*se incluyen las descritas por primera vez en nuestro trabajo

Los genes que aparecieron más frecuentemente mutados en los tumores incluidos en nuestro estudio fueron *PTEN* y *ARID1A*, siendo frecuente la aparición de más de una mutación en cada tumor. Pero si segmentamos el estudio por tipos y grados tumorales, observamos que cada gen aparece alterado en un porcentaje de tumores diferente dependiendo del subgrupo al que nos refiramos (tabla 46).

Tabla 46: Porcentaje de tumores mutados en cada gen en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometrioide grado 1. E2: carcinoma endometrioide grado 2. E3: carcinoma endometrioide grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

TUMOR	TUMORES PORTADORES DE MUTACIÓN													
	<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CDH1</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>	<i>hMLH1</i>	<i>hMSH2</i>	<i>hMSH6</i>
Tipo 1	38 (60.32%)	8 (12.70%)	1 (1.59%)	0 (0.00%)	3 (4.76%)	30 (47.62%)	13 (20.63%)	11 (17.46%)	13 (20.63%)	1 (1.59%)	0 (0.00%)	1 (1.59%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Tipo 2	6 (26.09%)	10 (43.48%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (17.39%)	7 (30.43%)	2 (8.69%)	2 (8.69%)	1 (4.35%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.35%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Grado 1	18 (58.06%)	3 (9.68%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (3.23%)	11 (35.48%)	8 (25.81%)	8 (25.81%)	4 (12.90%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Grado 2	14 (58.33%)	3 (12.50%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)	14 (58.33%)	2 (8.33%)	3 (12.50%)	5 (20.83%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Grado 3	12 (38.71%)	12 (38.71%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	5 (16.13%)	12 (38.71%)	5 (16.13%)	2 (6.45%)	5 (16.13%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
E1	18 (58.06%)	3 (9.68%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (3.23%)	11 (35.48%)	8 (25.81%)	8 (25.81%)	4 (12.90%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	1 (3.23%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
E2	14 (58.33%)	3 (12.50%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)	14 (58.33%)	2 (8.33%)	3 (12.50%)	5 (20.83%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
E3	6 (75.00%)	2 (25.00%)	1 (12.50%)	0 (0.00%)	1 (12.50%)	5 (62.50%)	3 (37.50%)	0 (0.00%)	4 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Serosos	0 (0.00%)	4 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (12.50%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
C.C.	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Mixtos	1 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CR	5 (41.67%)	6 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (33.33%)	2 (16.67%)	1 (8.33%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)

Podemos apreciar cómo algunos genes aparecen frecuentemente mutados en determinados tipos de tumor, como es el caso del gen *PTEN* en los carcinomas endometrioides (60.32%) y especialmente en los carcinomas endometrioides grado 3 (75%). Por el contrario, el resto de carcinomas de alto grado apenas presentan *PTEN* alterado. El estudio del gen *TP53*, muestra una mayor incidencia de mutaciones en los carcinomas no endometrioides (43.48%), observándose un aumento con el grado del

tumor. El gen *PPP2R1A* se asocia principalmente a carcinomas tipo seroso (50%) y se muestra mutado, aunque en un menor porcentaje, en los tumores tipo endometriode (4.76%). Por otra parte, *ARID1A*, aunque se ha descrito como un gen mutado principalmente en los carcinomas endometrioides, nosotros lo hemos encontrado mutado con elevada frecuencia tanto en los carcinomas endometrioides (47.62%) como en los no endometrioides (30.43%). No muestra asociación con los carcinomas tipo seroso (0%) pero sí aparece mutado en el resto de tumores de grado 3. El gen *PIK3CA* presenta menos mutaciones que el gen *PTEN* en los carcinomas endometrioides (20.63% vs 60.32%) asociándose principalmente con los tumores de mayor grado. Finalmente, los genes *CTNNB1* y *KRAS* se encuentran mutados en un bajo porcentaje de tumores y se observa una leve asociación con los tipo endometrioides. El gen *hMLH1*, al hallarse solamente alterado en dos tumores de los estudiados, resulta difícil su asociación con alguno de los subtipos tumorales. Ocurre lo mismo con el gen *CDKN2A* que tan sólo apareció alterado en un carcinoma endometriode de grado 3. Los genes *CDH1*, *EGFR*, *hMSH2* y *hMSH6* no presentaron mutaciones patogénicas en ninguno de los tumores estudiados.

Además, se observó que el porcentaje de tumores que presentaba 0, 1, 2 y 3 o más mutaciones en el mismo o en diferentes genes variaba dependiendo del subtipo de tumor (figura 94 y tabla 47):

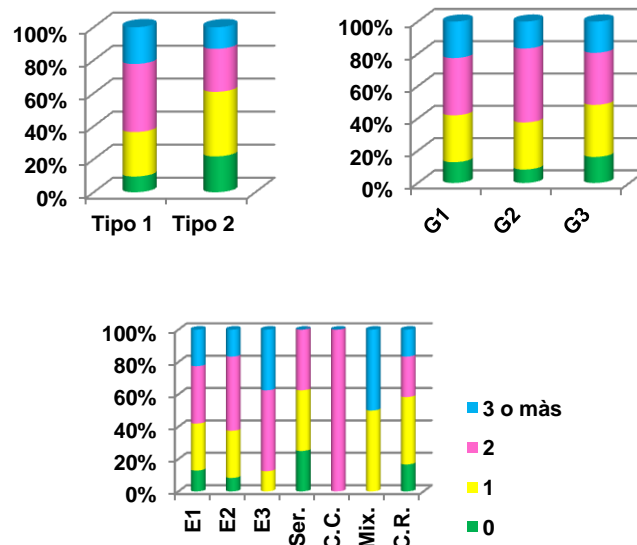


Figura 94: Representación gráfica del porcentaje de tumores con presencia de 0, 1, 2 y 3 o más mutaciones en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Resultados

Tabla 47: Porcentaje de tumores con presencia de 0, 1, 2 y 3 o más mutaciones en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Mutaciones Tumor	0	1	2	3 ó más
Tipo 1	6 (9.52%)	17 (26.98%)	26 (41.27%)	14 (22.22%)
Tipo 2	5 (21.74%)	9 (39.13%)	6 (26.09%)	3 (13.04%)
Grado 1	4 (12.90%)	9 (29.03%)	11 (35.48%)	7 (22.58%)
Grado 2	2 (8.33%)	7 (29.17%)	11 (45.83%)	4 (16.67%)
Grado 3	5 (16.13%)	10 (32.26%)	10 (32.26%)	6 (19.35%)
E1	4 (12.90%)	9 (29.03%)	11 (35.48%)	7 (22.58%)
E2	2 (8.33%)	7 (29.17%)	11 (45.83%)	4 (16.67%)
E3	0 (0.00%)	1 (12.50%)	4 (50.0%)	3 (37.50%)
Serosos	2 (25.00%)	3 (37.50%)	3 (37.50%)	0 (0.00%)
C. C.	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.00%)	0 (0.00%)
Mixtos	0 (0.00%)	1 (50.00%)	0 (0.00%)	1 (50.00%)
CR	2 (16.67%)	5 (41.67%)	3 (25.00%)	2 (16.67%)

Los carcinomas endometrioides muestran mayor porcentaje de tumores con elevado número de mutaciones que los carcinomas no endometrioides (22.22% vs 13.04%). Al realizar la comparación por grados histológicos no encontramos una relación entre el grado y el número de mutaciones por tumor, dándose el caso incluso, de que los tumores grado 1 presenten un porcentaje de tumores con tres o más mutaciones superior al de los grado 2 y grado 3 (22.58% vs 16.67% y 19.35% respectivamente).

La segmentación por subtipos histológicos permitió definir diferencias entre los endometrioides grado 1, grado 2 y grado 3. Cabría esperar que el porcentaje de tumores endometrioides con más mutaciones aumentase con el grado, sin embargo, los carcinomas endometrioides grado 2 muestran un menor porcentaje de tumores con 3 o más mutaciones que los endometrioides grado 1 y 3 (16.67% vs 22.58% y 19.35% respectivamente). Por el contrario, se observa una disminución en el porcentaje de casos no mutados: 12.90% en los endometrioides grado 1, 8.33% en los endometrioides grado 2 y 0% en los endometrioides grado 3.

Los carcinomas de endometrio tipo seroso, aún tratándose de un tumor de alto grado, no muestran un elevado número de mutaciones. Un 25% de los tumores no se encuentra mutado mientras que un 37.5% de los restantes presentan tan sólo una mutación y el otro 37.5%, dos mutaciones. En los carcinosarcomas lo más frecuente es presentar tan sólo una mutación (41.67%) pero a diferencia de los serosos sí encontramos tumores que muestran tres o más mutaciones en un porcentaje de aproximadamente del 17%.

Finalmente, de los dos carcinomas mixtos, uno de ellos presentaba una mutación (caso 66) y el otro, 4 alteraciones (caso 23). El único carcinoma de células claras que analizamos (caso 30) mostró dos mutaciones.

2. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI)

La inestabilidad de microsatélites pudo ser estudiada en aquellos pacientes de los cuales poseíamos muestra de tumor y de sangre periférica. En total fueron analizados 28 casos de los cuales 10 eran tipo endometriode grado 1, 10 endometrioides grado 2, 2 endometrioides grado 3, 3 tipo seroso, 1 mixto y 2 carcinosarcomas. Se consideró existencia de estabilidad de microsatélites cuando ninguno de los marcadores fue inestable, inestabilidad de bajo grado cuando 1 ó 2 marcadores de los 8 fueron inestables e inestabilidad de alto grado cuando 3 o más marcadores aparecieron inestables. Los resultados obtenidos se observan a continuación (tablas 48 y 49):

Tabla 48: Resultados obtenidos en el estudio de inestabilidad de microsatélites en 28 casos de carcinoma de endometrio. E: Estable; I: Inestable; MSS: Estabilidad de microsatélites; MSI-L: Inestabilidad de microsatélites de bajo grado; MSI-H: Inestabilidad de microsatélites de alto grado.

Caso	BAT25	BAT26	D5S346	D2S123	D17S250	BAT40	PAX6	MYCL1	TOTAL INESTABLES	MSI
1	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
3	E	E	I	I	I	E	E	I	4	MSI-H
15	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
16	E	E	I	E	E	E	I	I	3	MSI-H
17	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
21	I	I	E	E	I	E	I	E	4	MSI-H
23	I	E	I	I	E	E	E	E	3	MSI-H
25	E	E	E	I	I	E	E	I	3	MSI-H
37	E	E	E	E	I	I	I	E	3	MSI-H
40	E	I	I	I	I	I	I	E	6	MSI-H
41	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
42	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
43	E	E	E	E	E	I	E	E	1	MSI-L
44	I	I	E	I	I	I	I	I	7	MSI-H
45	I	I	E	E	I	I	I	I	1	MSI-L
49	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
50	I	E	E	E	E	E	E	E	1	MSI-L
52	E	E	E	E	I	E	E	E	1	MSI-L
53	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
54	E	E	I	I	E	I	E	E	3	MSI-H
55	I	I	I	I	I	E	I	I	7	MSI-H
65	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS
68	E	E	E	I	E	E	E	E	1	MSI-L
69	E	E	E	E	E	E	E	I	1	MSI-L
70	E	E	E	E	I	E	E	E	1	MSI-L
79	I	I	I	I	I	E	I	I	7	MSI-H
80	E	I	I	E	E	E	E	I	3	MSI-H
86	E	E	E	E	E	E	E	E	0	MSS

Por tanto, de los 28 casos, 9 presentaron estabilidad de microsatélites (32.14%) y 19 inestabilidad (67.86%). De los 19 con inestabilidad de microsatélites, 7 mostraron inestabilidad de bajo grado y 12 inestabilidad de alto grado. El marcador que se presentó más inestable fue D17S250 (11 casos, 39.29%) y el que apareció inestable en un menor número de muestras BAT40 (6 casos, 21.43%).

Tabla 49: Porcentaje de tumores con estabilidad de microsatélites (MSS) e inestabilidad de microsatélites (MSI) de alto y bajo grado (MSI-H y MSI-L respectivamente) en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

MSI Tipo tumor	MSS	MSI	MSI-L	MSI-H
Tipo 1	7 (31.82%)	15 (68.18%)	6 (27.27%)	9 (40.91%)
Tipo 2	2 (33.33%)	4 (66.67%)	1 (16.67%)	3 (50.00%)
Grado 1	3 (30.00%)	7 (70.00%)	3 (30.00%)	4 (40.00%)
Grado 2	4 (40.00%)	6 (60.00%)	2 (20.00%)	4 (40.00%)
Grado 3	2 (25.00%)	6 (75.00%)	2 (25.00%)	4 (50.00%)
E1	3 (30.00%)	7 (70.00%)	3 (30.00%)	4 (40.00%)
E2	4 (40.00%)	6 (60.00%)	2 (20.00%)	4 (40.00%)
E3	0 (0.00%)	2 (100.00%)	1 (50.00%)	1 (50.00%)
Serosos	1 (33.33%)	2 (66.67%)	1 (33.33%)	1 (33.33%)
C. C.	---	---	---	---
Mixtos	0 (0.00%)	1 (100.00%)	0 (0.00%)	1 (100.00%)
CR	1 (50.00%)	1 (50.00%)	0 (0.00%)	1 (50.00%)

Los tumores tipo 1 o endometrioides presentan una incidencia de inestabilidad similar a los tipo 2 o no endometrioides. Sin embargo, dentro de la inestabilidad, los carcinomas no endometrioides muestran un mayor número de marcadores inestables, siendo más frecuente la inestabilidad de alto grado en este grupo que en el de los endometrioides (50.00% vs 40.91% respectivamente).

Los tumores de grado 2 resultan algo más estables con respecto a los grado 1 y grado 3 (40% vs 30% y 25%) y los tumores grado 3 son los que presentan una mayor inestabilidad (75%). Este dato es corroborado al realizar el desglose por subtipos histológicos en el que se observa que el 100% de los tumores endometrioides grado 3 y de los carcinomas mixtos, el 66.67% de los serosos y el 50.00% de los carcinosarcomas estudiados muestra inestabilidad de microsatélites. Por tanto, parece que la inestabilidad de microsatélites se correlaciona con el grado del tumor. No obstante, sería conveniente el estudio de una muestra más amplia para poder obtener unos resultados determinantes.

3. ESTUDIO DE OTRAS ALTERACIONES EN EL MECANISMO DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS (MMR)

En ocasiones, la pérdida de expresión de las proteínas implicadas en el mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos, o su incorrecto funcionamiento, pueden ser consecuencia de la aparición de amplificaciones o deleciones de grandes fragmentos cromosómicos y la metilación de los promotores de los genes.

3.1 ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS EN LOS GENES *HMLH1*, *HMSH2* Y *HMSH6*

El estudio de grandes reordenamientos en los genes *hMLH1* y *hMSH2* se realizó, inicialmente, en los casos 1 a 41 independientemente de las características inmunohistoquímicas. Posteriormente, se decidió analizar tan sólo aquellas muestras con inmunohistoquímica negativa y ausencia de mutaciones patogénicas en los genes por lo que analizamos los casos 44, 45, 48, 55, 64, 67, 71, 75, 78, 82 y 84.

El análisis de grandes reordenamientos en el gen *hMSH6* se realizó en el caso 76, único con inmunohistoquímica negativa para la proteína hMSH6 y sin mutaciones puntuales presentes en el gen.

De los 42 casos estudiados inicialmente, 4 (8, 14, 16 y 24) presentaron amplificaciones o deleciones en los genes *hMLH1* y/o *hMSH2*. Los casos 8 y 16 mostraron una amplificación y una deleción del gen *hMLH1* respectivamente mientras que el caso 14 contenía una amplificación de los exones 8, 9 y 10 del gen *hMSH2* y el 24 del gen *hMSH2* completo. En la muestra 16 se comprobó que la deleción no se encontraba en el DNA procedente de la sangre periférica (figuras 95A, B, C, D y E)³⁷⁴.

Resultados

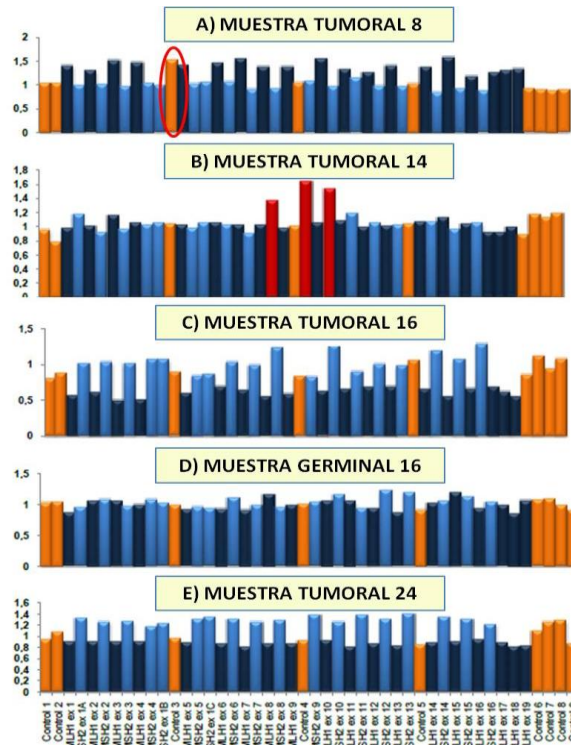


Figura 95: Gráficas con los resultados de las normalizaciones de los electroferogramas de los casos 8 (A), 14 (B), 16 (C: muestra tumoral y D: muestra germinal) y 24 (E) obtenidas en el estudio de los genes *hMLH1* y *hMSH2* mediante MLPA. Las barras naranjas corresponden a los valores de los controles, las barras azul oscuro a los valores del gen *hMLH1* y las barras azul claro a los valores del gen *hMSH2*. En el caso 8 se destaca la amplificación del control 3 correspondiente a la región cromosómica 3p22.

En la muestra número 8 se observó además de la amplificación del gen *hMLH1* completo, una amplificación del control 3 del kit comercial de MLPA utilizado correspondiente a la región cromosómica 3p22, la misma donde se localiza el gen *hMLH1* (figura 95a). Esto pudiera estar sugiriéndonos que se trata de una amplificación no limitada sólo al gen *hMLH1*, sino del cromosoma 3 completo o de parte de él. Este caso además de la amplificación completa, también presentaba una mutación patogénica en el gen *hMLH1* (c.1852_1853AA>GC).

La técnica del MLPA requiere una confirmación mediante PCR cuantitativa y por ello realizamos las comprobaciones de dichos hallazgos utilizando como control una muestra de DNA procedente de la sangre periférica de una persona sana. Realizamos las amplificaciones de los exones 3 y 10 del gen *hMLH1* en los tumores 8 y 16 (muestra tumoral y muestra procedente de la sangre periférica) y de los exones 8 y 11 del gen *hMSH2* en los tumores 14 y 24 confirmando las alteraciones detectadas por MLPA. En las figuras 96A, B, C y D se muestran las amplificaciones realizadas en los tumores 16 y 14.

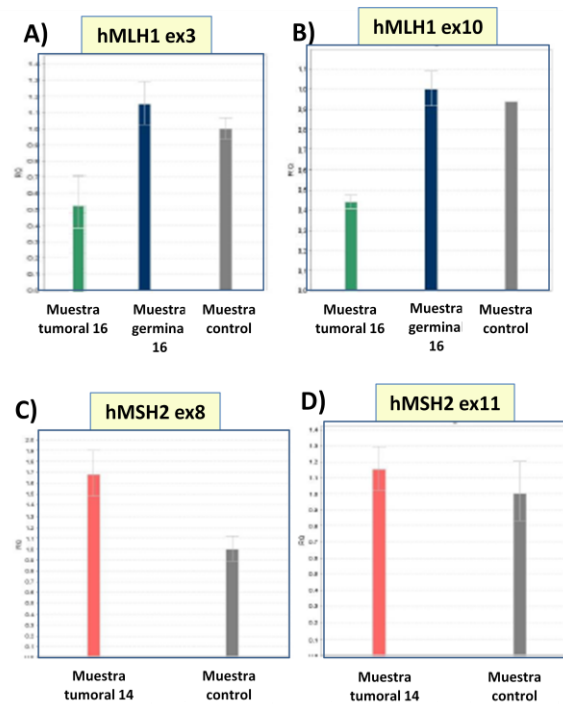


Figura 96: Gráficas donde se muestra en el eje de abscisas las muestras analizadas mediante PCR cuantitativa relativa y en el eje de ordenadas la cuantificación relativa (RQ) de los exones 3 y 10 del gen *hMLH1* (A y B); y 8 y 11 de *hMSH2* (C y D). Los valores de $RQ=1\pm 0.2$ corresponden al control empleado y a muestras donde no hay pérdidas o ganancias genéticas. Los valores de $RQ=0.5\pm 0.2$ corresponden a muestras con pérdida genética y los valores de $RQ=1.5\pm 0.2$ a muestras con ganancia genética. También se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

Ninguno de los casos que presentaron inmunohistoquímicas negativas y ausencia de mutaciones en *hMLH1* mostró reordenamientos en los genes *hMLH1* y *hMSH2* (tabla 50).

Tabla 50: Alteraciones cromosómicas detectadas en el estudio de grandes reordenamientos mediante MLPA en los genes *hMLH1* y *hMSH2*.

Caso	Gen	Alteración	Región
8	<i>hMLH1</i>	Amplificación	Gen completo
14	<i>hMSH2</i>	Amplificación	Exones 8, 9 y 10
16	<i>hMLH1</i>	Delección	Gen completo
24	<i>hMSH2</i>	Amplificación	Gen completo
44	---	Ninguna	---
45	---	Ninguna	---
48	---	Ninguna	---
55	---	Ninguna	---
64	---	Ninguna	---
67	---	Ninguna	---
71	---	Ninguna	---
75	---	Ninguna	---
78	---	Ninguna	---
82	---	Ninguna	---
84	---	Ninguna	---

El estudio del gen *hMSH6* mediante MLPA en el tumor 76 mostró la delección del exón 1 del gen *hMSH6* y la delección del exón 1 del gen *hMLH1* (figura 97, tabla 51).

Resultados

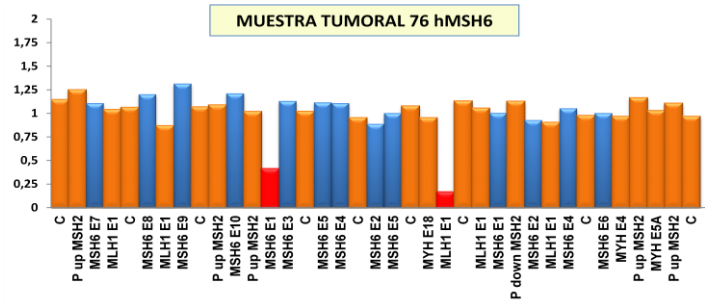


Figura 97: Gráfica con los resultados de la normalización del electroferograma del caso 76 obtenida en el estudio del gen *hMSH6* mediante MLPA. Las barras naranjas corresponden a los valores de los controles y las barras azul claro a los valores del gen *hMSH6*. Las barras rojas corresponden a los valores (alterados) del exón 1 de los genes *hMSH6* y *hMLH1*.

Tabla 51: Posibles alteraciones cromosómicas detectadas a partir del estudio de grandes reordenamientos en el gen *hMSH6* mediante MLPA.

Caso	Gen		Alteración		Región	
76	hMSH6?	hMLH1?	Delección?	Delección?	Exón 1?	Exón 1?

Comprobamos mediante PCR cuantitativa si el exón 1 de *hMSH6* estaba realmente deletado observando que existe una delección (figura 98).

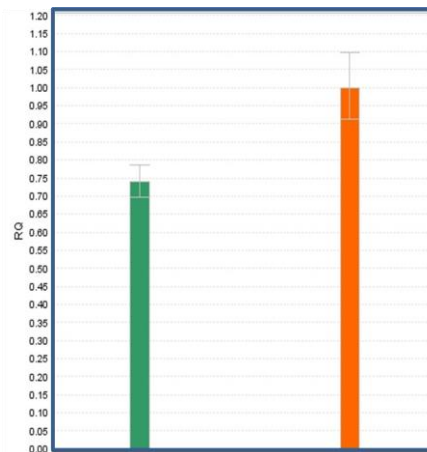


Figura 98: Resultado de la PCR cuantitativa realizada para la amplificación del exón 1 del gen *hMSH6* en la muestra 76. A la muestra control se le asignó el valor RQ=1. Se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

La alteración observada en el exón 1 del gen *hMLH1*, fue estudiada mediante MLPA comprobando que no existía delección ni amplificación de los genes *hMLH1* y *hMSH2* (figura 99).

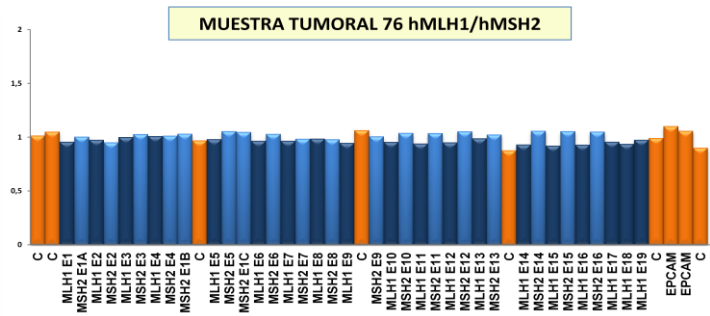


Figura 99: Gráfica con los resultados de la normalización del electroferograma del caso 76 obtenida en el estudio de los genes *hMLH1* y *hMSH2* mediante MLPA. Las barras naranjas corresponden a los valores de los controles, las barras azul oscuro a los valores del gen *hMLH1* y las barras azul claro a los valores del gen *hMSH2*.

3.2 ESTUDIO DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES *hMLH1*, *hMSH2* Y *hMSH6*

El análisis del estado de la metilación de la región promotora de los genes relacionados con la maquinaria de MMR (*hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*) se realizó en los 86 tumores (anexo 4).

42 tumores (48.84%) presentaron metilado al menos uno de los tres genes estudiados. De ellos, 9 casos (10.47%) mostraron metilados los tres genes; 12 tumores (13.95%) presentaron metilados dos de los genes: 7 *hMLH1* y *hMLH2*, 5 *hMLH1* y *hMSH6* y ninguno *hMSH2* y *hMSH6* al mismo tiempo; y 21 casos (24.42%) presentaron uno de los tres genes metilados: 9 (10.47%) *hMLH1*, ninguno (0%) *hMLH2* y 12 (13.95%) *hMSH6*. Destacar, por tanto, que *hMSH2* apenas mostró metilación y que siempre que lo hizo fue acompañado de alguno de los otros dos genes metilados. Lo más frecuente fue encontrar únicamente *hMSH6* metilado.

En general, *hMLH1* apareció metilado en 33 casos (38.37%) de los cuales 12 mostraban parámetros de metilación superiores al resto de muestras también metiladas; *hMSH2* en 13 (15.12%), de los cuales 7 mostraron una metilación elevada; y *hMSH6* en 26 (30.23%), de los cuales también en 7 también se observó parámetros de metilación superiores al del resto de tumores.

También analizamos el estado de metilación de los promotores de los genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos en función de las características clínico-patológicas e histológicas de los tumores. La presencia de metilación en uno de los genes no excluye el presentar alguno de los otros dos o, incluso ambos, también alterados. Por ello, el porcentaje total de tumores de cada subgrupo no corresponde al 100% (tabla 52).

Tabla 52: Porcentaje de tumores con presencia y ausencia de metilación en los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Metilación Tipo tumor	No metilado	Metilado	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>
Tipo 1	28 (44.44%)	35 (55.56%)	28 (44.44%)	10 (15.87%)	18 (19.05%)
Tipo 2	14 (60.87%)	9 (39.13%)	5 (21.74%)	3 (13.04%)	8 (34.88%)
Grado 1	14 (45.16%)	17 (54.84%)	11 (35.48%)	5 (16.13%)	9 (29.03%)
Grado 2	12 (50.00%)	12 (50.00%)	12 (50.00%)	5 (20.83%)	7 (26.17%)
Grado 3	17 (54.84%)	14 (45.16%)	10 (32.26%)	3 (9.68%)	10 (32.26%)
E1	14 (45.16%)	17 (54.84%)	11 (35.48%)	5 (16.13%)	9 (29.03%)
E2	12 (50.00%)	12 (50.00%)	12 (50.00%)	5 (20.83%)	7 (26.17%)
E3	3 (37.50%)	5 (62.50%)	5 (62.50%)	0 (0.00%)	2 (25.00%)
Serosos	5 (62.50%)	3 (37.50%)	2 (25.00%)	1 (12.50%)	3 (37.50%)
C. C.	1 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Mixtos	2 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CR	6 (50.00%)	6 (50.00%)	3 (25.00%)	2 (16.67%)	5 (41.67%)

Los carcinomas endometrioides mostraron un mayor grado de metilación de los genes implicados en el mecanismo MMR que los carcinomas no endometrioides. En este segundo grupo, más de la mitad de los tumores no mostraron metilados ninguno de los tres genes analizados (60.87%). En los carcinomas endometrioides el gen más frecuentemente metilado fue *hMLH1* (44.44%) seguido de *hMSH6* (19.05%) y *hMSH2* (15.87%). En los no endometrioides sin embargo, el gen que aparece metilado en un mayor número de tumores es *hMSH6* (34.88%), seguido de *hMLH1* (21.72%) y *hMSH2* (13.04%).

Sin embargo, al analizar la metilación en función de los grados histológicos observamos que aproximadamente el mismo porcentaje de tumores presentaba ausencia de metilación en los tres genes analizados. En los carcinomas de endometrio grado 1 y 2 el gen más comúnmente metilado fue *hMLH1* destacando, por ejemplo, que en los carcinomas de endometrio grado 2 estaba presente en un 50% de los tumores. El porcentaje de tumores de grado 3 que mostraron *hMLH1* y *hMSH6* metilados fue similar (32.26%). *hMSH2* fue el gen menos metilado en este grupo (9.68%) encontrándose metilado sólo en los carcinomas tipo seroso y carcinosarcomas.

Señalar por último que ninguno de los dos carcinomas mixtos estudiados ni el carcinoma de células claras presentaron metilación en ninguno de los genes MMR.

Al segmentar por grupos según las características clínico-patológicas e histológicas observamos diferencias en el número de tumores en los que ninguno de los tres genes reparadores aparecía metilado y aquellos con 1, 2 y 3 de ellos metilados (figuras 100, 101 y 102).

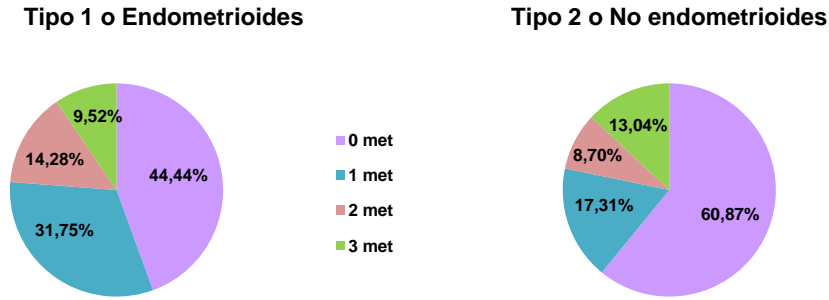


Figura 100: Porcentaje de tumores con 1, 2, 3 o ninguno de los genes MMR metilados en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica.

Los carcinomas endometrioides presentan un mayor número de tumores metilados aunque la mayoría muestran metilación en sólo uno de los tres genes MMR (31.75%). El porcentaje de tumores con dos de los genes reparadores metilados es mayor en los carcinomas endometrioides. Por el contrario, los porcentajes de casos que presentan metilación en los tres genes son similares para ambos grupos, aunque algo más elevado en los carcinomas no endometrioides (9.52% vs 13.04%).

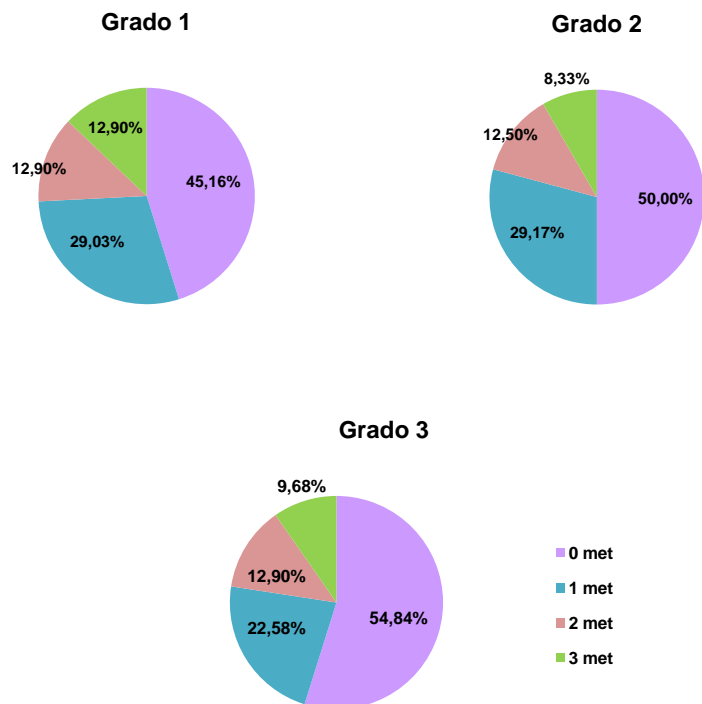


Figura 101: Porcentaje de tumores con 1, 2, 3 o ninguno de los genes MMR metilados en cada grado tumoral según clasificación histológica.

Los tres grados histológicos presentaron porcentajes de metilación similares. Tan sólo se observaron pequeñas diferencias en el porcentaje de tumores con uno de los genes reparadores, menor en el grupo de los carcinomas de endometrio de grado 3 (9.68%), y

en el porcentaje de casos con los tres genes MMR metilados, que fue mayor en los carcinomas de grado 1 (12.90%).

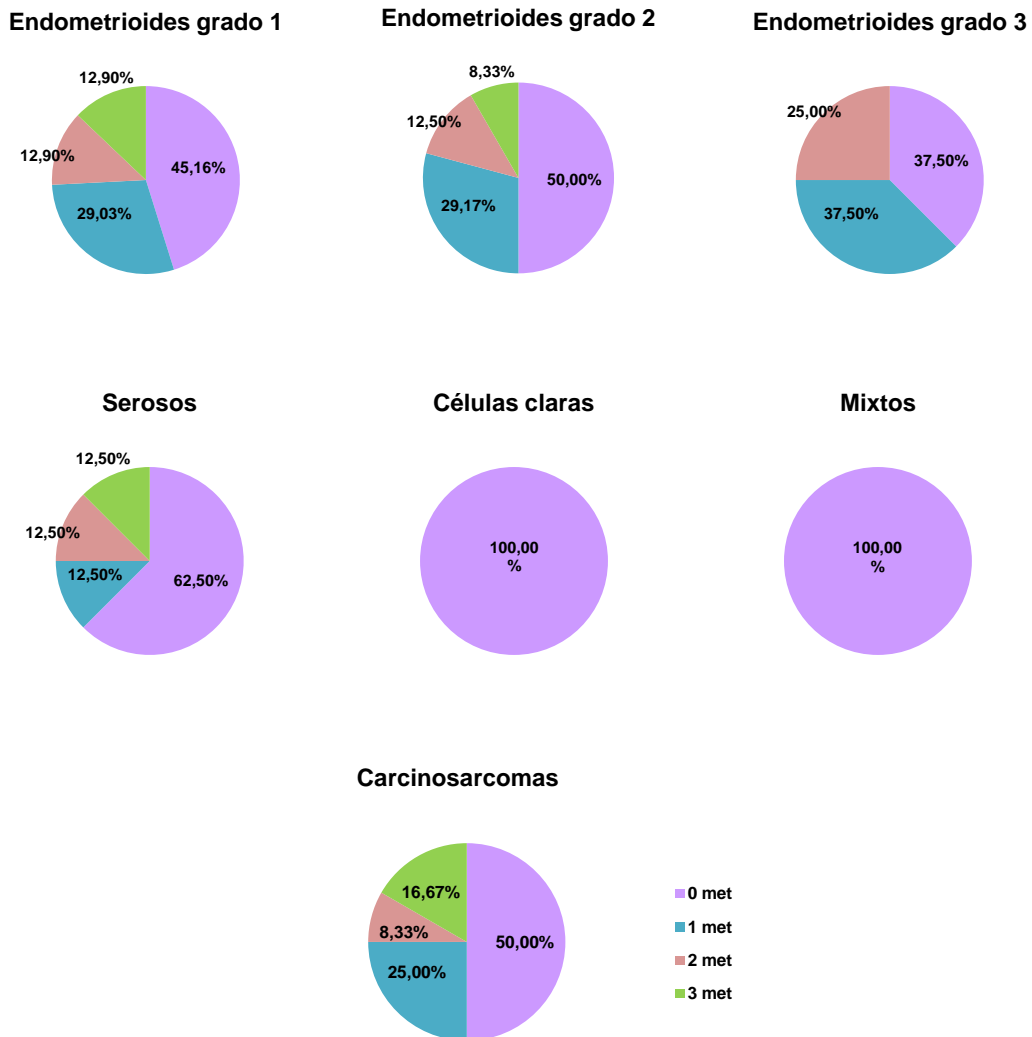


Figura 102: Porcentaje de tumores con 1, 2, 3 o ninguno de los genes MMR metilados en cada subtipo de tumor según clasificación histológica.

Los grupos de los carcinomas endometrioides grado 3, carcinomas mixtos y carcinomas de células claras no mostraron tumores con metilación en los tres genes reparadores. Además los carcinomas endometrioides grado 3 presentaron el mismo número de casos no metilados que de casos con uno de los genes metilados (37.50%). El grupo de los carcinomas serosos fue el subtipo histológico que presentó un mayor número de muestras con ausencia de metilación en los tres genes (62.50%) y el grupo de los carcinosarcomas el que constó de un mayor número de casos con los tres genes metilados (16.67%).

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS HISTONAS DESACETILASAS (HDAC) 1, 2 Y 3

El estudio de la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 se realizó en los 86 tumores y en las cuatro líneas celulares descritas anteriormente.

Las tres proteínas presentaron una expresión homogénea en las cuatro líneas celulares lo cual concuerda con el hecho de que ninguna de ellas presente alteraciones en los genes que codifican las tres histonas desacetilasas, aunque está descrito que AN3CA y SKUT1 presentan la mutación p.K9fsX22 en heterocigosis en la región microsatélite A₉ de HDAC2⁴¹² (figura 103).

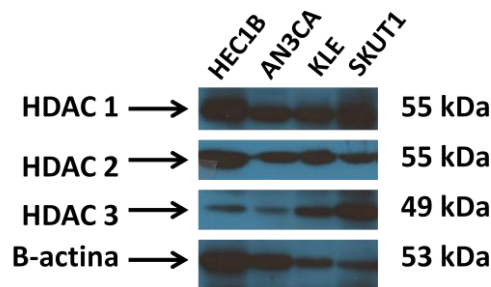


Figura 103: Western blot con inmunodetección de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, AN3CA, KLE y SKUT1). La detección de proteína β -actina corresponde al control de carga.

Al tener tamaños muy parecidos, los ensayos de Western blot se realizaron por separado para la detección de cada histona.

En la tabla 53 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot para las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en cada uno de los casos.

En los casos 2, 3, 6 y 13 no se observó expresión de las HDACs, pero tampoco de la β -actina, lo que sugiere que había surgido algún problema con los extractos proteicos bien por cuestiones de cantidad, de calidad o de una mala manipulación de los mismos. De los 82 casos restantes en los de los que sí dispusimos de extracto proteico, 32 (39.02%) presentaron ausencia de expresión de al menos una de las HDACs. Sólo 3 casos (3.66%) mostraron pérdida de expresión de las tres HDACs; 16 tumores, pérdida de expresión de dos de las HDACs (19.51%): 7 las HDAC1 y HDAC2, 4 las HDAC2 y HDAC3, 5 las HDAC1 y HDAC3; y en 13 tumores, sólo existió ausencia de expresión de una de las proteínas: 1 tumor (1.22%) no expresó la HDAC1, 12 casos (14.63%) la HDAC2 y en ninguno (0%) se dio la situación de que sólo existiese ausencia de expresión de la proteína HDAC3.

Finalmente, debemos destacar que en 16 tumores (19.51%) no se detectó expresión de la proteína HDAC1, en 26 (31.71%) no se detectó expresión de la proteína HDAC2 y en 12 (14.63%) no se detectó expresión de la proteína HDAC3.

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico

Resultados

Tabla 53: Resultados del análisis de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en los 86 carcinomas endometriales incluidos en nuestro estudio.

Caso	Expresión HDAC1	Expresión HDAC2	Expresión HDAC3	Caso	Expresión HDAC1	Expresión HDAC2	Expresión HDAC3
1	No	No	No	44	Sí	Sí	Sí
2	ND	ND	ND	45	Sí	Sí	Sí
3	ND	ND	ND	46	Sí	Sí	Sí
4	Sí	Sí	Sí	47	No	No	Sí
5	Sí	Sí	Sí	48	Sí	Sí	Sí
6	ND	ND	ND	49	No	No	Sí
7	Sí	Sí	Sí	50	No	No	Sí
8	Sí	No	No	51	Sí	Sí	Sí
9	Sí	Sí	Sí	52	Sí	No	Sí
10	Sí	Sí	Sí	53	Sí	Sí	Sí
11	No	Sí	No	54	Sí	No	Sí
12	No	Sí	No	55	Sí	Sí	Sí
13	ND	ND	ND	56	Sí	Sí	Sí
14	No	Sí	No	57	Sí	No	Sí
15	Sí	Sí	Sí	58	Sí	No	Sí
16	Sí	Sí	Sí	59	Sí	Sí	Sí
17	Sí	No	No	60	Sí	No	Sí
18	No	No	No	61	Sí	Sí	Sí
19	No	Sí	No	62	Sí	Sí	Sí
20	Sí	Sí	Sí	63	No	No	Sí
21	Sí	Sí	Sí	64	Sí	Sí	Sí
22	Sí	Sí	Sí	65	Sí	No	Sí
23	Sí	Sí	Sí	66	Sí	Sí	Sí
24	Sí	Sí	Sí	67	Sí	Sí	Sí
25	No	Sí	No	68	Sí	Sí	Sí
26	Sí	Sí	Sí	69	Sí	Sí	Sí
27	Sí	Sí	Sí	70	Sí	No	Sí
28	Sí	Sí	Sí	71	Sí	No	Sí
29	Sí	Sí	Sí	72	Sí	Sí	Sí
30	Sí	No	No	73	Sí	No	Sí
31	No	No	Sí	74	Sí	Sí	Sí
32	Sí	Sí	Sí	75	Sí	Sí	Sí
33	Sí	Sí	Sí	76	Sí	Sí	Sí
34	No	No	No	77	Sí	Sí	Sí
35	Sí	Sí	Sí	78	Sí	Sí	Sí
36	Sí	Sí	Sí	79	Sí	Sí	Sí
37	No	Sí	Sí	80	Sí	No	Sí
38	Sí	No	Sí	81	No	No	Sí
39	Sí	Sí	Sí	82	Sí	Sí	Sí
40	No	No	Sí	83	Sí	Sí	Sí
41	Sí	Sí	Sí	84	Sí	No	Sí
42	Sí	Sí	Sí	85	Sí	No	No
43	Sí	Sí	Sí	86	Sí	No	Sí

Tabla 54: Porcentaje de tumores con presencia y ausencia de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometrioide grado 1. E2: carcinoma endometrioide grado 2. E3: carcinoma endometrioide grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Expresión Tipo tumor	Todas expresadas	Ausencia de expresión	No HDAC1	No HDAC2	No HDAC3
Tipo 1	40 (63.49%)	23 (36.51%)	10 (15.87%)	20 (31.74%)	8 (12.70%)
Tipo 2	13 (56.52%)	10 (43.48%)	6 (26.09%)	7 (30.43%)	4 (17.39%)
Grado 1	19 (61.29%)	12 (38.71%)	7 (22.58%)	11 (35.48%)	5 (16.13%)
Grado 2	16 (66.67%)	8 (33.33%)	3 (12.50%)	6 (25.00%)	3 (12.50%)
Grado 3	18 (58.06%)	13 (41.94%)	6 (19.35%)	10 (32.26%)	4 (12.90%)
E1	19 (61.29%)	12 (38.71%)	7 (22.58%)	11 (35.48%)	5 (16.13%)
E2	16 (66.67%)	8 (33.33%)	3 (12.50%)	6 (25.00%)	3 (12.50%)
E3	5 (62.50%)	3 (37.5%)	0 (0.00%)	3 (37.50%)	0 (0.00%)
Serosos	4 (50.00%)	4 (50.00%)	3 (37.50%)	2 (25.00%)	2 (25.00%)
C. C.	0 (0.00%)	1 (100.00%)	0 (0.00%)	1 (100.00%)	1 (100.00%)
Mixtos	2 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CR	7 (58.33%)	5 (41.67%)	3 (25.00%)	4 (33.33%)	1 (8.33%)

En los carcinomas endometrioides el porcentaje de tumores que presentaron expresión de las tres proteínas HDACs fue algo más elevado que en los carcinomas no endometrioides (63.49% vs 56.52%). En ambos grupos HDAC2 fue la histona desacetilasa que mostró mayor ausencia de expresión (31.74% y 30.43%), seguida de HDAC1, que en los no endometrioides no se expresó en un elevado porcentaje de tumores (26.09%). Al subdividir los tumores según el grado histológico observamos que el grupo de los carcinomas de endometrio grado 3 presentó un mayor número de tumores con ausencia de al menos una de las proteínas HDAC (41.94%). En los tres grados la histona desacetilasa HDAC2 mostró mayor ausencia de expresión seguida de HDAC1 y HDAC3. En el grupo de los carcinomas de endometrio grado 2 HDAC1 y HDAC3 no se expresaron en el mismo número de tumores (12.50%) (tabla 54).

Cuando subdivimos nuestros casos según los subtipos histológicos, detectamos que el único carcinoma de células claras mostraba ausencia de expresión tanto en HDAC2 como en HDAC3 y que los dos casos de carcinomas mixtos estudiados presentaban expresión normal en las tres proteínas. Estos resultados no nos permiten generalizar debido al pequeño tamaño muestral. Al analizar los carcinomas endometrioides detectamos tres tumores de grado 3 (casos 38, 52 y 80) que no expresaban la proteína HDAC2. Los 5 tumores endometrioides de grado 3 restantes expresaban las tres histonas desacetilasas. Los carcinomas serosos mostraron principalmente ausencia de expresión de la proteína HDAC1 (37.50%). En el subtipo de los carcinosarcomas se hallaron unas características similares a las de los endometrioides aunque con una pequeña disminución en el porcentaje de tumores con ausencia de expresión de HDAC3 (8.33%).

Los tumores incluidos en nuestro estudio presentaron, con frecuencia, ausencia de expresión de más de una histona desacetilasa. A continuación se presenta el porcentaje

de tumores en los que existió expresión de las tres proteínas HDAC y en los que no se expresaron 1, 2 y 3 de las histonas desacetilasas analizadas (figura 104A, B y C).

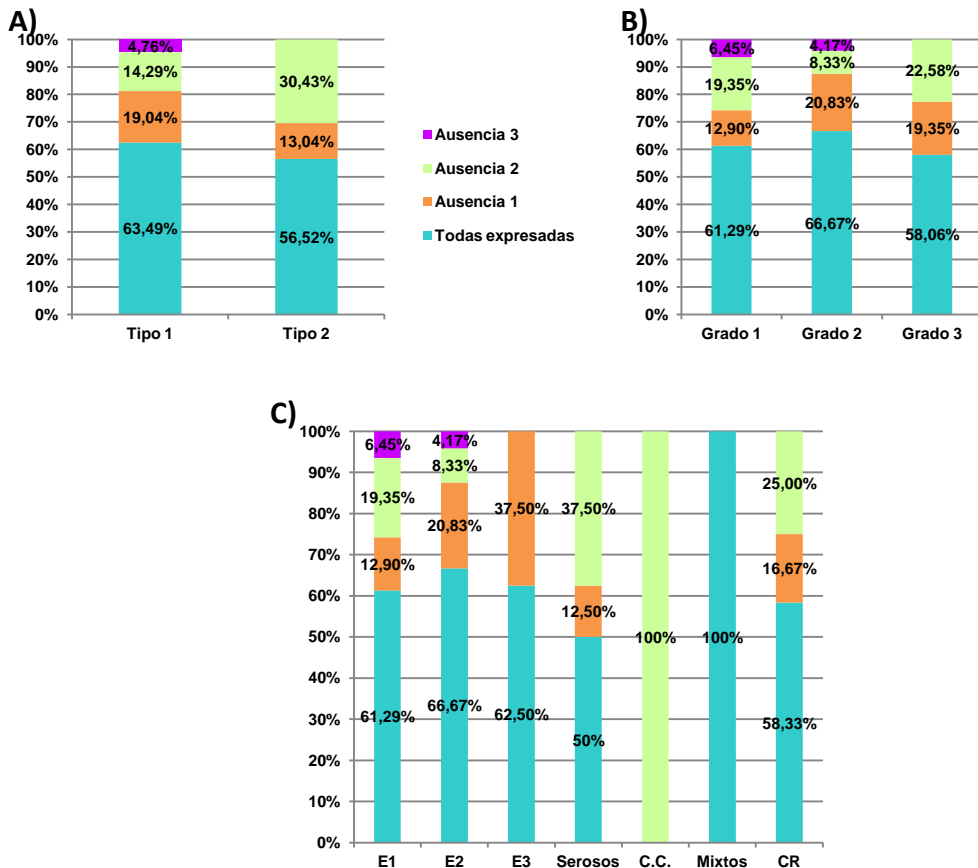


Figura 104: Porcentaje de tumores con ausencia de expresión de 0, 1, 2 ó 3 proteínas HDACs en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (A: tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (B: grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (C: endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Al dividir los tumores según las características clínico-patológicas se observó que en el grupo de los carcinomas no endometrioides lo más común era que las tres proteínas HDAC se expresasen (56.52%). Ninguno de ellos mostró ausencia de expresión de las tres proteínas al mismo tiempo al contrario que los carcinomas endometrioides, en los cuales alrededor de un 5% de los tumores no expresaron ninguna de ellas.

Alrededor de un 63% de los carcinomas de grado 1 y 2 expresaban las tres proteínas incluidas en nuestro estudio. Los carcinomas de endometrio grado 3 mostraron un menor porcentaje de tumores que expresaban las tres proteínas (58.06%) pero no presentaron ningún caso en el que no se expresasen ninguna de ellas. Al dividir los tumores según subtipos histológicos observamos que los carcinomas endometrioides grado 3 sólo mostraban ausencia de una (37.50%) o de ninguna de las proteínas HDAC (62.50%).

Por último, el 50% de los carcinomas serosos (porcentaje inferior a los observados en los otros grupos) expresaron las tres proteínas HDACs y ninguno de ellos mostró ausencia

de expresión de las tres al igual que ocurrió en los carcinosarcomas. El tumor de células claras incluido en nuestro estudio mostró ausencia de expresión de dos HDACs y los dos carcinomas mixtos expresaron las tres proteínas.

5. ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS

La longitud de los telómeros se ha relacionado con diversos estados patológicos incluidos la tumorigénesis. Sin estar claro si se trata de un evento que colabora con la aparición del tumor o si es tan sólo una consecuencia del proceso, ha sido vinculado a diversos tipos de cánceres humanos^{372,373}.

La longitud media relativa de cada tumor se observa en el anexo 5. La longitud telomérica media, la desviación estándar y los p valores obtenidos al comparar los tumores de acuerdo con su clasificación clínico-patológica, grado y subtipo histológico se muestra en la tabla 55:

Tabla 55: Longitud telomérica media y desviación estándar (DEVST) en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). p valores resultantes de la comparación de las longitudes teloméricas de los componentes de cada uno de las tres clasificaciones. G1: grado 1. G2: grado 2. G3: grado 3. E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Tipo					Grado					Subtipo				
	Nº casos	Media	DEVST	p valor		Nº Casos	Media	DEVST	p valor		Nº Casos	Media	DEVST	p valor
Tipo 1	63	1.23	0.61	0.64	G1	31	1.25	0.56	0.84	E1	31	1.25	0.56	0.51
					G2	24	1.31	0.69		E2	24	1.31	0.69	
					G3	31	1.21	0.64		E3	8	0.90	0.47	
Serosos	8	1.48	0.67											
C.C.	1	1.54	---											
Mixtos	2	0.97	0.53											
CR	12	1.25	0.71											
Tipo 2	23	1.32	0.66											

Los carcinomas endometrioides y los carcinomas no endometrioides no presentaron importantes diferencias en su longitud telomérica (1.32 vs 1.23). Sin embargo, al subdividirlos según grado histológico, los carcinomas de grado 3 presentaron una longitud de telómeros menor pero tampoco muy diferente de la media observada en los otros dos grados (1.21 vs 1.25 en grado 1 y 1.31 en grado 2).

Por otra parte, los carcinomas endometrioides de grado 3 y los carcinomas mixtos mostraron una menor longitud telomérica (0.90 y 0.97 respectivamente) mientras que los carcinomas tipo seroso y de células claras presentaron la longitud telomérica más elevada de todos los grupos (1.48 y 1.54 respectivamente).

Todas las distribuciones fueron no paramétricas y, por tanto, se aplicó un test de U Mann Whitney para comparar grupos dos a dos y una Anova de una vía para comparar más de dos grupos, por ejemplo al comparar los tipos de tumor y los grados. El grupo de tumores de células claras fue apartado del estudio debido a que estaba compuesto de tan sólo una muestra.

Al comparar la longitud relativa de los telómeros según el tipo de tumor, no se observaron diferencias significativas ($p=0.64$) (figura 105A). De igual forma, el p valor resultado de comparar los tres grados tumorales tampoco resultó ser significativo ($p=0.84$) (figura 105B). Al agrupar según subtipos histológicos las diferencias no fueron significativas ($p=0.51$) pero se observó que los carcinomas mixtos presentaban una longitud telomérica menor que la del resto de los grupos (figura 105C).

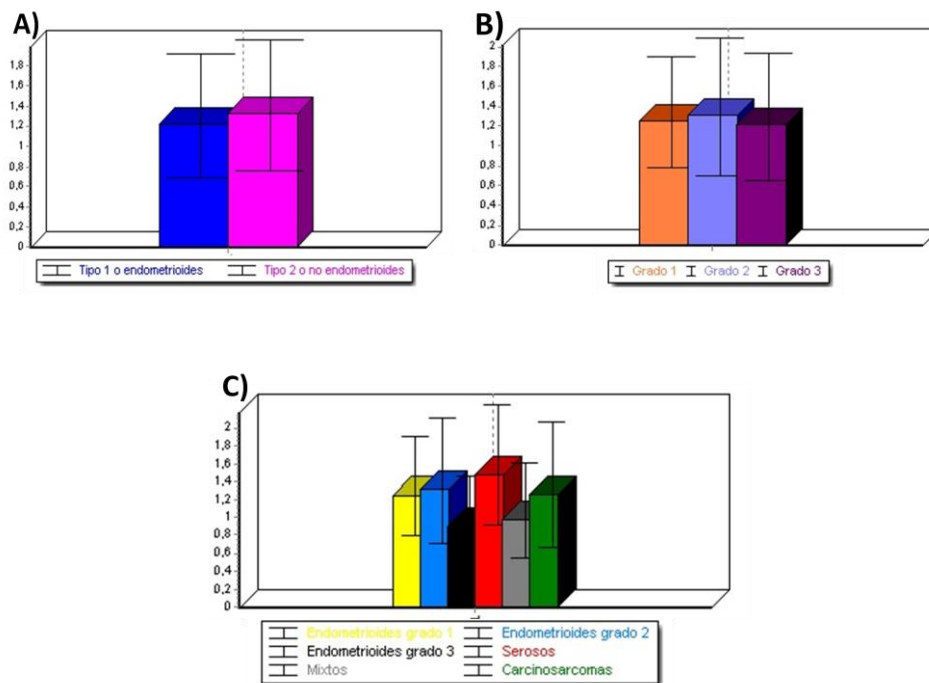


Figura 105: Representación gráfica de la longitud telomérica media en cada tipo de tumor según clasificación clínico-patológica (A: tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (B: grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (C: endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas).

En la tabla 56 se muestran los p valores resultantes al comparar los diferentes subgrupos. En ella no se incluyen los grupos de los carcinomas endometrioides grado 1 y grado 2 porque son sinónimo de tumores grado 1 y tumores grado 2 respectivamente.

Tabla 56: p valores resultantes de la comparación dos a dos de las longitudes teloméricas medias de los distintos tipos tumorales contenidos en la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides) e histológica según grados (grado 1, 2 y 3) y subtipos (endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). G1: carcinoma grado 1. G2: carcinoma grado 2. G3: carcinoma grado 3. E3: carcinoma endometriode grado 3. Mix.: carcinoma mixto. CR: carcinosarcoma.

	Tipo 1	Tipo 2	G1	G2	G3	E3	Serosos	Mix.	CR
Tipo 1	---	0.64	---	---	---	---	0.35	<0.001	0.99
Tipo 2	---	---	0.88	0.96	---	0.23	---	---	---
G1	---	---	---	0.84	0.67	0.11	0.41	<0.001	0.95
G2	---	---	---	---	0.63	0.18	0.59	<0.001	0.75
G3	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E3	---	---	---	---	---	---	0.13	<0.001	0.37
Serosos	---	---	---	---	---	---	---	<0.001	0.56
Mix.	---	---	---	---	---	---	---	---	<0.001
CR	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre los carcinomas mixtos y el resto de grupos.

6. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS *TERT*-1327C>T Y *TERC*-63G>A

Los polimorfismos -1327C>T y -63G>A se lo localizan en las regiones 5'-UTR de las subunidades de la telomerasa *TERT* y *TERC* respectivamente. Ambos han sido relacionados con una baja actividad de la telomerasa y, por tanto, con un acortamiento telomérico prematuro^{395,396}. Decidimos analizar los dos polimorfismos mediante análisis de genotipado por PCR a tiempo real a fin de estudiar si existe una correlación entre aquellos grupos con telómeros más cortos y la presencia del alelo C en el caso de *TERT*-1327C>T o el alelo G en el de *TERC*-63G>A.

Los resultados del genotipado se muestran en el anexo 5. En la tabla 57 se presentan las frecuencias de aparición de cada uno de los genotipos según tipos, grados y subtipos tumorales.

Tabla 57: Distribución de genotipos de los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A* y los p valores resultantes de comparar los diferentes tipos tumorales contenidos en la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides), grado (grado 1, 2 y 3) y subtipo histológico (endometrioides grado 1, endometrioides grado 2, endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). E1: carcinoma endometriode grado 1. E2: carcinoma endometriode grado 2. E3: carcinoma endometriode grado 3. C.C.: carcinoma de endometrio de células claras. CR: carcinosarcoma.

Tumor	<i>TERT-1327C>T</i>				<i>TERC-63G>A</i>			
	C/C	C/T	T/T	p valor	G/G	G/A	A/A	p valor
Tipo 1	19 30.2%	37 58.7%	7 11.1%	0.027	4 6.3%	18 28.6%	41 65.1%	0.739
Tipo 2	13 56.5%	6 26.1%	4 17.4%		1 4.3%	5 21.7%	17 73.9%	
Grado 1	7 22.6%	20 64.5%	4 12.9%	0.013	2 6.5%	9 29.0%	20 64.5%	0.929
Grado 2	8 33.3%	15 62.5%	1 4.2%		1 4.2%	5 20.8%	18 75.0%	
Grado 3	17 54.8%	8 25.8%	6 19.4%		2 6.5%	9 29.0%	20 64.5%	
E1	7 22.6%	20 64.5%	4 12.9%	0.038	2 6.5%	9 29.0%	20 64.5%	0.752
E2	8 33.3%	15 62.5%	1 4.2%		1 4.2%	5 20.8%	18 75.0%	
E3	4 50.0%	2 25.0%	2 25.0%		1 12.5%	4 50.0%	3 37.5%	
Serosos	4 50.0%	4 50.0%	0 0.0%		1 12.5%	3 37.5%	4 50.0%	
C. C.	1 100.0%	0 0.0%	0 0.0%		0 0.0%	0 0.0%	1 100.0%	
Mixtos	0 0.0%	1 50.0%	1 50.0%		0 0.0%	0 0.0%	2 100.0%	
CR	8 66.7%	1 8.3%	3 25.0%		0 0.0%	2 16.7%	10 83.3%	

Se observa que el genotipo C/T del polimorfismo *TERT-1327C>T* aparece con una mayor frecuencia en los tumores tipo 1 o endometrioides en comparación con los tipo 2 (p=0.027). Además existen diferencias entre la distribución de los genotipos según el grado (p=0.013) ya que el genotipo C/T es menos frecuente al aumentar el grado del tumor, a diferencia del genotipo C/C que muestra un comportamiento contrario. Al analizar el polimorfismo *TERC-63G>A* no se detectaron diferencias en la distribución de los genotipos.

Cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo C del polimorfismo *TERT-1327C>T*, no observamos diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo el ser portador del alelo T se asocia con los carcinomas tipo 1 o endometrioides (tabla 58).

Tabla 58: Distribución de la agrupación de genotipos del polimorfismo *TERT-1327C>T* y los p valores resultantes de la comparación dos a dos según la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides) e histológica (grado 1, 2 y 3).

Tumor	<i>TERT-1327C>T</i>							
	C/C+C/T	T/T	p valor		T/T+C/T	C/C	p valor	
Tipo 1	56 88.9%	7 11.1%	0.440		44 69.8%	19 30.2%	0.025	
Tipo 2	19 82.6%	4 17.4%			10 43.5%	13 56.5%		
Grado 1	27 87.1%	4 12.9%	0.264	0.094	24 77.4%	7 22.6%	0.375	0.375
Grado 2	23 95.8%	1 4.2%			16 66.7%	8 33.3%		
Grado 3	25 80.6%	6 19.4%			17 54.8%	14 45.2%		

Cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo G y los genotipos que contenían el alelo A en el polimorfismo *TERC-63G>A* no observamos asociación con ninguno de los grupos (tabla 59).

Tabla 59: Distribución de la agrupación de genotipos del polimorfismo *TERC-63G>A* y los p valores resultantes de la comparación dos a dos según la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides) e histológica (grado 1, 2 y 3).

Tumor	<i>TERC-63G>A</i>							
	G/G+A/G	A/A	p valor		A/A+A/G	G/G	p valor	
Tipo 1	22 34.9%	41 65.1%	0.439		59 93.7%	4 6.3%	0.726	
Tipo 2	6 26.1%	17 73.9%			22 95.7%	1 4.3%		
Grado 1	11 35.5%	20 64.5%	0.404	0.404	29 93.5%	2 6.5%	0.711	0.711
Grado 2	6 25.0%	18 75.0%			23 95.8%	1 4.2%		
Grado 3	11 35.5%	20 64.5%			29 93.5%	2 6.5%		

No obstante realizamos una comprobación dos a dos comparando los diferentes tipos y grados histológicos a fin de estudiar las posibles diferencias entre la frecuencia de aparición del alelo C en el caso del polimorfismo en *TERT-1327C>T* y la frecuencia de aparición del alelo G en el polimorfismo *TERC-63G>A*.

En el primer caso se destaca la significación existente entre la frecuencia de aparición del alelo C cuando comparamos los carcinomas mixtos con los carcinomas grado 2 ($p=0.019$) y con los tipo seroso ($p=0.035$). Esta significación seguramente sea debida al reducido número de muestras contenidas en el grupo de los carcinomas mixtos pero coincide con la presencia de telómeros cortos. Sin embargo, el alelo G tan sólo mostró diferencias en la frecuencia de aparición cuando se compararon los carcinosarcomas con los carcinomas endometrioides de grado 3 ($p=0.035$) (tabla 60).

Tabla 60: p valores resultantes de la comparación dos a dos de los genotipos que contenían el alelo C en el polimorfismo *TERT-1327C>T* y los genotipos que contenían el alelo G en el polimorfismo *TERC-63G>A* de los distintos tipos tumorales contenidos en la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides) e histológica según grados (grado 1, 2 y 3) y subtipos (endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). G1: carcinoma grado 1. G2: carcinoma grado 2. G3: carcinoma grado 3. E3: carcinoma endometrioide grado 3. Mix.: carcinoma mixto. CR: carcinosarcoma.

	<i>TERT-1327C>T</i> C/C+C/T vs T/T	Tipo 1	Tipo 2	G1	G2	G3	E3	Serosos	Mix.	CR
<i>TERC-63G>A</i> G/G+G/A vs A/A	Tipo 1	---	0.440	---	---	---	---	0.321	0.99	0.195
Tipo 1	---	Tipo 2	---	0.646	0.142	---	0.639	---	---	---
Tipo 2	0.439	---	G1	---	0.264	0.490	0.398	0.284	0.156	0.335
G1	---	0.439	---	G2	---	0.094	0.080	0.557	0.019	0.061
G2	---	0.932	0.404	---	G3	---	---	---	---	---
G3	---	---	1.000	0.404	---	E3	---	0.131	0.490	1.000
E3	---	0.064	0.166	0.053	---	---	Serosos	---	0.035	0.125
Serosos	0.404	---	0.452	0.186	---	0.614	---	Mix.	---	0.469
Mix.	0.304	---	0.302	0.420	---	0.283	0.197	---	CR	---
CR	0.533	---	0.228	0.571	---	0.035	0.111	0.533	---	---

7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS RESULTADOS

A continuación analizamos los datos obtenidos mediante tablas de contingencia comparando los grupos tipo 1 y tipo 2; grado 1, grado 2 y grado 3; y los diferentes subtipos histológicos entre sí. Dado que el perfil molecular de los carcinomas endometrioides de grado 3 difería del de los endometrioides grado 1 y grado 2, al igual que el perfil de los carcinomas de grado 3 del de los carcinomas de grado 1 y 2, calculamos también los p-valores resultantes de confrontar los diferentes grupos (tabla 61).

Tabla 61: p valores obtenidos al comparar las frecuencias de aparición de las diferentes alteraciones analizadas según la clasificación clínico-patológica (tipo 1 o endometrioides y tipo 2 o no endometrioides) e histológica según grados (grado 1, 2 y 3) y subtipos (endometrioides grado 3, serosos, células claras, mixtos y carcinosarcomas). G1: carcinoma grado 1. G2: carcinoma grado 2. G3: carcinoma grado 3. E1: carcinoma endometrioide grado 1; E2: carcinoma endometrioide grado 2; E3: carcinoma endometrioide grado 3.

Alteraciones Grupos	<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>hMLH1</i>	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	NE HDAC1	NE HDAC2	NE HDAC3
Tipo1 vs Tipo 2	0.005	0.002	0.543	0.058	0.154	0.076	0.395	0.070	0.543	0.452	0.055	0.746	0.579	0.281	0.908	0.578
G1 vs G2 vs G3	0.222	0.009	0.408	0.125	0.197	0.232	0.181	0.732	0.408	0.673	0.576	0.335	0.954	0.629	0.702	0.908
Subtipos	0.047	0.025	0.130	0.025	0.023	0.281	0.666	0.420	0.938	<0.001	0.428	0.744	0.881	0.465	0.662	0.169
E1 vs E2 vs E3	0.662	0.510	0.030	0.539	0.162	0.128	0.252	0.069	0.592	0.592	0.465	0.252	0.972	0.252	0.662	0.474
E1+E2 vs E3	0.364	0.263	0.008	0.303	0.367	0.207	0.189	0.028	0.701	0.701	0.271	0.189	0.811	0.189	0.708	0.248
G1+G2 vs G3	0.083	0.002	0.180	0.042	0.544	0.810	0.132	0.977	0.450	0.678	0.381	0.290	0.759	0.893	0.897	0.833

Obtuvimos significación en la frecuencia de aparición de las alteraciones estudiadas en varias de las comparaciones. Por una parte, el gen *PTEN* mostró diferencias significativas al comparar los carcinomas endometrioides con los no endometrioides (p=0.005) así como los diferentes subtipos histológicos (p=0.047). En el caso del gen *TP53*, las diferencias resultaron significativas en todas las comparaciones excepto las realizadas entre los carcinomas endometrioides. Ambos genes aparecen claramente asociados a determinados tipos histológicos con grandes diferencias en la frecuencia de mutaciones

entre unos y otros. Es por ello que las fue común observar diferencias significativas en la mayoría de los casos. *CDKN2A* tan sólo presentó una mutación en un carcinoma endometriode grado 3 y al comparar dicho grupo con los endometrioides grado 1 y grado 2, juntos o separados, se hallaron diferencias significativas como era de esperar. Por otra parte *PPP2R1A* mutado con relativa frecuencia en los carcinomas serosos principalmente mostró diferencias significativas cuando se compararon los diferentes subtipos histológicos. *ARID1A* se asocia principalmente en nuestro trabajo a los carcinomas endometrioides pero sin mostrar grandes diferencias con respecto a los no endometrioides. Sin embargo, no apareció mutado en ninguno de los carcinomas serosos y sí en el de células claras y en los mixtos lo que causa la significación observada al comparar los diferentes subtipos histológicos. Por otra parte, el gen *KRAS* ha mostrado diferencias en la frecuencia de mutabilidad entre los carcinomas endometrioides reflejando una tendencia a mostrarse más frecuentemente mutado con el aumento de grado. Por último, *hMLH1* tan sólo apareció mutado en un carcinoma endometriode de grado 1 y en un carcinoma tipo seroso y la significación en los resultados obtenidos al comparar los distintos subgrupos histológicos era esperada por este motivo.

Finalmente, realizamos un análisis multivariante utilizando el programa MULTBiplot para observar cómo cada una de las alteraciones estudiadas se asocia a los diferentes grados y subtipos tumorales (figuras 106 y 107). En el caso de la clasificación clínico-patológica, no pudimos realizar el estudio ya que necesitábamos tener más de dos variables para el análisis y en nuestro caso sólo contábamos con dos grupos: tipo 1 y tipo 2.

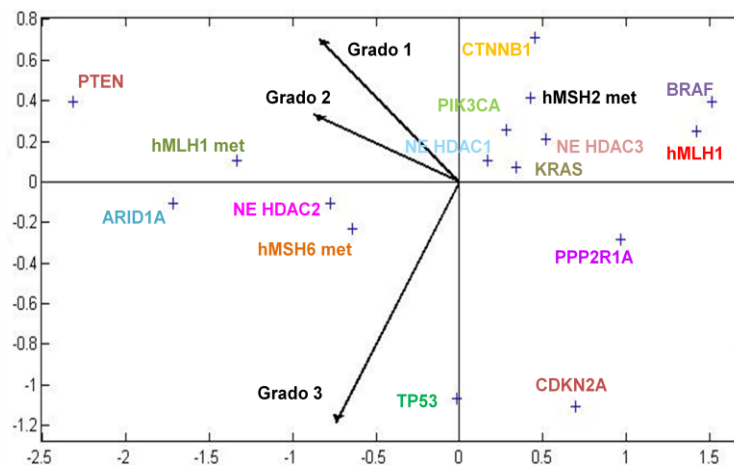


Figura 106: Biplot obtenido al comparar los diferentes grados histológicos.

Resultados

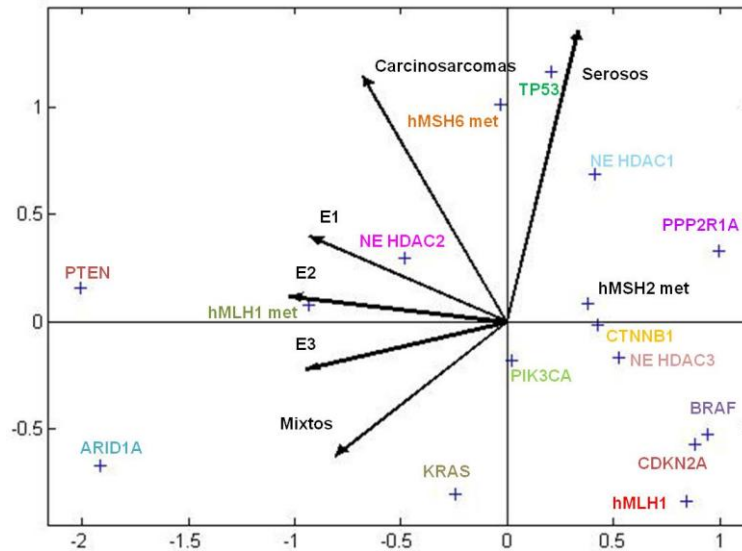


Figura 107: Biplot obtenido al comparar los diferentes subtipos histológicos.

Los análisis multivariantes mediante el programa MULTBiplot se suelen utilizar como métodos de *screening* inicial para discriminar el estudio de aquellas variables/alteraciones no relacionadas con nuestros subgrupos.

Nosotros lo realizamos a modo de representación gráfica para corroborar los resultados obtenidos mediante tablas de contingencia. Eliminamos aquellas variables que no se encontraban representadas en ninguno de los subgrupos: mutaciones en *CDH1*, *EGFR*, *hMSH2* y *hMSH6*. El grupo de carcinomas de endometrio de células claras fue eliminado por el propio programa ya que detectó un bajo número de tumores que lo conformaban (en realidad sólo contamos con un caso).

En la clasificación por grados histológicos, el Biplot nos señala una posible relación entre los tumores grado 2 y mutaciones en *PTEN*, metilación del gen *hMLH1* y la ausencia de expresión de HDAC2 mientras que los grado 3 parecen verse asociados con mutaciones en *TP53*. En el caso de los grado 1 no parece haber asociación con ninguna de las alteraciones en particular. Destacar que existe una tendencia a agrupar los tumores de grado 1 y grado 2 mientras que ambos grupos se muestran apartados de los grado 3, lo cual tiene lógica teniendo en cuenta que los carcinomas de bajo grado y alto grado manifiestan diferencias evidentes en sus características moleculares

El Biplot obtenido de la comparación entre subtipos nos proporciona una información más segmentada de tal forma que asocia los carcinomas endometrioides grado 1 y los carcinosarcomas con la ausencia de expresión de HDAC2, los endometrioides grado 2 con mutaciones en el gen *PTEN* y metilación en el promotor de *hMLH1* y los endometrioides grado 3 con mutaciones en *ARID1A*. Además, los serosos parecen mostrar una fuerte asociación con mutaciones en *TP53* y en menor grado con la metilación de *hMSH6* y ausencia de expresión de HDAC1. Los mixtos no aparecen asociados con ninguna de las

Resultados

alteraciones aunque sería conveniente aumentar el tamaño de la muestra para poder obtener resultados concluyentes.

DISCUSIÓN



El carcinoma de endometrio es el tumor ginecológico más frecuente en los países industrializados con una tasa de incidencia del 5.8%. Aunque un 95% de los casos es de origen esporádico, el 2-5% restante es de tipo hereditario³; en este caso, lo más frecuente es que se asocie a otras enfermedades hereditarias como el Síndrome de Lynch, en cuyo caso aparecen alteraciones en los genes implicados en la maquinaria de reparación de emparejamientos erróneos (MMR)⁵⁵⁻⁶⁰, o el Síndrome de Cowden, asociado a mutaciones en el gen *PTEN*⁶³⁻⁶⁵.

En el caso de los carcinomas de endometrio esporádicos, la exposición hormonal parece constituir el principal factor de riesgo, aunque también desempeñan un papel importante otros factores asociados con variaciones fisiológicas como el sobrepeso, la nuliparidad, la menarquía temprana o la menopausia tardía, y con enfermedades como la diabetes mellitus, la hipertensión, el síndrome del ovario poliquístico y tumores en la mama y el ovario^{67,68}.

Existen diferentes criterios para clasificar a los carcinomas de endometrio esporádicos. En 1983, Bokhman postuló un modelo dual que clasificaba a los carcinomas de endometrio en dos grandes grupos según sus características clínico-patológicas: endometrioides o tipo 1 y no endometrioides o tipo 2⁷. Posteriormente, se ha observado que ambos grupos poseen unas características moleculares diferentes. Vogelstein, en 1988, propuso un modelo de progresión tumoral para el cáncer colorrectal que fue adoptado para intentar explicar el desarrollo del carcinoma de endometrio⁵³. Sugiere que la transformación del tejido de endometrio sano a carcinoma de endometrio se produce debido a la acumulación de mutaciones, de tal forma que los carcinomas de endometrio tipo 1 o endometrioides, se asocian a MSI³⁸ y a la aparición progresiva de mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*³⁴, *KRAS*³⁵, *CTNNB1*³⁶, *FGFR2*³⁷ y en los genes MMR; y los tipo 2 o no endometrioides, a mutaciones en los genes *TP53*⁴²⁻⁴⁴, *CDKN2A*⁴⁵ y *CDH1*^{46,47}, pérdidas de expresión de receptores hormonales y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en diferentes cromosomas⁵⁰.

Sin embargo, en la actualidad se busca refinar esta categorización y se han propuesto dos clasificaciones diferentes dependiendo de las características histológicas de los tumores. Por una parte, atendiendo al grado de diferenciación celular, los carcinomas endometrioides se dividen en carcinomas endometrioides grado 1, grado 2 y los grado 3, siendo estos últimos parte de un gran grupo denominado “alto grado o grado 3” en el que se incluirían, además, todos los carcinomas no endometrioides^{14,17,18}. Por otra parte, se ha establecido una clasificación según los subtipos histológicos en la cual cada uno de ellos presentaría unas características determinadas no equiparables a las del resto de grupos.

En nuestro trabajo hemos analizado 14 genes involucrados en el desarrollo del carcinoma de endometrio esporádico, de los cuales 6 eran supresores tumorales (*PTEN*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1*, *PPP2R1A* y *ARID1A*), 5 oncogenes (*PIK3CA*, *CTNNB1A*, *KRAS*,

BRAF y *EGFR*) y 3 genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (*hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*). Además, hemos estudiado las posibles pérdidas de heterocigosidad (LOH) en aquellos casos en los que aparecieron mutaciones en homocigosis no acompañadas por otros cambios en heterocigosis y los grandes reordenamientos que pudieran ser la causa de las pérdidas de expresión de los genes reparadores. La inestabilidad de microsatélites (MSI) fue analizada en los 28 casos de los que dispusimos DNA procedente del tumor y de la sangre periférica, y estudiamos la epigenética del tumor analizando patrones de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, así como la metilación de los promotores de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*. Por último, la longitud telomérica es un evento no esclarecido en los procesos tumorales debido a la división de opiniones existente acerca de si se encuentra asociada al tipo de tumor o al pronóstico. Nosotros también la estudiamos y analizamos dos polimorfismos asociados a una menor actividad de la telomerasa y, por tanto, a telómeros más cortos: *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A*.

La puesta en conjunto de los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos debería permitir comprobar si los criterios utilizados hasta el momento para catalogar los carcinomas de endometrio esporádico son adecuados o si, por el contrario, se requiere una clasificación más exhaustiva y detallada.

1. ESTUDIO DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

El carcinoma de endometrio esporádico se encuentra asociado a un elevado número de alteraciones tanto en el genoma como en el epigenoma. Al representar un 95% de los carcinomas de endometrio, el estudio de sus características moleculares resulta de elevado interés a fin de realizar un adecuado diagnóstico y encontrar terapias dirigidas que puedan combatirlo.

En la actualidad, muchos trabajos buscan nuevos genes implicados en el desarrollo de los carcinomas de endometrio. Recientes estudios, realizados mediante nuevas técnicas de secuenciación exómica, han detectado dos nuevos genes candidatos en el carcinoma de endometrio esporádico: *PPP2R1A* y *ARID1A*.

En nuestro trabajo hemos considerado oportuno el análisis en profundidad de ambos genes.

1.1 EL GEN *PPP2R1A*

El gen *PPP2R1A* (*protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha*) codifica la isoforma α de la subunidad A del complejo PP2A^{208,209}, un heterodímero compuesto por tres subunidades, de las cuales la C es la que desarrolla la función catalítica, la B la función reguladora y la A mantiene la estructura, controlando el ensamblaje y la estabilidad del complejo²¹³.

El gen *PPP2R1A* se compone de 15 exones que codifican 15 motivos HEATs dando lugar a una hélice en forma de garfio que proporciona un aspecto helicoidal al complejo²¹⁵. Los motivos H11 a H15 forman puentes de hidrógeno con la subunidad C de PP2A mientras que los comprendidos entre el H2 y el H7 interaccionan con la subunidad B^{209,216,217}. De ellos, adquieren una elevada importancia los HEATs 5 y 7 ya que es donde se localizan todas las mutaciones patogénicas descritas hasta el momento en el cáncer de ovario^{210,413}. Estos dos motivos, junto con el H6, son codificados por los exones 5 y 6 del gen y, por ello, actualmente son las únicas regiones analizadas en el gen *PPP2R1A* a la hora de la búsqueda de posibles mutaciones.

El gen *PPP2R1A* se estudió inicialmente en cáncer de ovario, observándose que el subtipo seroso era el que presentaba un mayor porcentaje de mutaciones, todas ellas localizadas exclusivamente en los exones 5 y 6. Debido a la similitud clínico-patológica existente entre los carcinomas serosos de endometrio y ovario, al igual que ocurre con los endometrioides de endometrio y ovario, el gen *PPP2R1A* fue estudiado en carcinoma de endometrio y concretamente, en el de tipo seroso⁵¹.

El porcentaje de mutaciones descrito hasta el momento en el gen *PPP2R1A* es de un 5-7% en el carcinoma endometrioide de bajo grado y un 10% en el de alto grado. Sin embargo, cuando se estudia en carcinomas serosos este porcentaje aumenta a un 40-45%^{51,54,210}.

En nuestro trabajo analizamos todas los exones y las regiones intrónicas adyacentes del gen *PPP2R1A* en 31 carcinomas de endometrio de alto grado. En los tumores de grado 1 y 2 sólo analizamos los exones 5 y 6 y las regiones intrónicas adyacentes.

Hemos detectado tres mutaciones patogénicas ya descritas^{51,211}: p.S256T (caso 29), p.R183Q (caso 37) y p.P179R (casos 48, 49 59 y 70). El estudio del gen en sangre periférica de las pacientes 29, 37, 49 y 70 no mostró las mutaciones observadas en el tumor confirmando su naturaleza somática. Las mutaciones p.R183Q y p.P179R correspondían a cambios de nucleótido en el exón 5 que codifica para el HEAT5 mientras que la mutación p.S256T se sitúa en el HEAT7, codificado por el exón 6. Destacar que las muestras 37 y 48 correspondían a carcinomas endometrioides de grado 2 y 1 respectivamente.

Se ha descrito que la distribución de las mutaciones en el cáncer de ovario presenta un patrón diferente al observado en el carcinoma de endometrio^{51,211,413}; mientras que en el cáncer de ovario alrededor de un 70% de las mutaciones en el gen *PPP2R1A* se localizan en los codones 182 y 183, en el 77% de los casos de carcinoma de endometrio están mutados los codones 179, 256 y 257. No obstante, en los carcinomas endometrioides se ha detectado una mayor frecuencia de mutaciones en los codones 182/183 que en los 256/257. El motivo de esta diferente distribución no es claro, aunque parece que pudiera estar relacionada con los mecanismos de mutagénesis o con efectos funcionales específicos de tejido⁴¹³. En nuestro trabajo, los cuatro carcinomas tipo seroso que presentaron mutaciones patogénicas en el gen *PPP2R1A*, mostraron alterados los codones 179 o 256 coincidiendo con lo descrito por otros autores. Sin embargo, la única mutación encontrada en el codón 183 pertenecía a un carcinoma endometriode de grado 2 (caso 37), aunque también observamos un cambio en el codón 256 en un carcinoma endometriode de grado 1 (caso 48).

Describimos por primera vez dos mutaciones localizadas en los exones 2 (p.R48Q) y 5 (p.K194N) del gen *PPP2R1A* en un carcinoma endometriode de grado 3 y en un carcinoma endometriode de grado 2 respectivamente. Se trata de mutaciones somáticas al no encontrarse en la sangre periférica de las pacientes que las portaban (casos 52 y 45). Los estudios *in silico* sugieren que el cambio encontrado en el codón 48 es una mutación patogénica. Su alta conservación en la evolución y el hecho de localizarse en el HEAT 4, punto de interacción entre las subunidades A y B del complejo, son dos evidencias de su posible patogénicidad. El análisis de la mutación p.K194N con los programas de predicción mostró que, a pesar de localizarse en el dominio H5 y mutar un aminoácido altamente conservado en la evolución, su carácter no es patogénico. Por tanto, sólo consideramos como patogénico al cambio p.R48Q aparte de los ya mencionados anteriormente, aunque son necesarios más estudios para descartar la patogénicidad de la mutación p.K194N (figura 108).

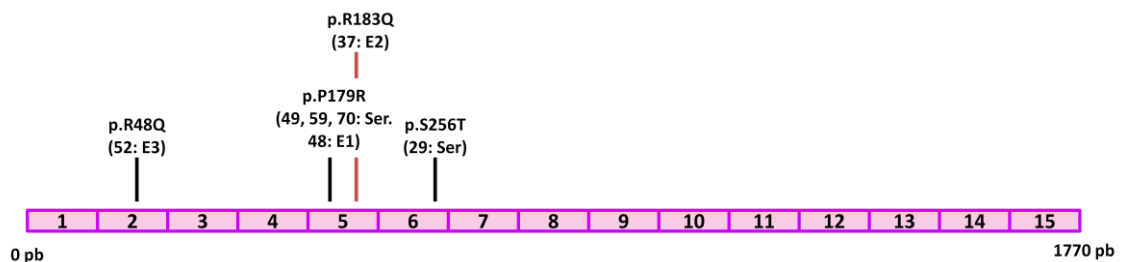


Figura 108: Mutaciones patogénicas observadas en el gen *PPP2R1A* en el estudio de los 86 carcinomas de endometrio. Se señala el número y tipo de tumor que la porta. E1: carcinoma endometriode grado 1; E2: carcinoma endometriode grado 2; E3: carcinoma endometriode grado 3; Ser: carcinoma de endometrio tipo seroso.

Por otra parte, en nuestro estudio identificamos por primera vez un grupo de mutaciones en la región 5'-UTR: c.-52A>G (7 casos), c.-73T>C (6 casos), c.-52insC (11 casos), c.-44G>C (1 caso), c.-53C>T (1 caso), c.-52insCCC (1 caso) y c.-53insC (3 casos).

La región c.-53 a c.-60 es una zona rica en Citosinas. El encontrar frecuentes inserciones de dicho nucleótido sugiere que se trata de una zona susceptible al resbalamiento de la DNA polimerasa en el proceso de replicación del DNA (figura 109). Además de estas alteraciones, en nuestro trabajo observamos también dos mutaciones contenidas en dicha región: c.-52A>G y c.-53C>T.

```

AACGCGAGCTTAGCCCTGGGTAGCGCGGCCAATGGCCGTGGAGCAGCCCCTGTAAACTGGCTCGGGCGCCCCAC
-164
GCCCGCCCTTCCTTCTCTCCCAGCATTGCCCCCCCCACGTTTCAGCACAGCGCTGGCCGCAGTCTGACAGGAAAG
-89
GGACGGAGCCAAGATG
-13
    
```

Figura 109: Secuencia de la región 5'-UTR analizada en nuestro trabajo en el gen *PPP2R1A* donde se observa, en verde, el codón de inicio de la transcripción; en morado, los nucleótidos en los cuales se detectaron mutaciones tipo sustitución; en rojo, la región rica en citosinas comprendida entre los nucleótidos -53 y -60; y en azul la secuencia del oligonucleótido sentido (5'-3') utilizado para la amplificación de la región analizada.

La Timina -73 no se localiza en ninguna región repetitiva pero en nuestro trabajo observamos hasta 6 tumores en los que es sustituida por una Citosina (casos 9, 20, 38, 39, 59 y 72). En todos ellos aparecía también el cambio c-52A>G sugiriendo la existencia de un desequilibrio de ligamiento parcial, ya que no todos los tumores con la mutación en la posición -52 presentaban el cambio en la posición -73. Además, observamos que la alteración c.-73T>C daba lugar a una secuencia adecuada (uggaggagaaggaaggugaug) para la unión del miRNA hsa-miR-765 con un score de 75 según la base de datos miRBASE. Este resultado no fue validado por el programa microRNA.

Por otra parte, el estudio de la región 5'-UTR con el programa TFSEARCH mostró la existencia de secuencias de unión para factores de transcripción que se veían alteradas cuando se producían estas mutaciones. En ocasiones la mutación producía la aparición o desaparición de estas secuencias o incluso la disminución de la afinidad de unión del factor de transcripción. Los factores de transcripción afectados por estos cambios son: MZF1, SP1, RUNX1/AML-1A e IKAROS. Estas moléculas interaccionan con multitud de genes implicados en procesos celulares, destacando la remodelación de la cromatina. Por tanto, aunque las mutaciones observadas en la región 5'-UTR no produzcan efectos directos sobre la proteína PPP2R1A y puedan ser consideradas polimorfismos a falta de la realización de estudios funcionales, pueden alterar la unión de factores de transcripción fundamentales con la consecuente desregulación del proceso de transcripción.

El análisis por Western blot no mostró variación en los niveles de la proteína PPP2R1A independientemente de las mutaciones presentes en el tumor. Sin embargo, por primera vez en nuestro trabajo, detectamos en algunos tumores una proteína de aproximadamente 110 kDa,

frente a los 65 kDa esperados. Al ampliar el estudio, se encontraron tumores que mostraban proteínas de ambos tamaños. Este fenómeno no está descrito y no hemos encontrado asociación con ningún cambio en la secuencia genómica. Hasta el momento, los estudios de este gen se han centrado en el análisis de los exones 5 y 6 del gen *PPP2R1A* pero no en el estudio de la expresión de la proteína. Se ha descrito que la actividad de la proteína *PPP2R1A* es regulada mediante su localización celular y modificaciones postraduccionales. Una explicación plausible para el patrón de expresión observado en nuestro trabajo podría ser la existencia de modificaciones postraduccionales que estuvieran produciendo una alteración en el patrón de migración de la proteína, siendo necesarios más estudios para confirmar nuestra hipótesis.

Nuestro estudio mostró mutaciones patogénicas en el gen *PPP2R1A* en 7 de los 86 carcinomas de endometrio (8.14%) de los cuales 4 eran carcinomas tipo seroso y 3 carcinomas endometrioides. Esto supone que el 50% de los carcinomas serosos y el 4.76% de los tumores endometrioides (E1: 3.23%, E2: 4.17% y E3: 12.50%) estudiados en nuestro trabajo mostraron mutaciones en el gen *PPP2R1A*, resultados similares a los descritos por otros grupos^{51,54,210}.

Algunos autores han estudiado la posible asociación entre la aparición de mutaciones en el gen *TP53*, por aparecer también frecuentemente mutado en los carcinomas no endometrioides, y mutaciones en *PPP2R1A* sin encontrar relación^{211,413}. Nosotros hemos encontrado que los tumores portadores de mutaciones en *PPP2R1A* presentan principalmente mutaciones en los genes *TP53* y *PTEN*. La relación entre mutaciones en *PPP2R1A* y *TP53* no depende del tipo de tumor ya que aparece en dos tumores serosos y dos endometrioides (uno de ellos de grado 3). Sin embargo, las mutaciones en *PPP2R1A* y *PTEN* se asocian a los carcinomas endometrioides (tabla 62).

Tabla 62: Relación de alteraciones genéticas en los tumores de endometrio con mutaciones en el gen *PPP2R1A*. E1: carcinoma endometriode grado 1; E2: carcinoma endometriode grado 2; E3: carcinoma endometriode grado 3. Ser.: carcinoma de endometrio tipo seroso.

Casos	Tipo de tumor	<i>PPP2R1A</i>	OTROS GENES ALTERADOS				
			<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i>
29	Ser	p.S256T	---	p.R248Q	---	---	---
37	E2	p.R183Q	p.R130G	---	---	---	---
48	E1	p.P179R	p.R335X	p.G266R	p.Q1614fsX20	---	---
49	Ser.	p.P179R	---	---	---	---	p.S37F
52	E3	p.R48Q	p.R130Q p.R142W p.R173Y	p.R175C	p.G1549D	p.T1025A p.K1024N	---
59	Ser.	p.P179R	---	---	---	---	---
70	Ser.	p.P179R	---	p.R175H p.G266R	---	---	---

Por tanto, nuestro trabajo confirma que un elevado porcentaje de los carcinomas de endometrio de tipo seroso presentan mutaciones patogénicas en el gen *PPP2R1A*. También muestran que los carcinomas endometrioides pueden contener mutaciones patogénicas en el gen *PPP2R1A* en codones diferentes a los habituales 179, 256 y 257. Es el caso de la mutación patogénica p.R48Q, descrita por primera vez en nuestro trabajo

y localizada en el exón 2 del gen *PPP2R1A* de un carcinoma endometriode. Además, hemos descrito por primera vez mutaciones situadas en la región 5'-UTR, consideradas en nuestro trabajo como polimorfismos que pueden alterar sitios de unión de factores de transcripción. Por otra parte, nuestros resultados señalan que la expresión de la proteína no se ve afectada por las mutaciones encontradas. Sin embargo, cabe destacar que hemos detectado la expresión de una proteína de 110 kDa no descrita anteriormente. Finalmente, mencionar que las mutaciones en el gen *PPP2R1A* suelen acompañarse de mutaciones en el gen *PTEN* en los carcinomas endometrioides, mientras que no se relacionan con mutaciones en los genes *TP53*, *KRAS* y *PIK3CA*.

1.2 EL GEN *ARID1A*

El gen *ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A*) codifica la proteína nuclear BAF250a que forma parte del complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP: SWI/SNF. La principal función de este complejo es movilizar nucleosomas y actuar como regulador de la expresión y la dinámica de la cromatina⁴¹⁴. Debido a estas funciones, el complejo SWI/SNF puede considerarse como un factor de regulación epigenético, ya que juega un importante papel en el control de la expresión génica, en la inhibición del crecimiento celular, en la diferenciación celular y por tanto en el desarrollo tisular y supresión tumoral^{329,330}.

BAF250a es una proteína de gran tamaño que consta de al menos dos dominios conservados e imprescindibles para llevar a cabo su función. Gracias a su dominio de unión al DNA, el complejo SWI/SNF se une a secuencias en el DNA ricas en los nucleótidos AT. Por otra parte, el extremo carboxi-terminal activa la señal transcripcional dependiente de receptor de glucocorticoides⁴¹⁵. Además, existen zonas ricas en Glutaminas que constituyen una señal de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES).

ARID1A consta de 20 exones codificantes. Este gen aparece mutado en gran variedad de cánceres humanos, pero principalmente en los carcinomas de células claras y endometrioides del ovario y en los carcinomas endometrioides uterinos. En otras enfermedades se observa una pérdida de expresión debido a procesos de metilación de su promotor o a pérdidas del número de copias^{341,342}.

En nuestro estudio hemos analizado todas las regiones exónicas e intrónicas adyacentes del gen *ARID1A* en 86 carcinomas de endometrio detectando un total de 41 mutaciones patogénicas repartidas por todo el gen, aunque hemos observado una tendencia a presentar un mayor número de mutaciones en los exones de mayor tamaño. Tan sólo una mutación se detectó en dos tumores diferentes: c.5547_5549delG, p.D1850fsX32 (casos 5 y 84). Se trata de una delección de una Guanina que había sido observada por otros autores previamente en carcinoma de colon y carcinoma gástrico³³². Nosotros la describimos por

primera vez en dos carcinosarcomas de endometrio. La mutación se localiza en una región rica en Guaninas en la que ya se habían descrito otras mutaciones tipo inserción (c.5548dupG) en cáncer de colon, páncreas y próstata³³². Al igual que esta mutación, hemos encontrado 12 mutaciones más tipo inserción/delección en secuencias repetitivas de nucleótidos. Este evento sucede con frecuencia en el gen *ARID1A* y se ha asociado a posibles defectos en el sistema MMR³³².

También hemos encontrado dos mutaciones *inframe* patogénicas, una ya descrita por otros autores (p.Q1334_R1335dupQ)^{327,333} y otra descrita por primera vez en este trabajo (g.5346_5377del). La duplicación de una Glutamina en el primer caso (tumor 26), se produce en una zona poli-Q susceptible a ser alterada mediante inserciones y deleciones de dichos residuos. Su análisis ha mostrado que no afecta a la estabilidad de la proteína significativamente, pero sí a su afinidad por el promotor del gen *CDKN1A*. Además, esta región rica en Glutaminas podría ser importante para la interacción de BAF250a con otras subunidades del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, por lo que mutaciones en estos aminoácidos podrían alterar la estabilidad de todo el complejo³²⁷. En el segundo caso, la mutación g.5346_5377del (caso 86) da lugar a la pérdida de 30 nucleótidos y a un procesamiento aberrante del RNA que provoca la transcripción de los intrones 18 y 19 generando un codón de parada prematuro que excluye el exón 20. Por tanto, esta mutación afecta al dominio NLS, localizado en el exón 18, y da lugar a una pérdida del dominio NES y de 3 de los 4 motivos LXXLL que son característicos de los coactivadores de receptores nucleares; una alteración en una de estas zonas podría hacer que el coactivador no se uniera a su receptor nuclear y no se produjese la activación⁴¹⁶ (figura110).

Por otra parte, tan sólo dos de los cambios se localizaron en el dominio de unión al DNA que comprende desde los residuos 1017 al 1180 (p.E1019fsX12 y p.N1081fsX11). En la región poli-S también se detectó una mutación patogénica tipo *missense* descrita por primera vez en nuestro trabajo: p.S1000Y (figura 110).

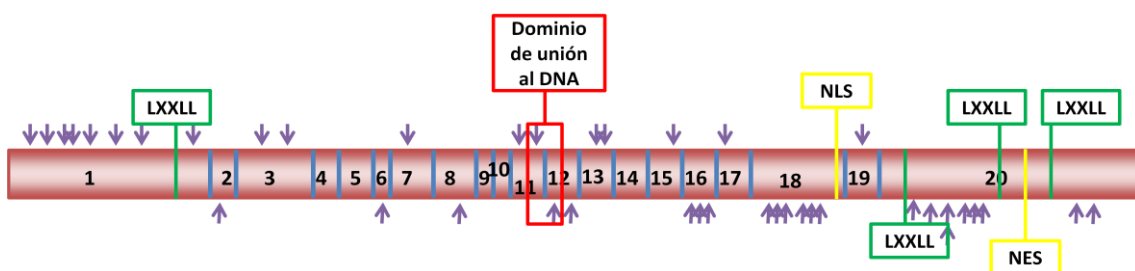


Figura 110: Distribución de las mutaciones patogénicas observadas en el gen *ARID1A* y localización de los principales dominios funcionales. NLS: señal de localización nuclear. NES: señal de exportación nuclear.

Aparte de los dominios y motivos mencionados y de las señales NLS y NES, no se conoce la función del resto de los residuos que componen la proteína pero se piensa que toda la región codificante es imprescindible para su función.

La pérdida de expresión de BAF250a ha sido descrita en un 39% de los carcinomas endometrioides grado 3 frente al 29% de los de grado 1 y 2. Estos porcentajes disminuyen en los carcinomas de endometrio tipo seroso (18%) y los de células claras (26%). A diferencia de otros tumores, en el carcinoma de endometrio la pérdida de expresión de la proteína parece correlacionarse con las mutaciones encontradas^{39,340}.

En nuestro trabajo, un 43.02% de los tumores presentaron mutaciones patogénicas sin mostrar diferencias significativas entre los carcinomas endometrioides (47.62%) y los no endometrioides (30.43%) ($p=0.154$). Cuando comparamos los distintos grados histológicos tampoco observamos diferencias significativas, aunque el grupo de los carcinomas de grado 2 mostraba un mayor porcentaje de tumores con mutaciones en *ARID1A* (G1: 35.48%, G2: 58.33% y G3: 38.71). Sin embargo, cuando comparamos los diferentes subtipos histológicos obtuvimos diferencias significativas ya que todos los carcinomas mixtos y los tumores de células claras mostraron mutaciones en el gen *ARID1A* mientras que ninguno de los carcinomas tipo seroso mostró mutaciones patogénicas en *ARID1A*. Los resultados obtenidos por otros autores, que han analizado un número de carcinomas de endometrio tipo seroso inferior al nuestro, reflejan una incidencia de mutaciones en el gen *ARID1A* de entre el 0 y el 11%^{39,54}.

Cuando comparamos los carcinomas endometrioides de grado 1, 2 y 3, observamos como el número de tumores mutados en el gen *ARID1A* aumenta con el grado (E1: 35.48%, E2: 58.33%, E3: 62.50%). No obstante, aunque este aumento no es estadísticamente significativo, sugiere que a medida que aumenta el grado de los tumores endometrioides, el gen *ARID1A* presenta más mutaciones.

En nuestro trabajo, las mutaciones en el gen *ARID1A* aparecen asociadas, la mayoría de las veces, a mutaciones en los genes implicados en la ruta PI3K-AKT-mTOR. Independientemente del grado del tumor, coexisten con alteraciones en *PTEN* en un 72.97% y con alteraciones en *PIK3CA* en un 18.92%. En un 24.32% de los casos aparecen solas o acompañadas de mutaciones en otros genes: con *TP53* en 6 tumores (16.21%), con *KRAS* en 8 tumores (21.62%) y con *CTNNB1* en 5 tumores (13.51%). Teniendo en cuenta que *ARID1A* aparece frecuentemente mutado en los carcinomas endometrioides de grado 1 y que se ha descrito alterado desde etapas tempranas de la tumorigénesis, no es de extrañar que la coexistencia con mutaciones en el gen *PIK3CA* sea inferior y la coexistencia con mutaciones en el gen *PTEN*, superior. Al tener en cuenta sólo el grupo de los carcinomas endometrioides, de los 30 tumores que presentaban *ARID1A* mutado, 23 (76.67%) presentaban mutaciones en *PTEN* y 6 (20%) en *PIK3CA*. Esta coexistencia ha sido descrita recientemente por Liang et al.⁴¹⁷. En su trabajo realizaron un análisis en 222 tumores de endometrio de los genes implicados en la ruta PI3K-AKT-mTOR y el gen *ARID1A* observando una fuerte coexistencia entre mutaciones en el gen *ARID1A* y mutaciones en los genes *PTEN* o *PIK3CA*. Además, estudiaron 47 tumores que presentaban mutaciones en el gen *ARID1A* y mostraban los genes *PTEN* y

PIK3CA germinales, detectando una desregulación en los niveles proteicos y de fosforilación de los componentes implicados en la vía PI3K-AKT-mTOR y confirmando que la interacción de BAF250a y la ruta PI3K-AKT-mTOR es directa y no es necesaria la coexistencia de mutaciones de *ARID1A* y *PTEN/PIK3CA* para su desregulación⁴¹⁷.

Por otra parte, la elevada frecuencia de mutaciones en regiones repetitivas del gen *ARID1A* sugiere una posible asociación con alteraciones en los genes implicados en el mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) (tabla 63).

Tabla 63: Relación de alteraciones observadas en el sistema MMR y la MSI en los tumores de endometrio con mutaciones en el gen *ARID1A*. Se destacan en azul los tumores que presentaron mutaciones en regiones repetitivas del gen. E1: carcinoma endometriode grado 1; E2: carcinoma endometriode grado 2; E3: carcinoma endometriode grado 3. Ser.: carcinoma de endometrio tipo seroso; Mix.: carcinoma de endometrio mixto; C.C.: carcinoma de endometrio de células claras; CR: carcinosarcoma; ND: no determinado; Ampl: amplificado.

Casos	Tipo de tumor	<i>hMLH1</i>				<i>hMSH2</i>				<i>hMSH6</i>				MSI
		Exp.	Mut.	MLPA	Met.	Exp.	Mut	MLPA	Met.	Exp.	Mut.	MLPA	Met.	
2	E2	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
3	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
5 (2)	CR	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	+	ND
6	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	+	ND
14	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	Ampl.	-	ND	ND	ND	-	ND
17	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	MSS
21	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
22	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
23 (2)	MIX.	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
26	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
30	CC	ND	IVS3+5GA	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
31	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	ND
35	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	ND
36	E3	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
39 (2)	CR	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
40	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
41	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	+	MSS
44	E2	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-H
45	E2	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	+	SÍ	ND	ND	+	MSI-L
48	E1	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
52	E3	SÍ	ND	ND	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-L
55	E2	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-H
58	CR	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
60	E2	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
61	E2	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	+	ND
66	MIX.	NO	NO	NO	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
67	E3	SÍ	ND	ND	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
68	E1	SÍ	ND	ND	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-L
69	E2	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	+	MSI-L
75	E2	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	+	ND
76	E1	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	NO	NO	NO	-	ND
78	E2	NO	NO	NO	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	ND
79 (2)	E1	SÍ	ND	ND	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-H
80	E3	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSI-H
82	E3	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	+	ND
84	CR	NO	NO	NO	+	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	+	ND
86	E2	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	SÍ	ND	ND	-	MSS

El estudio de la inestabilidad de microsatélites en 15 de los 37 pacientes con mutaciones en *ARID1A* mostró que 12 tumores (80%) presentaron inestabilidad de microsatélites: 8 MSI-H y 4 MSI-L, lo que sugiere que las mutaciones en el gen *ARID1A* se relacionan con la inestabilidad de microsatélites. De los 13 casos que mostraron mutaciones en el gen *ARID1A* tipo inserción deleción en secuencias repetitivas, pudimos analizar la MSI en 5 de

ellos y todos presentaron inestabilidad de microsatélites (100%): 4 MSI-H y 1 MSI-L. A falta de un mayor número de muestras para corroborar estos resultados, podríamos confirmar que las mutaciones en secuencias repetitivas el gen *ARID1A* pueden ser consecuencia de alteraciones en el sistema MMR.

El análisis de los genes reparadores en los tumores portadores de mutaciones en el gen *ARID1A* mostró que 16 (43.34%) de los tumores con mutación en el gen *ARID1A* presentaron metilación en el promotor del gen *hMLH1*, 12 (32.43%) en el gen *hMSH6* y 4 (10.81%) en *hMSH2*. 16 tumores (43.24%) no mostraron metilación en ninguno de los genes MMR pero el caso 14 mostró una amplificación completa del gen *hMSH2* y el caso 30 una mutación patogénica en el gen *hMLH1*. Estos valores son algo superiores a los observados en el carcinoma de endometrio en general y en los subtipos histológicos estudiados. De los 13 casos portadores de mutaciones en secuencias repetitivas, tres mostraron ausencia de metilación en los tres genes MMR (casos 23, 39 y 76); de ellos, el tumor 23 mostraba inestabilidad de microsatélites pero no se encontró ninguna alteración relacionada con el mecanismo MMR. Lo más frecuente fue que los tumores presentasen uno o dos de los genes metilados (*hMLH1* y *hMSH6*). Dos de los casos mostraron los tres genes metilados. *hMLH1* fue el gen que apareció metilado en un mayor número de tumores portadores de este tipo de mutaciones (10 casos), seguido de *hMSH6* (6 casos), mientras que *hMSH2* nunca apareció metilado en solitario. Sin embargo, de los 13 tumores tan sólo 3 (casos 2, 5 y 79) mostraron mutaciones tipo inserción/delección en regiones repetitivas de otros genes y 2 de ellos (casos 46 y 79) el patrón de triple banda observado en las secuencias de los exones 7 y 8 en el gen *PTEN*.

Por tanto, en los 86 carcinomas de endometrio analizados en nuestro trabajo, hemos observado 41 mutaciones patogénicas en el gen *ARID1A* de las cuales 32 han sido descritas por primera vez en nuestro estudio. No hemos detectado puntos calientes y hemos observado que la mayoría de las mutaciones son tipo *nosense* y *frameshift*. Estos resultados confirman que el gen *ARID1A* presenta una elevada incidencia de mutaciones en el carcinoma de endometrio, observando una leve asociación con los carcinomas endometrioides y ausencia de relación con los carcinomas tipo seroso. Además, hemos detectado una relación entre las mutaciones patogénicas observadas en el gen *ARID1A*, la inestabilidad de microsatélites y alteraciones en el sistema MMR, principalmente en aquellos tumores en los que aparecen mutaciones tipo inserción/delección en secuencias repetitivas del gen.

2. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

La clasificación clínico-patológica se basa en el modelo dualístico propuesto por Bokhman en 1983 por el cual los carcinomas de endometrio esporádico se dividen en dos grandes grupos: los estrógenos-dependientes, carcinomas endometrioides o de tipo 1, y los no estrógeno-dependientes, carcinomas no endometrioides o de tipo 2⁷.

Los adenocarcinomas endometrioides representan el 70-80% de los tumores de endometrio; la mayoría de ellos son de bajo grado y su pronóstico suele ser favorable ya que se detectan en estadíos tempranos debido a que normalmente son precedidos por hiperplasias complejas atípicas que permiten una detección precoz. Aparecen en edades pre- y post-menopáusicas y su tratamiento es sencillo ya que la intervención quirúrgica suele ser suficiente para su curación⁸⁻¹¹. El 20-30% de los tumores restantes pertenecen al grupo de los carcinomas no endometrioides y son considerados carcinomas de alto grado y peor pronóstico debido a su agresividad y a su detección en estadíos más avanzados. Se desarrollan en etapas post-menopáusicas y ocasionalmente aparecen precedidos de lesiones precancerosas tipo pólipos endometriales o atrofia endometrial^{11,12}.

Además de presentar características clínico-patológicas diferentes, se ha observado que ambos grupos muestran un perfil molecular diferente. Los carcinomas endometrioides aparecen frecuentemente asociados a mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*³⁴, *ARID1A* (*BAF250A*)³⁹, *KRAS*³⁵, *CTNNB1*³⁶, *FGFR2*³⁷ y a genes implicados en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos. Por ello, también es común la inestabilidad de microsatélites (MSI)³⁸. En los tumores tipo 2 o no endometrioides es frecuente encontrar mutaciones en los genes *TP53*⁴²⁻⁴⁴, *PPP2R1A*⁵¹, *CDKN2A*⁴⁵, *CDH1*^{46,47}, pérdidas de expresión de *HER2/ERBB2*⁴⁸ y *EGFR/ERBB1*⁴⁹ y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en diferentes cromosomas⁵⁰.

Diferentes estudios han analizado la incidencia de las alteraciones moleculares presentes en los carcinomas de endometrio tipo 1 y 2. En nuestro trabajo, el análisis de 86 carcinomas de endometrio esporádico (43 endometrioides y 23 no endometrioides) y 28 muestras de sangre periférica (22 de pacientes con carcinoma endometrioide y 6 de pacientes con carcinoma no endometrioide), nos ha permitido determinar la incidencia de alteraciones en ambos tipos de tumor (tabla 64).

Tabla 64: Porcentaje de incidencia de las alteraciones estudiadas en nuestro trabajo según los estudios publicados hasta el momento (Descrito) y según lo observado en nuestros resultados (En este trabajo). Se destaca en rojo los porcentajes observados en nuestro trabajo que difieren de los descritos por otros autores.

Alteración	Tipo	Tipo 1 o endometriode		Tipo 2 o no endometriode	
		Descrito	En este trabajo	Descrito	En este trabajo
MUTACIONES	<i>PTEN</i>	37-61%	60%	5-13%	26%
	<i>TP53</i>	10-25%	13%	50-90%	43%
	<i>CDKN2A</i>	0-2%	2%	2-6%	0%
	<i>CDH1</i>	0%	0%	0%	0%
	<i>PPP2R1A</i>	5-10%	5%	20-40%	17%
	<i>ARID1A</i>	30-40%	48%	15-30%	30%
	<i>PIK3CA</i>	35%	21%	30-35%	9%
	<i>CTNNB1</i>	20-45%	17%	0-5%	9%
	<i>KRAS</i>	15-30%	21%	0-5%	4%
	<i>BRAF</i>	1-4%	2%	1-4%	0%
	<i>EGFR</i>	0%	0%	0%	0%
	<i>hMLH1</i>	0-4%	2%	---	4%
<i>hMSH2</i>	0-4%	0%	---	0%	
<i>hMSH6</i>	0-1%	0%	---	0%	
MSI		20-40%	68%	0-5%	67%
METILACIÓN	<i>hMLH1</i>	45%	44%	---	22%
	<i>hMSH2</i>	---	16%	---	13%
	<i>hMSH6</i>	---	19%	---	35%
AUSENCIA DE EXPRESIÓN	<i>HDAC1</i>	---	16%	---	26%
	<i>HDAC2</i>	---	32%	---	30%
	<i>HDAC3</i>	---	13%	---	17%

En nuestro trabajo, el gen *PTEN* se encontró mutado en un porcentaje de tumores no endometrioides superior al descrito hasta el momento^{34,41,80,81,83-87}. El gen *TP53* mostró en los carcinomas no endometrioides un porcentaje de tumores mutados menor al descrito^{42,43,184-186}. En ambos casos, al comparar el grupo de los carcinomas endometrioides con los carcinomas no endometrioides, las diferencias fueron estadísticamente significativas (tabla 61), lo que significa que existe una clara asociación entre mutaciones en los genes *PTEN* y *TP53* y los carcinomas endometrioides y no endometrioides, respectivamente.

Por otra parte, en nuestro trabajo, los genes *BRAF* y *CDKN2A* no aparecieron mutados en los carcinomas no endometrioides, a diferencia de otras series^{108,113-115,202,203,206}. En el caso del gen *BRAF*, esta discrepancia puede deberse a las características de la población estudiada ya que, aunque no ha sido corroborado, parecen existir diferencias en la incidencia de mutaciones según la etnia de la población analizada. En un estudio realizado en mujeres japonesas se han llegado a observar mutaciones en el gen *BRAF* en un 23% de los tumores endometrioides y en un 11% de los no endometrioides analizados¹²⁰, porcentajes mucho más elevados que los descritos por otros autores^{108,113-115} y los observados en nuestro trabajo. Con respecto al gen *CDKN2A*, el número de mutaciones observadas por otros autores en el carcinoma de endometrio no es elevado^{202,203,206} y se han descrito otros procesos frecuentemente asociados a la pérdida de expresión de p16 tales como deleciones homocigotas del gen e hipermetilación del

promotor²⁰²⁻²⁰⁴. De hecho las mutaciones en el gen *CDKN2A* no se incluyen en muchos “paneles” de genes propuestos para la caracterización de los carcinomas endometrioides y no endometrioides⁵⁴.

El gen *EGFR* no se observó mutado en ninguno de los carcinomas de endometrio analizados en nuestro trabajo. Este dato confirma lo observado hasta ahora por otros autores que no han detectado mutaciones patogénicas en el gen *EGFR* a pesar de existir una elevada sobreexpresión de la proteína EGFR, principalmente en los carcinomas no endometrioides (46%)⁴⁹ y cuestiona la utilidad de tratamientos que incluyen inhibidores de EGFR.

El porcentaje de tumores endometrioides y no endometrioides que presentaban mutado el gen *PIK3CA* fue menor al descrito hasta el momento. Una causa plausible podría ser que la técnica de CSGE-Heterodúplex no detecte todas las mutaciones presentes en los exones analizados. La mayoría de los estudios realizados en la actualidad utilizan técnicas de secuenciación masiva que permiten detectar todo tipo de mutaciones contenidas en los genes involucrados en el desarrollo tumoral. Pero además, recientes estudios han detectado una elevada frecuencia de mutaciones en los exones 1 al 7 del gen *PIK3CA*⁸⁴, con lo cual no se descarta la presencia de mutaciones en otros exones no incluidos en nuestro estudio.

El gen *CTNNB1* apareció mutado en nuestro estudio en un porcentaje de tumores endometrioides menor al descrito. Su causa puede residir en la existencia de mutaciones redundantes en el gen *KRAS*. Estudios recientes han observado que en los carcinomas endometrioides las alteraciones en los genes *CTNNB1*, *KRAS* y *SOX17* son redundantes y constituyen tres mecanismos independientes de activación de la ruta WNT⁴¹⁸⁻⁴²¹ y mutaciones en cualquier de los tres genes la sobreactivarían.

Nuestro estudio muestra un elevado número de tumores de endometrio con MSI (67-68%). Los porcentajes obtenidos son muy superiores a los descritos en otros trabajos, especialmente en los tumores no endometrioides^{38,260,261}. Se aproximan a la frecuencia observada en el carcinoma de endometrio asociado a Síndrome de Lynch (75%)²⁵⁹ con la diferencia de que en el Síndrome de Lynch el marcador más inestable es BAT26⁴²² y en nuestro trabajo fue D17S250. Existen posibles factores que pueden explicar estas diferencias. Por una parte, la mayoría de los trabajos utilizan paneles de marcadores diferentes a los propuestos por Bethesda²⁵⁷ y el número de marcadores analizados es menor al nuestro²⁶². Por otra parte, hay que tener en cuenta que nuestro trabajo cuenta con un número de muestras reducido, especialmente en el caso de los tumores no endometrioides.

La observación de un número muy reducido de mutaciones en el gen *hMLH1* (44%) y nulo en los genes *hMSH2* y *hMSH6* es similar a lo descrito en otros trabajos^{262,269,423}. Mientras que en el carcinoma de endometrio asociado al Síndrome de Lynch es frecuente

la aparición de mutaciones en los genes *hMSH6* (73%), *hMSH2* (29%) y *hMLH1* (31%) como causa principal de la MSI²⁵⁰, en el carcinoma de endometrio esporádico, y especialmente en los carcinomas endometrioides, se asocia principalmente a la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*^{262,264,269} como evento secundario a otras alteraciones. Nuestros resultados mostraron la metilación del promotor del gen *hMLH1* en un porcentaje de tumores endometrioides similar al descrito²⁶²⁻²⁶⁶ a diferencia de los genes *hMSH2* y *hMSH6*, en los cuales se observó metilación en un porcentaje de tumores muy inferior (tabla 64); sin embargo, no hemos encontrado una correlación entre la MSI y la metilación de los promotores de los genes MMR.

En nuestro trabajo abordamos por primera vez el estudio de grandes reordenamientos en los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* en carcinoma de endometrio esporádico observando esta alteración en 4 carcinomas de endometrio (4.65%): 2 en carcinomas endometrioides (3.63%) y 2 en carcinomas no endometrioides (6.45%). Estos datos se ajustan a los descritos en el Síndrome de Lynch donde la incidencia de los grandes reordenamientos se sitúa entre el 1% y el 20%⁴²⁴⁻⁴²⁶, dependiendo de las poblaciones estudiadas, del método de análisis utilizado y de heterogeneidad de los criterios de selección de individuos. En nuestro trabajo dos de las alteraciones se localizaron en el gen *hMLH1* y las otras dos en el gen *hMSH2* pero otros autores han descrito que *hMSH2* es el gen MMR que presenta este tipo de aberraciones con una mayor frecuencia⁴²⁷ debido a que contiene una mayor densidad de secuencias *Alu*⁴²⁵.

La ausencia de expresión de las proteínas MMR no se relacionó con mutaciones ni grandes reordenamientos en los genes que las codifican. Tampoco guardó relación con la MSI observada. Estos resultados se muestran acordes con los obtenidos en otros estudios y sugieren la necesidad de estudiar otros genes implicados en la reparación del DNA.

Por otro lado, hemos estudiado la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en los diferentes tipos de tumor de endometrio esporádico.

Algunos autores han descrito una relación directa entre la exposición hormonal y el aumento de expresión de las proteínas HDAC1 y HDAC2^{314,315}. El tratamiento con hormonas esteroideas induce la sobreexpresión de ambas proteínas en las células del estroma del endometrio sano. Concretamente, la expresión de HDAC1 aumenta con el tratamiento con progesterona y la expresión de HDAC2 con el tratamiento con estrógenos y progesterona. Teniendo en cuenta que los carcinomas endometrioides se asocian a la estimulación previa de ambas hormonas, tendría sentido la sobreexpresión de ambas proteínas en este grupo de tumores. Sin embargo nosotros observamos lo contrario. En los carcinomas no endometrioides estudiados en nuestro trabajo, la proteína HDAC1 también pierde la expresión en un porcentaje de tumores similar al observado en la proteína HDAC2 (tabla 64). Esto podría estar relacionado con la mayor agresividad y peor pronóstico que presentan los carcinomas no endometrioides ya que la ausencia de

expresión de la proteína HDAC1 ha sido asociada a un peor pronóstico y una menor supervivencia de las pacientes³¹¹⁻³¹³.

Por tanto, según nuestros resultados, los carcinomas endometrioides se encuentran asociados a mutaciones en los genes *PTEN* y *ARID1A*, a inestabilidad de microsatélites, metilación del gen *hMLH1* y ausencia de expresión de la proteína HDAC2 mientras que, los carcinomas no endometrioides se relacionan con mutaciones en el gen *TP53*, inestabilidad de microsatélites y metilación en el gen *hMSH6* (figura 111).

Para diferenciar los carcinomas endometrioides de los no endometrioides proponemos el análisis de mutaciones principalmente en los genes *PTEN* y *TP53*, pero también en los genes *PPP2R1A*, *KRAS* y *PIK3CA*, así como el estudio de la metilación del gen *hMLH1* como evento epigenético a tener en cuenta.

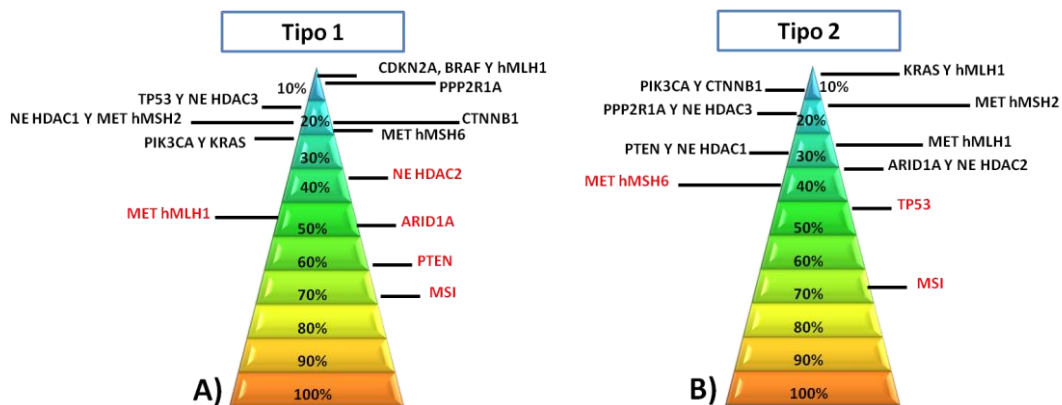


Figura 111: Representación gráfica de la frecuencia de aparición de alteraciones en los diferentes factores estudiados en nuestro trabajo según la clasificación clínico-patológica. A) tipo 1 o endometrioides y B) tipo 2 o no endometrioides. NE: no expresión. MET: metilación.

3. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN POR GRADOS HISTOLÓGICOS

La clasificación de los carcinomas de endometrio según las características clínico-patológicas ha sido aceptada durante muchos años como único criterio de categorización. Sin embargo, los estudios moleculares plantean la necesidad de buscar otros criterios que permitan establecer clasificaciones más concretas y definidas.

La teoría elaborada por Vogelstein, y perfilada posteriormente por otros autores, sugiere que la génesis de los carcinomas de endometrio se debería a una acumulación de mutaciones génicas y alteraciones epigenéticas^{44,53}. La progresión desde una hiperplasia a adenocarcinoma endometriode grado 1 no presentaría invasión epitelial y se asociaría fundamentalmente con mutaciones en el gen *PTEN*, así como inestabilidad de

microsatélites y mutaciones en el gen *KRAS*. La progresión a grado 2 implicaría mutaciones en los genes *CTNNB1* y *KRAS*. El desarrollo hacia carcinoma endometriode grado 3 se asociaría con la aparición de mutaciones en *TP53* e invasión intraepitelial.

Posteriormente, algunos autores mostraron que los carcinomas endometrioides de grado 3 presentan características moleculares y clínicas similares a las de los carcinomas de endometrio tipo seroso⁴²⁸⁻⁴³⁰. Por ello, los carcinomas endometrioides de grado 3 comenzaron a ser incluidos en el grupo de los carcinomas de alto grado formado principalmente por los carcinomas de endometrio tipo seroso y los carcinomas de células claras.

En nuestro trabajo hemos estudiado las características genéticas y epigenéticas de los carcinomas de endometrio clasificados según su grado histológico. Siguiendo los criterios y recomendaciones de la FIGO y la OMS¹⁸, los carcinomas se han dividido en tres grupos:

- Grado 1: cuando el 5% o menos de las células poseen un crecimiento sólido no escamoso ni morular (carcinomas endometrioides de grado 1).
- Grado 2: cuando entre el 6% y el 50% de las células presentan un crecimiento sólido no escamoso ni morular (carcinomas endometrioides de grado 2).
- Grado 3: cuando más del 50% de las células tienen un crecimiento sólido no escamosos ni morular (carcinomas endometrioides grado 3, carcinomas tipo seroso, carcinomas de células claras, carcinomas mixtos y carcinosarcomas).

Hemos analizado 31 tumores de grado 1, 24 tumores de grado 2 y 31 tumores de grado 3. Las muestras procedentes de sangre periférica incluidas en nuestro estudio correspondieron a 10 pacientes con carcinoma de grado 1, 10 pacientes con carcinoma de grado 2 y 8 pacientes con carcinoma de grado 3.

La clasificación según grados histológicos subdivide a los carcinomas endometrioides o tipo 1 distinguiendo los carcinomas endometrioides de grado 1 y los carcinomas endometrioides de grado 2 como grupos individuales (carcinomas de endometrio grado 1 y 2 respectivamente), e incluyendo a los carcinomas endometrioides de grado 3 en el grupo anteriormente nombrado como "carcinomas no endometrioides o tipo 2".

En nuestra serie, hemos comparados las clasificaciones según las características clínico-patológicas y los grados histológicos en función de las alteraciones moleculares (tabla 65).

Tabla 65: Porcentaje de incidencia de las alteraciones estudiadas en nuestro trabajo dividiendo los tumores según características clínico-patológicas y según el grado histológico.

Alteración	Criterio	Clínico-patológico		Histológico		
		Endometrioides o tipo 1	No endometrioides o tipo 2	Grado 1	Grado 2	Grado 3
MUTACIONES	<i>PTEN</i>	60%	26%	58%	58%	39%
	<i>TP53</i>	13%	43%	10%	13%	39%
	<i>CDKN2A</i>	2%	0%	0%	0%	3%
	<i>CDH1</i>	0%	0%	0%	0%	0%
	<i>PPP2R1A</i>	5%	17%	3%	4%	16%
	<i>ARID1A</i>	48%	30%	35%	59%	39%
	<i>PIK3CA</i>	21%	9%	26%	8%	16%
	<i>CTNNB1</i>	17%	9%	26%	13%	6%
	<i>KRAS</i>	21%	4%	13%	21%	16%
	<i>BRAF</i>	2%	0%	3%	0%	0%
	<i>EGFR</i>	0%	0%	0%	0%	0%
	<i>hMLH1</i>	2%	4%	3%	0%	3%
	<i>hMSH2</i>	0%	0%	0%	0%	0%
<i>hMSH6</i>	0%	0%	0%	0%	0%	
MSI		68%	67%	70%	60%	75%
METILACIÓN	<i>hMLH1</i>	44%	22%	35%	50%	32%
	<i>hMSH2</i>	16%	13%	16%	21%	10%
	<i>hMSH6</i>	19%	35%	29%	26%	32%
AUSENCIA EXPRESIÓN	<i>HDAC1</i>	16%	26%	23%	13%	19%
	<i>HDAC2</i>	32%	30%	35%	25%	32%
	<i>HDAC3</i>	13%	17%	16%	13%	13%

Observamos una gran similitud con los obtenidos al dividir los tumores según características clínico-patológicas.

Por una parte, la clasificación según los grados histológicos mostró que los carcinomas de grado 1 y de grado 2 poseen unas características moleculares similares. Tan sólo encontramos diferencias en la incidencia de mutaciones en el gen *ARID1A*, *PIK3CA* y *CTNNB1* y en la metilación en el gen *hMLH1*, características que compartían con los carcinomas tipo 1 o endometrioides.

Por otra parte, el grupo de los carcinomas de grado 3 mostró rasgos moleculares diferentes a los carcinomas de grado 1 y grado 2 pero similares a los observados en los carcinomas tipo 2 o no endometrioides. Estos resultados fueron confirmados en un análisis multivariante con el programa MULTBiplot en el cual se observó una gran proximidad en los ejes que representaban a los carcinomas de grado 1 y 2 y un alejamiento del eje de los carcinomas de endometrio de grado 3 (figura 106).

Al igual que ocurría al comparar los carcinomas tipo 1 o endometrioides con los carcinomas tipo 2 o no endometrioides, los carcinomas de bajo grado (G1+G2) mostraron diferencias con respecto a los carcinomas de alto grado (G3) en el porcentaje de tumores mutados en los genes *PTEN*, *PPP2R1A* y *TP53*. El subtipo histológico de los carcinomas endometrioides de grado 3 presenta características moleculares intermedias de tal forma que es común que muestren alteraciones genéticas y epigenéticas frecuentes tanto en los carcinomas de tipo 1 o endometrioides como en los carcinomas tipo 2 o no endometrioides

(figura 112). Al subdividir los tumores según el grado histológico, los carcinomas endometrioides de grado 3, antes incluidos en los carcinomas tipo 1 o endometrioides según criterios clínico-patológicos, fueron incorporados al grupo de los carcinomas de endometrio de grado 3 el cual mostró algunas diferencias con el grupo de los carcinomas tipo 2 o no endometrioides dentro de la alta similitud molecular que presentaban (tabla 65)

Por tanto, nuestros resultados muestran que la clasificación de los carcinomas de endometrio según el grado histológico presenta una elevada similitud con la clasificación clínico-patológica, no aportando mejoras en la clasificación molecular de los tumores de endometrio.

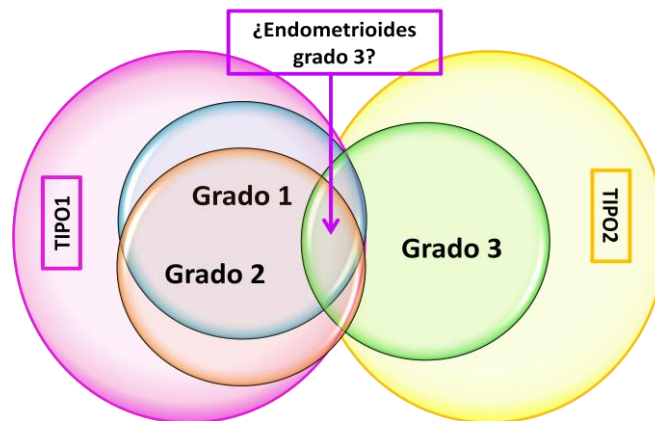


Figura 112: Representación de la relación existente entre los carcinomas de endometrio de grado 1, 2 y 3 según las características moleculares estudiadas en nuestro trabajo. En el área de intersección de los tres grupos se localizarían los carcinomas endometrioides de grado 3 al mostrar características comunes a los tres grados. Los carcinomas de grado 1 y 2 muestran características prácticamente idénticas a los carcinomas tipo 1 o endometrioides mientras que los carcinomas de grado 3 podrían considerarse el mismo grupo que los carcinomas tipo 2 o no endometrioides.

Dicha clasificación no ha sido utilizada en ningún estudio molecular ya que se ha evolucionado directamente desde la clasificación clínico-patológica a la clasificación según subtipos histológicos. Algunos autores como McConechy et al.⁵⁴ han propuesto que los adenocarcinomas endometrioides grado 3 sean considerados un grupo aparte ya que, aunque muestran características similares a los endometrioides grado 1 y grado 2, difieren en algunos aspectos y presentan una mayor incidencia de mutaciones en *TP53*.

En nuestro estudio comprobamos como las clasificaciones anteriormente expuestas no resultan prácticas a la hora de establecer perfiles moleculares que puedan ser útiles para futuros avances clínicos y terapéuticos. Los criterios clínico-patológicos catalogan los carcinomas de endometrio en dos grupos con características moleculares muy diversas entre ellos y entre los tumores incluidos en ellos. La clasificación según los grados histológicos podría parecer correcta en un principio por el hecho de incluir a los carcinomas endometrioides de grado 3 en el grupo de los tumores de grado 3. Sin embargo, los carcinomas (endometrioides) de grado 1 y 2 muestran características similares y podrían ser agrupados para su caracterización mientras que los carcinomas

endometrioides de grado 3 deberían ser considerados un grupo aparte. Por otro lado, el resto de subtipos incluidos en el grupo de los carcinomas de grado 3, posee unas características determinadas que en el caso de los carcinomas mixtos y carcinosarcomas, dependen de los componentes epiteliales que los conforman.

Por ello, consideramos más adecuada la clasificación de los carcinomas de endometrio según los subtipos histológicos.

4. PERFILES MOLECULARES ASOCIADOS A LA CLASIFICACIÓN POR SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

4.1 ADENOCARCINOMAS ENDOMETRIOIDES DE BAJO GRADO

En nuestro trabajo, estudiamos 55 adenocarcinomas endometrioides de bajo grado: 31 de grado 1 y 24 de grado 2. Ambos tipos presentaron una elevada frecuencia de mutaciones en el gen *PTEN* mientras que el gen *PIK3CA* se mostró mutado con más frecuencia en los carcinomas endometrioides de grado 1 (tabla 46). La coexistencia de mutaciones en ambos genes en un 12.73% de los casos confirma lo observado por otros autores^{34,41,80,81,83-87} y ha sido atribuida a la participación del gen *PTEN* en otras rutas de señalización celular encargadas, por ejemplo, del mantenimiento de la integridad genómica⁸⁸.

Los tumores 45 y 79 presentaron dos alteraciones que mostraban un patrón de triple pico en las secuencias de los exones 7 y 8 respectivamente. Mediante las técnicas utilizadas en nuestro estudio no fue posible esclarecer el tipo de alteración presente en ninguno de los dos casos pero podría tratarse de traslocaciones cromosómicas ya que en el carcinoma de endometrio este tipo de eventos son frecuentes y afectan principalmente a genes envueltos en las rutas de señalización PI3K-AKT-mTOR, WNT, EGFR-RAS-MAPK, retinoblastoma y apoptosis (a través de alteraciones en la familia de las BCL)⁴¹⁸. Sería conveniente estudiar estas muestras mediante otro tipo de técnicas que permiten detectar dichas aberraciones, por ejemplo la técnica de FISH, ya que, de existir una traslocación, podrían verse afectados otros genes localizados en el cromosoma 10. Al analizar el resto de alteraciones presentes en estos dos tumores se observó una alta inestabilidad genética y epigenética (tabla 66).

Tabla 66: Alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en los tumores endometrioides de bajo grado 45 y 79. Exp.: expresión; Met: metilación; MSI: inestabilidad de microsatélites; E1: carcinoma endometriode de grado 1; E2: carcinoma endometriode de grado 2.

Casos	Tipo de tumor	ALTERACIONES PRESENTADAS								MSI
		Mutación en <i>PTEN</i>	Mutación en <i>TP53</i>	Mutación en <i>ARID1A</i>	Mutación en <i>KRAS</i>	Exp. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	
45	E2	Traslocación?	---	p.Q546fsX72 p.R1528X	p.G12D	NO	+	+	+	MSI-L
79	E1	Traslocación?	p.C135Y	p.P1175fsX4 p.E1864fsX35	---	Sí	+	-	-	MSI-H

La MSI también fue un evento frecuente en los carcinomas endometrioides de bajo grado (tabla 67). En nuestro estudio pudimos analizar la MSI en 10 pacientes con carcinoma endometriode de grado 1 y en 10 pacientes con carcinoma endometriode de grado 2. De las 20 muestras analizadas, 13 casos (65%) mostraron MSI, valor superior al observado por otros autores en los carcinomas endometrioides esporádicos (20-40%)^{38,260,261} pero similar al descrito en el carcinoma de endometrio asociado a Síndrome de Lynch²⁵⁹. Como ya hemos comentado anteriormente, estas diferencias pueden ser debidas a la diferencia en número y tipo de marcadores analizados en otros trabajos o al reducido número de muestras estudiadas en nuestro trabajo.

Al igual que lo observado en otros estudios, las mutaciones y grandes reordenamientos no explicaron la frecuente inestabilidad de microsatélites presente en los carcinomas endometrioides de bajo grado. Sin embargo, fue frecuente la metilación del promotor del gen *hMLH1* (35% de los casos) independientemente de la presencia o no de inestabilidad de microsatélites. La metilación del gen *hMLH1* ha sido descrita por otros grupos en un porcentaje de carcinomas endometrioides similar al observado por nosotros (45%)²⁶²⁻²⁶⁶. Aparece en etapas tempranas del desarrollo tumoral ya que se ha observado en las hiperplasias atípicas (33%) y endometriales (3%)²⁶³. En nuestro estudio, el porcentaje de tumores endometrioides que mostraron metilado el gen *hMLH1* aumentó con el grado del tumor, siendo ya frecuente su aparición en los carcinomas endometrioides de grado 1 (35% de los casos). Sin embargo, la metilación del gen *hMLH1* es propuesta como evento secundario por lo que hacen falta otras alteraciones que, sumadas a la metilación, den lugar a una inactivación de la proteína^{81,262,263,265,266}.

De los 13 casos con inestabilidad de microsatélites, 7 casos (53.85%) presentaron metilado el promotor de *hMLH1* y en 6 de ellos la inestabilidad fue elevada. Sin embargo, algunos tumores en los que existía MSS y expresión de las proteínas MMR, también presentaron metilados los promotores de los genes MMR (tabla 67).

Tabla 67: Muestras de adenocarcinomas endometrioides de bajo grado que mostraron alteraciones en alguno de los factores asociados al mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos. Las inmunohistoquímicas se empezaron a llevar a cabo a partir de la muestra 42 incluida. Se estudió la metilación de los promotores de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* en todos los tumores. Se realizó MLPA y análisis mutacional de los genes *hMLH1* y *hMSH2* en todos los casos del 1 al 41 y a partir del 42 sólo en aquellos en los que la inmunohistoquímica era negativa. El estudio del gen *hMSH6* se realizó solo en la muestra 76. Exp.: expresión; Mut.: mutación; Met.: metilado; ND: no determinada; Ampl.: amplificación; E1: carcinoma endometrioide de grado 1; E2: carcinoma endometrioide de grado 2.

Casos	Tipo de tumor	hMLH1				hMSH2				hMSH6				MSI
		Exp.	Mut.	MLPA	Met.	Exp.	Mut.	MLPA	Met.	Exp.	Mut.	MLPA	Met.	
2	E2	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
3	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
4	E2	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	++	ND	ND	ND	-	ND
6	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	++	ND	ND	ND	++	ND
7	E1	ND	NO	NO	++	ND	NO	NO	++	ND	ND	ND	++	ND
8	E1	ND	Sí	Ampl.	++	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	ND
12	E1	ND	NO	NO	++	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	-	ND
13	E2	ND	NO	NO	++	ND	NO	NO	++	ND	ND	ND	++	ND
14	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	Ampl.	-	ND	ND	ND	-	ND
17	E2	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	MSS
21	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
31	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	ND
34	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	-	ND
35	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	+	ND
37	E2	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
40	E1	ND	NO	NO	-	ND	NO	NO	-	ND	ND	ND	-	MSI-H
41	E1	ND	NO	NO	+	ND	NO	NO	+	ND	ND	ND	+	MSS
42	E1	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	+	MSS
43	E1	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-L
44	E2	NO	NO	NO	++	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-H
45	E2	NO	NO	NO	-	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	+	MSI-L
50	E1	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-L
54	E2	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	MSI-H
55	E2	NO	NO	NO	++	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-H
57	E2	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	++	Sí	ND	ND	-	ND
61	E2	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	ND
64	E1	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	ND
68	E1	Sí	ND	ND	++	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-L
69	E2	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	MSI-L
71	E1	NO	NO	NO	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	ND
73	E1	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	ND
75	E2	NO	NO	NO	+	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	+	ND
76	E1	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	NO	NO	NO	-	ND
77	E1	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	ND
78	E2	NO	NO	NO	-	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	ND
79	E1	Sí	ND	ND	+	Sí	ND	ND	-	Sí	ND	ND	-	MSI-H

Nuestros resultados muestran que la metilación de los genes MMR no se correlaciona con la aparición de MSI o la ausencia de expresión de las proteínas hMLH1, hMSH2 y hMSH6, sugiriendo que actúa como *second hit* siendo necesaria la aparición de otras alteraciones en el sistema MMR para dar lugar a dichas alteraciones.

Por otro lado, nuestro estudio refleja un hecho no descrito por otros autores pero ya observado anteriormente en nuestro laboratorio³⁷⁴: en los carcinomas endometrioides, las mutaciones en el gen *PTEN* coinciden frecuentemente con la metilación en los genes MMR. De los 55 carcinomas endometrioides de bajo grado analizados en nuestro trabajo, 32 tumores mostraron mutado el gen *PTEN*. De esos 32 tumores, en 19 (59.38%) apareció al menos uno de los genes reparadores metilado y 17 de esos 19 tumores mostraron el gen *hMLH1* metilado. Teniendo en cuenta que la metilación de los promotores de los

genes MMR, y especialmente la del gen *hMLH1*, es un evento temprano en el proceso de la tumorigenesis²⁶³, su funcionamiento defectuoso no permite corregir los errores producidos durante la replicación, lo que afectaría a los genes implicados en el desarrollo del tumor y, según lo observado en nuestro estudio, especialmente al gen *PTEN*. Sin embargo, las mutaciones detectadas en el gen *PTEN* cuando existe metilación de los genes MMR no son de tipo inserción/delección ni se localizan en zonas repetitivas de su secuencia (tabla 17, anexo 6), lo que sugiere que la metilación en los genes MMR no afecta directamente a la aparición de mutaciones en el gen *PTEN* sino que contribuye a la alteración de genes importantes implicados en otros sistemas de corrección de errores. Por ejemplo, se han descrito mutaciones localizadas en secuencias repetitivas en el gen *BRCA1* cuando existe MSI y alteraciones en el sistema MMR. Se ha observado que dichas mutaciones, consecuencia de defectos en el mecanismo MMR, pueden afectar al correcto funcionamiento de la proteína BRCA1, y por tanto, a la reparación de errores en otros genes implicados en el desarrollo tumoral⁴³¹.

Por otra parte, se ha descrito la frecuente aparición de mutaciones en el gen *KRAS* en etapas tempranas del proceso de desarrollo tumoral, observándose alterado en hiperplasias endometriales atípicas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. En otros estudios se ha detectado mutado en aproximadamente un 14% de los carcinomas de endometrio esporádico existiendo una distribución diferencial según subtipos¹⁰⁴. En nuestro caso, el 14% de los carcinomas endometrioides de bajo grado mostró mutaciones en el gen *KRAS*. Todas ellas fueron tipo *missense* siendo la más frecuente c.G35A (p.G12D). Además, el porcentaje de tumores con mutaciones en *KRAS* fue menor en el grupo de tumores endometrioides grado 1 que en el de grado 2 (tabla 46), lo que apoya las teorías que afirman que la progresión de los tumores endometrioides hacia un mayor grado se acompaña de mutaciones en el gen *KRAS* entre otras⁴⁴.

De los 9 de carcinomas endometrioides de bajo grado que mostraron el gen *KRAS* mutado pudimos estudiar la MSI en 5 (casos 15, 45, 54, 65 y 68) y analizamos también la presencia de mutaciones en otros genes relacionados con el desarrollo del carcinoma de endometrio esporádico (tabla 68).

Tabla 68: Relación de alteraciones genéticas en los tumores endometrioides de bajo grado con mutaciones en el gen *KRAS*. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; E1: carcinoma endometriode grado 1; E2: carcinoma endometriode grado 2.

Casos	Tipo de tumor	<i>KRAS</i>	<i>PTEN</i>	MSI	OTROS FACTORES							
					<i>ARID1A</i>	<i>CTNNB1</i>	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
15	E2	p.G12V	---	MSS	---		-	-	-	Sí	Sí	Sí
28	E2	p.G12V	---	ND	---		-	-	-	Sí	Sí	Sí
34	E1	p.G12D	---	ND	---	p.G34R	+	+	-	No	No	No
35	E1	p.G13D	p.R233X (H)	ND	p.Q758fsX75	---	+	-	+	Sí	Sí	Sí
45	E2	p.G12D	Traslocación?	MSI-L	p.Q546fsX72 p.R1528X	---	-	+	+	Sí	Sí	Sí
54	E2	p.G12D	p.N323fsX1	MSI-H	---	---	+	-	+	Sí	No	Sí
60	E2	p.G12D	p.R130G/ p.R130L	ND	p.R1446X	---	-	-	-	Sí	No	Sí
65	E1	p.G12V	IVS6+1G>A	MSS	---	---	-	-	-	Sí	No	Sí
68	E1	p.G13D	---	MSI-L	p.T1438fsX6	p.S37F p.G34R	+	-	-	Sí	Sí	Sí

Nuestros resultados muestran que en los carcinomas endometrioides de bajo grado las mutaciones en el gen *KRAS* no siempre se acompañan de mutaciones en el gen *PTEN* y de MSI, pudiéndose tratar de un evento más temprano en el proceso del desarrollo tumoral y desencadenante del tumor. Esto apoya algunos estudios recientes en los que se ha descrito que tan sólo el 50% de los tumores con mutaciones en el gen *KRAS* muestran el gen *PTEN* mutado, un 14%, MSI-H y otro 14%, MSS⁴³². Sin embargo, refutan la teoría mantenida por otros autores que defienden que las mutaciones en el gen *KRAS* aparecen en etapas tempranas de la tumorigénesis pero nunca son el evento desencadenante del proceso. Aquellos casos en los que hay coexistencia de mutaciones en los genes *PTEN* y *KRAS*¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ podrían ser tratados con terapias combinadas que actuaran sobre las dos rutas afectadas. No detectamos ningún tumor con mutaciones concomitantes en los genes *KRAS* y *BRAF*, lo cual ha sido descrito por otros autores que sostienen la teoría de que mutaciones en ambos genes son excluyentes⁴³³.

Por otra parte, detectamos que las mutaciones en el gen *KRAS* aparecen acompañadas con frecuencia de alteraciones epigenéticas como la metilación de los genes MMR y/o la ausencia de expresión de alguna de las histonas desacetilasas, especialmente de la proteína HDAC2. Por tanto, según lo observado en nuestro estudio, las mutaciones en el gen *KRAS* podrían producirse en etapas tempranas de la tumorigénesis asociadas a alteraciones epigenéticas que colaborarían en el proceso de desarrollo tumoral.

A fin de completar el análisis de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK, sería interesante el estudio de otros factores implicados en la desregulación de la misma cuyas alteraciones han sido asociadas a los carcinomas endometrioides, como por ejemplo las proteínas RASSF1A, RASSF2A, hDAB2IP, BLU, SPROUTY-2 y RSK4 en las que la principal causa de la pérdida de su expresión es la metilación de los promotores de los genes que las codifican⁴³⁴⁻⁴³⁶.

Las mutaciones en el gen *CTNBB1*, al igual que en *KRAS*, se han descrito en etapas tempranas de la tumorigénesis y constituyen otro de los factores que participa en la

adquisición de un mayor grado tumoral^{144,145}. En nuestro trabajo hemos observado que un 18% de los carcinomas endometrioides de bajo grado presentan mutaciones en el gen *CTNNB1*, valor similar al observado en otros estudios en este tipo de tumores⁵⁴.

De los 10 tumores endometrioides de bajo grado con mutación en *CTNNB1* sólo se obtuvo sangre periférica de 4 de ellos (casos 41, 50, 68 y 69) (tabla 69).

Tabla 69: Relación de alteraciones genéticas en los tumores endometrioides de bajo grado con mutaciones en el gen *CTNNB1*. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; E1: carcinoma endometrioide grado 1; E2: carcinoma endometrioide grado 2.

Casos	Tipo de tumor	<i>CTNNB1</i>	<i>PTEN</i>	MSI	OTROS FACTORES								
					<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>KRAS</i>	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
4	E1	p.D32N	p.P95T/p.Q111X p.A126T	ND	---		---	+	+	-	Sí	Sí	Sí
10	E1	p.S37F	p.I253fsX2 p.L320S	ND	---	p.M1043V	---	-	-	-	Sí	Sí	Sí
12	E1	p.T41A	p.I253fsX2 p.G132D	ND	---	p.N1044K	---	+	+	-	No	Sí	No
22	E2	p.G34R	p.G132A p.G165R	ND	p.E2250fsX27	p.H1047R	---	-	-	-	Sí	Sí	Sí
31	E1	p.S37F	p.D300fsX6	ND	p.Q450X	p.H1047R	---	-	-	+	No	No	Sí
34	E1	p.G34R	---	ND	---	---	p.G12D	+	+	-	No	No	No
41	E1	p.S33C	---	MSS	p.E1783X	---	---	+	+	+	Sí	Sí	Sí
50	E1	p.S37F	---	MSS	---	p.T1025A	---	-	-	-	No	No	Sí
56	E2	p.S45F	p.R130P p.R130L	ND	---	---	---	-	-	-	Sí	Sí	Sí
68	E1	p.S37F p.G34R	---	MSI-L	p.T1438fsX6	---	p.G13D	+	-	-	Sí	Sí	Sí
69	E2	p.S37F	---	MSI-L	p.W2091X	---	---	-	-	+	Sí	Sí	Sí

Sin poder obtener resultados concluyentes a la hora de analizar si mutaciones en *CTNNB1* se asocian con inestabilidad de microsatélites, sí podemos afirmar que las mutaciones en el gen *CTNNB1* se acompañan principalmente de alteraciones en los genes *PTEN* y *PIK3CA*. Además, fueron frecuentes las mutaciones en el gen *ARID1A* incluso cuando *PTEN* o *PIK3CA* no aparecían alterados. Las modificaciones epigenéticas también fueron frecuentes pero no guardaron relación con el grado del tumor ni con el número de genes mutados.

Por tanto, las mutaciones en el gen *CTNNB1* tendrían lugar en estadios más tardíos de la tumorigénesis y acompañarían principalmente a mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA* y *ARID1A*.

El gen *TP53* mostró mutaciones en un 11% de los tumores analizados en nuestro trabajo, porcentaje de incidencia similar al observado en otros estudios para los carcinomas de bajo grado⁵⁴.

Cuatro de los seis tumores que mostraron el gen *TP53* mutado mostraron mutaciones en otros genes, principalmente en *PTEN* y *ARID1A* (tabla 70).

Tabla 70: Relación de alteraciones genéticas en los tumores endometrioides de bajo grado con mutaciones en el gen *TP53*. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; E1: carcinoma endometriode grado 1; E2: carcinoma endometriode grado 2.

Casos	Tipo de tumor	<i>TP53</i>	OTROS FACTORES										
			<i>PTEN</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>BRAF</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
26	E2	p.R248Q	p.C136fsX1	---	p.Q1334_R1335dupQ	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
48	E1	p.G266R	p.R335X	p.P179R	p.Q1614fsX20	---	ND	-	+	+	Sí	Sí	Sí
57	E2	p.P151S	---	---	---	---	ND	+	+	-	Sí	No	Sí
62	E2	p.A223D	---	---	---	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
73	E1	p.R248Q	---	---	---	p.G469A	ND	-	-	+	Sí	No	Sí
79	E1	p.C135Y	Traslocación?	p.P1175fsX4 p.E1864fsX35	---	---	MSI-H	+	-	-	Sí	Sí	Sí

Por otro lado, 6 carcinomas endometrioides de bajo (10%) no mostraron ninguna mutación en los genes analizados en nuestro trabajo. En ellos se observaron alteraciones epigenéticas como la metilación del gen *hMLH1* o la ausencia de expresión de la proteína HDAC2 (anexo 6); sin embargo, todo proceso tumoral conlleva una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que alteran el mecanismo de la célula y facilitan su perpetuación, convirtiéndola finalmente en célula tumoral. Las alteraciones en los procesos epigenéticos participan en la tumorigénesis pero no constituyen el origen de la misma³²⁵, sin tener claro si son causa o consecuencia del proceso tumoral. Por tanto, los tumores en los que no observamos mutaciones en los genes estudiados en nuestro trabajo, pueden presentar otro tipo de alteraciones como grandes reordenamientos o pérdidas de heterocigosidad o mostrar alteradas otras rutas o genes no estudiados en nuestro trabajo y caracterizados recientemente como factores implicados en el desarrollo del carcinoma endometriode.

Nos referimos por ejemplo a los genes *PIK3R1* y *PIK3R2*, mutados en un 20-43% y 5% de las casos respectivamente según lo descrito en otros trabajos^{41,437}. Codifican las isoformas α y β , respectivamente, de la subunidad reguladora del complejo PI3K: p85. Se unen a proteínas tirosín-kinasas a través del dominio SH2 y median la asociación entre la subunidad catalítica p100 y la membrana plasmática. Mutaciones en ambas isoformas producen una ganancia de función que mantiene a la proteína PI3K unida a la membrana plasmática llevando a cabo, de forma permanente, la formación de PIP3 y por tanto manteniendo activada la ruta de señalización⁴¹. Se ha descrito que las mutaciones en el gen *PIK3R1* aparecen en estadios tempranos del tumor y no coexisten con mutaciones en el gen *PIK3CA*⁴⁰ con lo cual, de demostrar que aparecen en tan elevado porcentaje, se podrían incluir en el estudio de los carcinomas endometrioides de bajo grado al mismo nivel que *PTEN* y *ARID1A*.

Por último, según nuestros resultados, HDAC2 no se expresa en un elevado número de tumores endometrioides de bajo grado, seguida de las proteínas HDAC1 y HDAC3. Estas diferencias se mantienen en los carcinomas endometrioides de grado 1 pero no en los carcinomas endometrioides de grado 2 en los que la expresión de HDAC1 y de HDAC3 aparece ausente en un mismo porcentaje de tumores (tabla 54). Los carcinomas endometrioides de grado 2 también mostraron un número menor de tumores con

disminución de la expresión de las tres HDACs e incluso de tumores en los que existía ausencia de expresión de dos de ellas.

Estos resultados difieren de lo observado en otros trabajos ya que, como ya hemos comentado anteriormente, la proteína HDAC1 ha sido descrita como la histona desacetilasa más alterada en los carcinomas endometrioides y tanto su sobreexpresión como la ausencia de ella son indicativos de mal pronóstico y menor supervivencia de las pacientes³¹¹⁻³¹³. Los carcinomas endometrioides de bajo grado no son tumores que presenten una alta malignidad y el pronóstico de las pacientes suele ser favorable. Por tanto cobra sentido que la expresión de la proteína HDAC1 se encuentre alterada en un bajo porcentaje de tumores.

Por tanto, según lo observado en nuestro trabajo, los carcinomas endometrioides de bajo grado presentan mutaciones principalmente en los genes *PTEN*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *CTNNB1* y *KRAS* acompañadas de MSI, metilación del gen *hMLH1* y ausencia de expresión de la proteína HDAC2. Además, nuestros resultados sugieren que las mutaciones en los genes *PTEN* y *KRAS*, la MSI y la metilación del gen *hMLH1* son eventos tempranos en el desarrollo tumoral sucedidos por mutaciones en los genes *ARID1A*, *PIK3CA* y *CTNNB1* (figura 113).

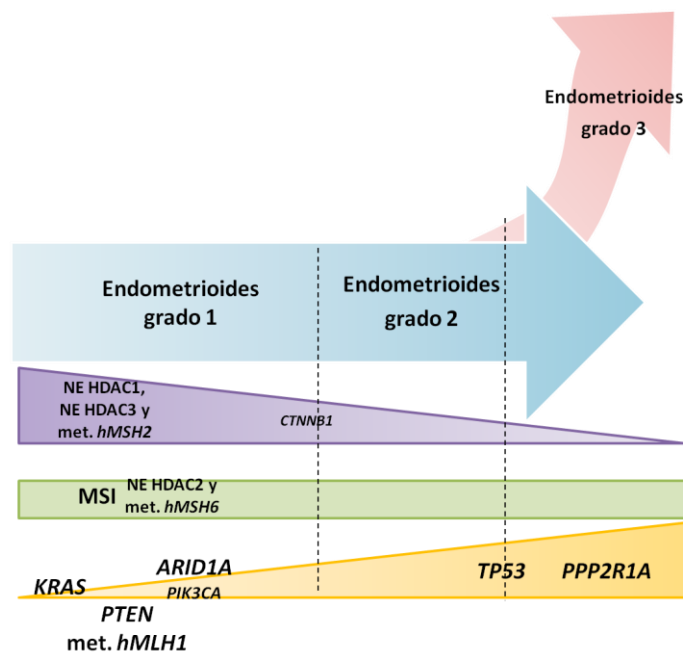


Figura 113: Variaciones observadas en las alteraciones genéticas y epigenéticas analizadas en nuestro trabajo con el aumento del grado del carcinoma endometrioide. El tamaño de letra utilizado se correlaciona con el grado incidencia de la alteración. Met.: metilación; NE: no expresión.

4.2 ADENOCARCINOMAS ENDOMETRIOIDES DE ALTO GRADO

Los carcinomas endometrioides de grado 3 han sido definidos desde un punto de vista histológico como tumores endometrioides con más de un 50% de componente sólido glandular¹⁸. Al presentar un comportamiento clínico similar al de los carcinomas no endometrioides^{429,430} y poder coexistir con los carcinomas serosos, muchos autores han considerado que ambos tipos de tumor comparten las mismas características moleculares. Sin embargo, se ha comprobado que los carcinomas endometrioides de grado 3 poseen un pronóstico más favorable y características moleculares que difieren con respecto a las de los carcinomas serosos. A pesar de ello, la información acerca de las alteraciones moleculares asociadas al carcinoma endometrioide de grado 3 es limitada y no se ha establecido un perfil molecular que las caracterice.

En nuestro estudio analizamos 8 muestras de carcinoma endometrioide de grado 3 (tabla 71).

Tabla 71: Relación de alteraciones genéticas en los tumores endometrioides de alto grado estudiados en nuestro trabajo. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; E3: carcinoma endometrioide grado 3.

Casos	Tipo de tumor	ALTERACIONES PRESENTADAS													
		<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>KRAS</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
9	E3	--	p.R110C	p.A73T	--	--	p.R992X	--	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
36	E3	p.Y176fsX2	--	--	--	p.S337fsX143	--	--	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
38	E3	p.P248fsX5	--	--	--	--	--	p.G12V	ND	+	-	-	Sí	No	Sí
52	E3	p.R130Q p.R142W p.R173Y	p.R175C	--	p.R48Q	p.G154D	p.T1025A p.K1024N	--	MSI-L	+	-	+	Sí	No	Sí
67	E3	--	--	--	--	p.P146fsX253	--	p.G13D	ND	+	-	-	Sí	Sí	Sí
72	E3	p.R130Q	--	--	--	--	--	--	ND	+	-	-	Sí	Sí	Sí
80	E3	p.G132D p.Q87fsX2	--	--	--	p.N1081fsX11	--	p.G12A	MSI-H	-	-	-	Sí	No	Sí
82	E3	p.E285X p.T68H	--	--	--	p.P2114fsX20	p.M1043V	p.G12D	ND	+	-	+	Sí	Sí	Sí

En nuestro trabajo, *PTEN* fue el gen que apareció mutado en un mayor número de tumores endometrioides de grado 3 seguido de los genes *ARID1A*, *KRAS* y *PIK3CA* (tabla 46).

El porcentaje de carcinomas endometrioides de grado 3 que mostraron los genes *PTEN* y *PIK3CA* mutados fue mayor que en los carcinomas endometrioides de bajo grado pero sin mostrar diferencias significativas (tablas 46 y 61). Algunos autores han llegado a observar en este tipo de tumores una incidencia de mutaciones en los genes *PTEN* y *PIK3CA* de hasta un 90% y un 57% respectivamente. Nuestros resultados discrepan de lo descrito principalmente en el gen *PIK3CA* pero, como hemos comentado anteriormente, estas diferencias puede deberse a la baja sensibilidad de la técnica que utilizamos para la detección de mutaciones en este gen (CSGE-Heterodúplex), al mayor número de

muestras analizadas en otros trabajos o al estudio de los exones 1 al 7 del gen *PIK3CA* en los que también se han observado mutaciones patogénicas con elevada frecuencia^{54,84}.

Tan sólo obtuvimos muestras de sangre periférica de dos pacientes (casos 52 y 80), lo que no nos permitió establecer correlaciones entre la MSI y alteraciones en el sistema MMR. No obstante, observamos que el gen *hMLH1*, al igual que ocurría en los carcinomas endometrioides de bajo grado, fue el componente del sistema MMR que apareció metilado en un mayor porcentaje de tumores, superior al presentado por los carcinomas endometrioides de bajo grado pero sin mostrar diferencias significativas al comparar ambos grupos (tablas 46 y 61). Sin embargo, de nuevo no observamos asociación entre la metilación de los genes implicados en el sistema MMR y la ausencia de expresión de sus proteínas

Nuestros resultados mostraron que la relación entre mutaciones en el gen *PTEN* y la metilación de los genes MMR observada en los carcinomas endometrioides de bajo grado, se mantuvo en los carcinomas endometrioides de grado 3. Un 67% de los tumores que mostraron el gen *PTEN* mutado, presentaron metilado como mínimo el gen *hMLH1*. Unificando estos datos con los observados en los endometrioides de bajo grado, obtendríamos que un 61% de los carcinoma endometrioides con mutaciones en el gen *PTEN* presentan metilación en sus genes reparadores, y en concreto, un 55% en el gen *hMLH1*.

El gen *KRAS* apareció alterado en un elevado porcentaje de carcinomas endometrioides de grado 3 (50%), superando a los porcentajes descritos por otros autores⁵⁴ y lo observado en nuestro trabajo en los carcinomas endometrioides de bajo grado. Las diferencias al comparar ambos grupos fueron significativas (tablas 46 y 61). Esta elevada incidencia de mutaciones en el gen *KRAS* coincide con la ausencia de mutaciones en los genes *BRAF* y *CTNNB1* en este grupo ya que las mutaciones en el gen *KRAS* y en los genes *BRAF* y *CTNNB1* parecen ser excluyentes^{418,433}.

Por otra parte, las mutaciones en los genes *TP53* y *PPP2R1A* aparecieron en un porcentaje mayor que en el grupo de los carcinomas endometrioides de bajo grado sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos (tablas 46 y 61), y similar al detectado en otros trabajos para este subtipo histológico^{42,54}. Las alteraciones en estos dos genes se encuentran principalmente en carcinomas no endometrioides y es esta una de las principales características que diferencian a los carcinomas endometrioides de grado 3 de los carcinomas endometrioides de bajo grado invalidando el modelo dualístico propuesto por Bokhman et al. en el cual los carcinomas endometrioides de grado 3 eran incluidos en el grupo de los carcinomas endometrioides aún presentando características diferentes⁷.

Finalmente, en nuestro estudio observamos expresión de las tres proteínas HDACs en un mayor número de tumores que en el grupo de los carcinomas endometrioides de bajo

grado. La histona desacetilasa cuya expresión se observó ausente en un mayor número de carcinomas endometrioides de grado 3, fue HDAC2 al igual que en el grupo de los carcinomas endometrioides.

Por tanto, nuestros resultados muestran que los carcinomas endometrioides de grado 3 presentan principalmente alterados los genes *PTEN*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TP53* y *PPP2R1A* (de mayor a menor incidencia de mutaciones) acompañadas de MSI, metilación del gen *hMLH1* y ausencia de expresión de la proteína HDAC2. Al unificar estos resultados con los obtenidos en los carcinomas endometrioides de bajo grado se observa con el aumento de grado un aumento en la incidencia de mutaciones en los citados genes y de la metilación del gen *hMLH1* y una disminución en el porcentaje de tumores con el gen *CTNNB1* alterado, con metilación en el gen *hMSH2* y con ausencia de expresión en las proteínas HDAC1 y HDAC3. El porcentaje de tumores con ausencia de expresión de la proteína HDAC2, con metilación en el gen *hMSH6* y de pacientes con MSI no varía de unos grados a otros (figura 113).

4.3 ADENOCARCINOMAS SEROSOS

El adenocarcinoma seroso representa un 10% de los tumores uterinos y se trata de un tumor de alto grado con mal pronóstico y con tendencia a la infiltración vascular. Aparece precedido de pólipos endometriales o atrofia endometrial y, por tanto, se suele detectar en estadios avanzados. Debido a esto, es común la aparición de metástasis convirtiéndolo en uno de los tumores uterinos más agresivos y difíciles de controlar²⁷.

Nuestra cohorte contó con 8 carcinomas tipo seroso de los cuales el 50% presentó mutaciones patogénicas en el gen *TP53*. Estos resultados coinciden con lo expuesto en otros trabajos en los cuales la incidencia de mutaciones patogénicas en dicho gen en los carcinomas serosos se sitúa entre el 50% y el 90%^{42,120,185,189-191} (tabla 72).

Tabla 72: Relación de alteraciones genéticas en los carcinomas tipo seroso con mutaciones en el gen *TP53*. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; Ser.: carcinoma tipo seroso.

Casos	Tipo de Tumor	<i>TP53</i>	OTROS FACTORES								
			<i>PPP2R1A</i>	<i>CTNNB1</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
19	Ser	---	---	---	ND	-	-	-	No	Sí	No
20 (H)	Ser.	p.R273H	---	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
25	Ser.	---	---	---	MSI-H	+	+	+	No	Sí	No
29	Ser.	p.G248Q	p.S256T	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
32	Ser.	p.V274A	---	---	ND	+	-	+	Sí	Sí	Sí
49	Ser.	---	p.P179R	p.S37F	MSS	-	-	-	No	No	Sí
59	Ser.	---	p.P179R	---	ND	-	-	+	Sí	Sí	Sí
70	Ser.	p.R175H p.G266R	p.P179R	---	MSI-L	-	-	-	Sí	No	Sí

Por otro lado, observamos que el gen *PPP2R1A* apareció mutado en un 50% de los tumores tipo seroso estudiados, ajustándose también a lo descrito por otros autores en

estudios recientes^{51,54,210}. Fue frecuente la coexistencia con mutaciones en el gen *TP53* y tan sólo uno de los tumores mostró alteraciones en otro gen, *CTNNB1*.

En nuestro trabajo no observamos mutaciones en los genes *CDH1* y *CDKN2A*, comúnmente relacionados con el desarrollo de carcinomas no endometrioides. Numerosos estudios han descrito una frecuente disminución o ausencia de expresión de la proteína E-cadherina en los carcinomas de endometrio tipo seroso y de células claras. Sin embargo, se ha observado que dicha alteración no se corresponde con la tasa de mutaciones en el gen *CDH1*. El mecanismo que lo origina no se ha esclarecido aunque se piensa que puede deberse a pérdidas de heterocigosidad del gen o a un silenciamiento del mismo vía metilación del promotor^{139,141,142}. De igual manera, la expresión de la proteína p16 también aparece alterada con elevada frecuencia en los carcinomas serosos y, especialmente, en los de tipo seroso papilar^{27,202-206}. Su disminución o pérdida se asocia a tumores más agresivos y de peor pronóstico y su origen se atribuye principalmente a deleciones homocigotas e hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A*²⁰²⁻²⁰⁴. Por estos motivos, no resulta inusual que en nuestro trabajo no hayamos observado mutaciones en ninguno de los dos genes.

Dos de los carcinomas tipo seroso incluidos en nuestro estudio (casos 19 y 25) no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados. Existe la posibilidad de que presenten alteraciones en otros genes asociados al desarrollo de los carcinomas de endometrio tipo seroso. Por ejemplo, estudios recientes realizados mediante *cDNA arrays* han mostrado que, en los carcinomas no endometrioides, existe una elevada sobreexpresión de algunas proteínas implicadas en la regulación del *checkpoint* durante la mitosis. Es el caso de la proteína STK15, la cual se ha detectado amplificada en el 55.5% de los carcinomas no endometrioides y ausente en todas las muestras de carcinoma endometrioide analizadas⁴³⁸. Así mismo, la técnica de la secuenciación masiva está identificando nuevos genes frecuentemente alterados en numerosos tipos de tumores, incluidos los carcinomas de endometrio. Mediante secuenciación exómica se ha observado que el 36.5% de los carcinomas de endometrio serosos presentan mutado al menos un gen implicado en la remodelación de la cromatina y un 35% algún gen miembro de complejos ubiquitín ligasa. Los genes más frecuentemente mutados y por tanto de recomendable estudio en futuros análisis moleculares, son *CHD4* (17%), *FBXW7* (29%) y *SPOP* (8%). *CHD4* codifica la unidad catalítica del complejo NuRD mientras que las proteínas codificadas por los genes *FBXW7* y *SPOP*, forman parte de complejos ubiquitín ligasa⁵².

Tan sólo obtuvimos muestras de sangre periférica de tres pacientes (casos 25, 49 y 70) y por tanto no pudimos establecer correlaciones entre la MSI y alteraciones en el sistema MMR. No obstante, no detectamos una elevada frecuencia de metilación en los promotores de los genes MMR (tabla 52) aunque, a diferencia de los carcinomas

endometrioides, el gen MMR que apareció metilado en un mayor número de tumores tipo seroso fue *hMSH6*.

Finalmente, nuestros resultados mostraron una ausencia de expresión de al menos una de las proteínas HDAC analizadas en el 50% de los tumores tipo seroso. Ninguno de los casos presentó ausencia de expresión de las tres proteínas y, a diferencia de lo observado por nosotros en los carcinomas endometrioides, la histona desacetilasa que mostró pérdida de expresión en un mayor número de tumores fue HDAC1, lo cual tiene sentido si tenemos en cuenta que los carcinomas de endometrio tipo seroso son tumores más agresivos y de peor pronóstico y la ausencia de expresión de la proteína HDAC1 ha sido descrita como un indicativo de mal pronóstico y menor supervivencia de las pacientes³¹¹⁻³¹³

Por tanto, los carcinomas serosos muestran un perfil molecular específico del subtipo en el que son frecuentes las mutaciones en los genes *TP53* y *PPP2R1A*, acompañadas de fenómenos epigenéticos como la metilación en el gen *hMSH6* y la ausencia de expresión de la proteína HDAC1. Es poco común la aparición de mutaciones en el resto de genes analizados en nuestro trabajo y sería conveniente la inclusión del estudio de nuevos factores genéticos así como la búsqueda de otro tipo de alteraciones (amplificaciones o pérdidas de heterocigosidad) para un completo estudio de la patogénesis del tumor. Por otra parte, el aumento del tamaño muestral y la obtención de un mayor número de muestras de sangre periférica, nos permitiría corroborar los hallazgos epigenéticos observados en nuestro estudio y propios de este subtipo de tumor.

4.4 ADENOCARCINOMAS DE CÉLULAS CLARAS

El adenocarcinoma de células claras representa un 4% de los tumores uterinos y se trata de un tumor de alto grado, con peor pronóstico que los carcinomas endometrioides pero menos agresivo que los serosos en fases tempranas del desarrollo tumoral^{29,30}.

Hasta el momento, los carcinomas de células claras han sido incluidos en la misma categoría que los carcinomas serosos. El motivo ha sido principalmente el hecho de que ambos sean tumores de alto grado con un comportamiento agresivo. Sin embargo, se ha observado que no son equiparables debido a que exhiben características clínicas, inmunohistoquímicas y moleculares muy diferentes⁴³⁹.

En nuestro estudio contamos con un caso de carcinoma de endometrio de células claras (caso 30) (tabla 73).

Tabla 73: Relación de alteraciones presentes en el carcinoma de células claras estudiado en nuestro trabajo. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado; CC: carcinoma de células claras.

Caso	Tipo de tumor	ALTERACIONES PRESENTADAS								
		<i>ARID1A</i>	<i>hMLH1</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
30	CC	p.G276fsX86	IVS3+5G>A	ND	-	-	-	Sí	No	No

Al no obtener la muestra de sangre periférica de la paciente, no pudimos comprobar si se trataba de un carcinoma de endometrio asociado a Síndrome de Lynch.

Nuestros resultados no son extrapolables pero concuerdan con el hecho de que se haya descrito que en un 35% de los carcinomas de endometrio de células claras aparezcan mutaciones en los genes implicados en la remodelación de cromatina y en los complejos ubiquitín ligasa⁵². La proteína BAF250a, codificada por el gen *ARID1A*, forma parte del complejo SWI/SNF implicado en la remodelación de la cromatina dependiente de ATP y en nuestro caso presentó una mutación patogénica tipo *frameshift* descrita anteriormente por otros autores³³². En otros trabajos se ha observado una pérdida de expresión en un 26% de los carcinomas de células claras, tasa que supera a la de los serosos (18%)³⁴⁰. Sin embargo las mutaciones detectadas en el gen *ARID1A* en ambos subtipos son muy escasas. Además, se han descrito otros genes candidatos asociados al carcinoma de endometrio de células claras implicados de igual forma en la tumorigénesis de los carcinomas serosos: *FBXW7*, mutado en un 13% de los casos; *SPOP*, en un 9%; y *CHD4*, en un 4%⁵².

En el carcinoma de endometrio de células claras también han sido descritas mutaciones en el gen *TP53*, (9%)¹⁹² y pérdidas de expresión de la proteína E-cadherina debidas a LOH en el gen *CDH1*^{138,139}. Sin embargo, la presencia de una mutación en el gen *hMLH1* resulta un tanto inusual si se tiene en cuenta que en el carcinoma de endometrio esporádico no es muy común la aparición de mutaciones en los genes MMR²⁵⁰.

Con respecto a la ausencia de expresión de las histonas desacetilasas HDAC2 y HDAC3, no se ha descrito nada al respecto. Tan sólo se ha observado que la sobreexpresión de las tres proteínas es más frecuente en los tumores serosos y de células claras que en los carcinomas endometrioides³¹¹.

4.5 ADENOCARCINOMAS MIXTOS

Los adenocarcinomas mixtos representan un 10% de los carcinomas endometriales. Son tumores de alto grado y mal pronóstico formados generalmente de una mezcla de carcinoma de bajo y alto grado con diferenciación endometrioides y no endometrioides²¹.

Debido a su perfil heterogéneo, sus características moleculares son muy variadas dependiendo de su composición.

En nuestro trabajo estudiamos dos muestras de carcinoma de endometrio mixto. En el tumor 23, el 50% era componente endometriode de grado 2 y el otro 50%, carcinoma de células claras y seroso. El tumor 66 estaba formado por una mezcla de dos componentes de alto grado: seroso y endometriode 3.

Las características que mostraron ambos casos se aproximan al perfil molecular característico de los carcinomas endometriode (tabla 74).

Tabla 74: Relación de alteraciones genéticas presentes en los carcinomas mixtos estudiados en nuestro trabajo. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado.

Casos	Tipo de tumor	ALTERACIONES PRESENTADAS									
		<i>PTEN</i>	<i>ARID1A</i>	<i>KRAS</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
23	Mixto	p.R130G	p.E1779fsX3 p.P1326fsX11	p.G13D	MSI-H	-	-	-	Sí	Sí	Sí
66	Mixto	---	p.N106fsX5	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí

El tumor 23 presentó un perfil molecular idéntico al descrito en nuestro trabajo en los carcinomas endometrioides de bajo grado, en el que coexisten mutaciones en los genes *PTEN*, *ARID1A* y *KRAS* acompañadas de inestabilidad de microsatélites. Este resultado sugiere que en dicho caso, el componente endometriode enmascara, molecularmente hablando, al no endometriode aunque las mutaciones en los genes *KRAS* y *ARID1A* podrían ser aportadas, pero con menor probabilidad, por el componente seroso.

En el tumor 66 tan sólo observamos una mutación en el gen *ARID1A*, lo cual resulta inusual al tratarse de un tumor formado por componentes de alto grado en los que la frecuencia de aparición de mutaciones es bastante elevada.

En ambos tumores sería conveniente ampliar el estudio de su perfil molecular introduciendo el análisis de nuevos genes, como los ya mencionados, asociados al desarrollo de carcinomas endometrioides y carcinomas de endometrio tipo seroso.

Por tanto, los carcinomas de endometrio mixtos son tumores de alto grado y mal pronóstico cuyas características moleculares atienden a las propias de cada uno de sus componentes. Para su caracterización sería conveniente realizar, en primer lugar, un estudio anatomopatológico y una vez descrita su composición, analizar aquellos factores moleculares asociados al desarrollo de los carcinomas que lo integran.

4.6 CARCINOSARCOMAS

Los carcinosarcomas o tumores Mülllerianos malignos mixtos constituyen la variante más frecuente del grupo de los sarcomas (50%) y son tumores formados por epitelio maligno (generalmente adenocarcinoma endometriode) y componente estromal. Representan un 5% de todos los carcinomas de endometrio y se postula que se desarrollan a partir de células de carcinoma de endometrio que se diferencian a células mesenquimales. Este

proceso requiere una pérdida de polaridad y contacto célula-célula acompañada una reorganización en el citoesqueleto y expresión de marcadores mesenquimales adquiriendo un fenotipo migratorio⁴³⁹.

A pesar de su similitud con el carcinoma endometriode grado 3, se ha observado variedad en su comportamiento clínico. Las pacientes que desarrollan carcinosarcomas presentan peor pronóstico que las pacientes con carcinoma endometriode de grado 3 con una tasa de supervivencia de 5 años en un 35% de los casos aproximadamente^{440,441}. Este hecho podría acompañarse de diferencias a nivel molecular.

Nuestra cohorte contó con 12 muestras de carcinosarcoma, lo que representa un 14% de los carcinomas de endometrio incluidos en nuestro trabajo y constituye un porcentaje más elevado que el descrito por otros autores^{33,439}. Su composición fue muy heterogénea y en ocasiones no obtuvimos información acerca de las características de sus componentes (tabla 75).

Tabla 75: Relación de alteraciones genéticas en los carcinosarcomas estudiados en nuestro trabajo y las características histológicas de su componente epitelial. Met.: metilación; Exp.: expresión; ND: no determinado.

Casos	Componente epitelial	ALTERACIONES PRESENTADAS											
		<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	<i>ARID1A</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i>	MSI	Met. <i>hMLH1</i>	Met. <i>hMSH2</i>	Met. <i>hMSH6</i>	Exp. HDAC1	Exp. HDAC2	Exp. HDAC3
5	Endometriode	p.R172fsX5	---	p.G889fsX2 p.D1850fsX32	---	---	ND	+	+	+	Sí	Sí	Sí
11	?	---	p.S241F(LOH)	---	---	---	ND	-	-	-	No	Sí	No
16	Seroso	---	p.C176fsX180	---	---	---	MSI-H	-	-	-	Sí	Sí	Sí
24	Endometriode	---	---	---	---	p.T41A	ND	-	-	+	Sí	Sí	Sí
27	Seroso	p.Q171H (H)	p.P153fsX179 p.P278S	---	---	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
39	?	p.E256X	---	p.I1173fsX6 p.Q2115X	---	---	ND	-	-	-	Sí	Sí	Sí
46	Endometriode grado 1	---	---	---	p.M1043V	---	ND	-	-	+	Sí	Sí	Sí
53	Seroso	---	p.N239D	---	---	---	MSS	+	+	+	Sí	Sí	Sí
58	Epidermoide	---	p.R213X	p.S1000Y	p.M1043I	---	ND	-	-	-	Sí	No	Sí
63	Endometriode grado 3	p.344delK	---	---	---	---	ND	-	-	+	No	No	Sí
81	Seroso	---	---	---	---	---	ND	-	-	-	No	No	Sí
84	Endometriode grado 3	p.W274X	p.R249S	p.D1850fsX32	---	---	ND	+	-	+	Sí	No	Sí

Los genes que aparecieron alterados en un mayor número de tumores fueron *PTEN*, *TP53* y *ARID1A*.

Atendiendo a las mutaciones halladas, observamos que todos los tumores con componente endometriode (casos 5, 24, 46, 63 y 84) presentaban mutaciones en los genes asociados a carcinomas endometriodes *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* y *CTNNB1*. De igual forma, todos los carcinosarcomas con componente seroso excepto uno (casos 16, 27 y 53 pero no el 81), presentaron mutaciones en el gen *TP53*, asociado a carcinoma tipo seroso. Esta relación ya ha sido descrita por otros autores que han propuesto la existencia de dos tipos de carcinosarcomas: los carcinosarcomas con un patrón mutacional similar al de los carcinomas endometriodes, con presencia de mutaciones en los genes *ARID1A*,

PTEN, *PIK3CA* y *KRAS*, y los carcinosarcomas con un patrón mutacional similar al de los carcinomas serosos, con presencia de mutaciones en los genes *TP53* y *PPP2R1A*⁵⁴.

La muestra 58 era un carcinosarcoma con componente epidermoide con presencia de mutaciones en los genes *TP53*, *ARID1A* y *PIK3CA*. La muestra 81 era un carcinosarcoma con componente epitelial seroso y estroma de alto grado con ausencia de mutaciones en todos los genes analizados, incluido *PPP2R1A*. Estos casos constituyeron dos excepciones dentro del grupo de los carcinosarcomas. En el primero, el componente no era un adenocarcinoma sino un carcinoma de células escamosas o epidermoide. Este tipo de tumores son poco frecuentes y sus principales características son su rápido crecimiento, alto poder infiltrante, destrucción tisular local y su elevada capacidad metastásica. Tal vez debido a su origen queratinocítico se trate de un tumor que cumpla un patrón mutacional diferente al observado hasta el momento para los adenocarcinomas. Se ha descrito que el gen *PIK3CA* aparece mutado en un 9% de los tumores epidermoides de cabeza y cuello⁴⁴².

El caso 81 no mostró ninguna mutación. Su componente epitelial es carcinoma tipo seroso y, por tanto, sería conveniente el estudio de otros genes implicados en el desarrollo de los carcinomas de endometrio tipo seroso como *STK15*, *CHD4*, *FBXW7* y *SPOP*⁵². Por tanto, dado que las características moleculares de los carcinosarcomas parecen depender de las que presenta su elemento epitelial, sería conveniente el estudio de estos genes en el tumor 81 a fin de buscar otros mecanismos alterados que puedan estar implicados en su desarrollo.

Por otro lado, no obtuvimos información acerca del componente epitelial de los tumores 11 y 39; sin embargo, el perfil molecular que presentan sugiere la presencia de componente seroso en el caso 11 y de componente endometriode en el caso 39 por las razones ya expuestas, aunque sería necesario el análisis de más genes implicados en el desarrollo de ambos subtipos histológicos para poder obtener unos resultados concluyentes.

El número de mutaciones observadas en los carcinosarcomas estudiados en nuestro trabajo no fue muy elevado, siendo frecuente la aparición de tan sólo una mutación. Estos resultados se ajustan a lo descrito por otros autores⁴⁴³ pero discrepan de lo observado en trabajos posteriores realizados mediante secuenciación exómica, en los que la frecuencia de mutaciones en los carcinosarcomas fue moderada⁵⁴.

Tan sólo obtuvimos muestras de sangre periférica de dos pacientes (casos 16 y 53) y por tanto no pudimos establecer correlaciones entre la MSI y alteraciones en el sistema MMR aunque observamos que el caso 16, mostró una elevada MSI que podría ser consecuencia de la delección completa observada en el *hMLH1*.

Al igual que lo observado en los carcinomas de endometrio tipo seroso analizados en nuestro trabajo, *hMSH6* fue el gen MMR que se mostró metilado en un mayor número de carcinosarcomas. Si diferenciamos dos grupos según el tipo de componente epitelial, en el grupo de los carcinosarcomas con componente endometriode el gen *hMSH6* sigue siendo el gen metilado en un mayor número de muestras. De los 4 casos que presentaban componente seroso, tan sólo uno de ellos mostraba metilación y lo hacía en los tres genes.

Por otra parte, la histona desacetilasa que mostró pérdida de expresión en un mayor número de los carcinosarcomas estudiados fue HDAC2, seguida de HDAC1 y HDAC3, lo que corresponde a un patrón similar al presentado por los carcinomas endometrioides. Al dividir según el tipo de componente epitelial, los que contenían elemento endometriode mostraron principalmente ausencia de la proteína HDAC2 mientras que tan sólo un carcinosarcoma con componente seroso presentó pérdida de expresión de las proteínas HDAC1 y HDAC2.

Por tanto, de acuerdo con los resultados observados en nuestro trabajo, los carcinosarcomas presentan un perfil mutacional correspondiente al del componente epitelial que lo conforma mientras que las alteraciones epigenéticas no se ajustan a ningún patrón histológico. Al ser tumores en constante proceso de transformación, podrían estar sometidos a continuos cambios en su mecanismo epigenético ya que su evolución de células epiteliales a células mesenquimales requiere una activación y silenciamiento continuo de la transcripción génica (figura 114).

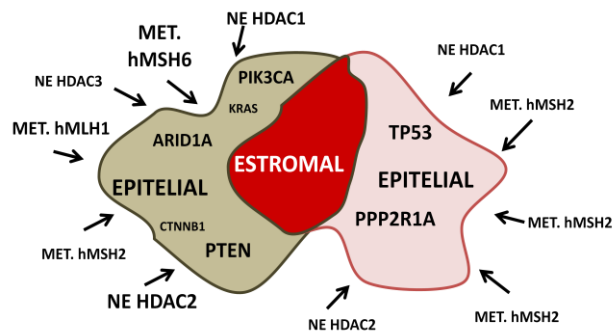


Figura 114: Representación de las alteraciones moleculares asociadas a los carcinosarcomas de endometrio dependiendo de las características histológicas de sus componentes. El tamaño de letra utilizado se correlaciona con el grado incidencia de la alteración. MET.: metilación; NE: no expresión.

A la vista de nuestros resultados, la clasificación más adecuada para la determinación de perfiles moleculares en el carcinoma de endometrio esporádico es aquella que tiene en cuenta las características moleculares específicas de cada subtipo histológico. Las clasificaciones según criterios clínico-patológicos y grados histológicos resultan poco específicas e incorrectas ya que agrupan tipos de tumores que difieren tanto en su perfil genético como epigenético. La clasificación según los subtipos histológicos resulta más

concreta y permite obtener información más detallada acerca del perfil molecular de cada tumor, facilitando así la búsqueda de tratamientos más adecuados.

Las nuevas técnicas moleculares permiten el estudio de un mayor número de factores implicados en la tumorigénesis. Para poder encontrar terapias más eficaces que combatan el desarrollo tumoral, es primordial el conocimiento de aquellos procesos que se encuentran alterados; estudios recientes, realizados mediante análisis genómicos y proteómicos, han propuesto una clasificación diferente a las expuestas en nuestro trabajo en la cual los carcinomas de endometrio esporádico se dividen en cuatro grupos: los que presentan una alta incidencia de mutaciones en el gen *POLE*, los que muestran una alta inestabilidad de microsatélites, los carcinomas de endometrio con una baja incidencia de SCNAs y los carcinomas de endometrio con una alta incidencia de SCNAs⁴⁴⁴. Los futuros estudios se centrarán en la optimización de dicha clasificación comprobando a su vez la utilidad de la misma a la hora de buscar tratamientos específicos para los diferentes tipos de carcinoma de endometrio esporádico.

5. ANÁLISIS DE LOS TELÓMEROS EN CARCINOMAS DE ENDOMETRIO ESPORÁDICO

Los telómeros son regiones de DNA no codificante situados en los extremos de los cromosomas eucariotas y formados por repeticiones en tándem de secuencias cortas de nucleótidos. Su principal función es el mantenimiento de la integridad y la estabilidad genómica^{343,344}.

En cada ciclo de división celular, el mecanismo de replicación de la célula no es capaz de completar la replicación de los telómeros y se produce un acortamiento de los mismos correspondiente al fragmento de Okazaki. En las células somáticas, donde no existe un mecanismo de mantenimiento de la longitud telomérica, los telómeros se acortan hasta alcanzar un tamaño crítico (2.5 kb) en el que el cromosoma pierde su protección y las células entran en estado de senescencia muriendo finalmente por apoptosis³⁵¹. Este proceso se considera un mecanismo de supresión tumoral ya que evita la inmortalización de las células.

La telomerasa es un complejo enzimático formado por tres componentes principales: TERT con actividad transcriptasa inversa, TERC, un ácido ribonucleico y DKC1 que actúa como proteína auxiliar^{361,362}. Su función principal es la de llevar a cabo el alargamiento de los telómeros en las células germinales³⁵² y en los tejidos en desarrollo³⁵³ aunque se ha comprobado que también está presente en las células endometriales³⁵⁴, la capa basal de la epidermis³⁵⁵ y el sistema hematopoyético³⁵⁶.

En las células tumorales, se ha observado que la telomerasa es sobreexpresada, lo que da lugar a una reversión del proceso de acortamiento y las convierte en células inmortales³⁶³. Sin embargo, existe una gran controversia debido a que en algunos tumores no se ha observado relación entre la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa. En algunos tipos de tumores ginecológicos, como el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el carcinoma de endometrio y el cáncer de cérvix, el estadio de la enfermedad no parece asociarse a la longitud telomérica a pesar de que la actividad de la telomerasa se ve incrementada progresivamente desde el estadio 1 al 3 del desarrollo tumoral. Una vez tratado con quimioterapia, la actividad de la telomerasa disminuye^{371,372}.

En nuestro estudio analizamos la relación entre la longitud telomérica y los diferentes tipos de tumor, grados y subtipos histológicos. El grupo de tumores de endometrio de células claras fue apartado del estudio ya que contaba con tan sólo una muestra.

Al comparar los tres grados tumorales, independientemente del subtipo histológico, observamos que las longitudes de los telómeros no diferían de forma significativa entre los diferentes grupos.

Los grupos de los carcinomas endometrioides de grado 1 y grado 2 mostraron longitudes teloméricas medias similares; sin embargo, el grupo de los carcinomas endometrioides de grado 3 mostró una longitud telomérica media muy inferior a la de los otros dos grupos aunque no llegó a alcanzar significación estadística. Este hecho podría sugerir que el aumento del grado del tumor endometrioide se asocia a un silenciamiento de la telomerasa en vez de a una sobreexpresión y, por tanto, a una mayor inestabilidad cromosómica que concordaría con su mayor agresividad y peor pronóstico. Las características moleculares de los carcinomas endometrioides de grado 3 son intermedias entre las de los carcinomas endometrioides de bajo grado y las de los carcinomas tipo seroso. Sin embargo, en ambos casos su longitud telomérica fue inferior a pesar de que los carcinomas tipo seroso también son tumores de alto grado.

Algunos autores han elaborado la teoría de la sobreactivación de la telomerasa asociada a la presencia de telómeros más largos y a una mayor supervivencia celular³⁶³. Según esto, podríamos pensar que los carcinomas no endometrioides deberían presentar telómeros más largos; sin embargo, se ha descrito un acortamiento telomérico en los carcinomas no endometrioides cuando existe la inactivación de al menos uno de los alelos de *TP53*. Experimentos realizados en ratones han mostrado que cuando se inactivan los dos alelos del gen *PTEN* se desarrollan carcinomas endometrioides⁴⁴⁵; sin embargo, la inactivación de uno de los dos alelos del gen *TP53* no produce desarrollo de tumores no endometrioides⁴⁴⁶ por lo que es necesaria la participación de más factores que den lugar a dicho desarrollo. Como la principal función de los telómeros es el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y ésta se ve altamente alterada en los procesos tumorales⁴⁴⁷, se ha propuesto el acortamiento telomérico, y la consecuente desprotección de los

telómeros, como otro de los factores desencadenantes de la tumorigénesis en los carcinomas no endometrioides⁴⁴⁸. En nuestro estudio observamos longitudes teloméricas medias similares en los carcinomas endometrioides y en los no endometrioides. Por tanto nuestros resultados no apoyan dicha teoría.

Los carcinomas mixtos son tumores compuestos por componentes tipo endometrioide y no endometrioide. En nuestro trabajo mostraron una longitud telomérica relativa media inferior a la del resto de grupos a excepción de los endometrioides grado 3.

Por otra parte, los carcinosarcomas, pudiéndose clasificar como los carcinomas de endometrio más agresivos y de peor pronóstico, no mostraron diferencias significativas en su longitud telomérica en comparación con el resto de grupos. De hecho su longitud telomérica media fue idéntica al grupo con el que podría mostrar más diferencias: los carcinomas endometrioides grado 1.

Por tanto, nuestros resultados muestran la ausencia de diferencias entre la longitud media relativa de los telómeros de los carcinomas endometrioides y los no endometrioides al igual que cuando comparamos los diferentes grados tumorales. Al segmentar la muestra por subgrupos histológicos tampoco se observan diferencias significativas aunque se advierte una longitud telomérica menor en los grupos de los carcinomas endometrioides de grado 3 y en el grupo de los carcinomas mixtos.

El DNA telomérico (tDNA) se encuentra formando dos hebras desiguales. La hebra en sentido 5'-3' se denomina hebra G debido al alto porcentaje de Guininas contenidas mientras que la hebra 3'-5' se encuentra enriquecida en Citosinas. La hebra G en su extremo no se encuentra apareada con la otra hebra dando lugar a un segmento monofibrilar que constituye el extremo 5' del cromosoma. Adopta una estructura secundaria en forma de lazo que es estabilizada por proteínas específicas como POT1, TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TNKS2 o TPP1^{345,346,347,348,449,450}.

Diversos estudios han analizado polimorfismos contenidos en las proteínas POT1, TNKS2, TERF1, TERF2 y TERT y su posible implicación en una menor protección de los extremos teloméricos y por tanto en una mayor degradación de los mismos. Tan sólo se ha hallado una mínima relación con los polimorfismos rs2736122 (*TERT*) y rs12412538 (*TNKS2*)⁴⁵¹. Sin embargo, se limitan a analizar el riesgo existente a desarrollar carcinoma de endometrio, sin diferenciar subtipo ni grado de malignidad. En nuestro trabajo hemos analizado dos polimorfismos asociados a un mayor acortamiento telomérico y consecuente pérdida de la estabilidad cromosómica: *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A*. En concreto, los alelos C y G, respectivamente, han sido relacionados con una menor actividad de la enzima telomerasa debido a una disminución en la actividad promotora cuando éstos estaban presentes^{395,396}. En nuestro estudio analizamos las diferencias existentes en la distribución de los genotipos según los tipos establecidos por la clasificación clínico-patológica y los grados y subtipos histológicos. Tan sólo observamos diferencias significativas en la distribución de genotipos en el

polimorfismo *TERT-1327C>T* cuando comparamos todos los subgrupos contenidos en cada clasificación según las características clínico-patológicas e histológicas. La frecuencia de aparición del genotipo C/C era mayor en los carcinomas no endometrioides, aumentaba con el grado, y presentaba valores muy elevados en los subtipos histológicos de mayor grado (endometrioides grado 3, serosos, células claras y carcinosarcomas principalmente). Por otra parte, este aumento conllevaba una disminución en la frecuencia de aparición del genotipo C/T. Dado que el alelo C ha sido relacionado con una menor actividad de la telomerasa y por tanto con telómeros más cortos, realizamos una agrupación por alelos. Cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo C, no observamos diferencias significativas al comparar los carcinomas endometrioides con los no endometrioides ni al comparar los distintos grados entre sí. Sin embargo, cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo T, hallamos diferencias significativas entre el grupo de los carcinomas endometrioides y los no endometrioides. En los carcinomas no endometrioides el porcentaje de tumores que presentaban el genotipo C/C superaba al porcentaje de tumores que contenían el alelo T (T/T+C/T). Esto no ocurría en los carcinomas endometrioides y de ahí la significación obtenida al comparar ambos grupos. Por tanto, aunque el alelo C ha sido asociado a una menor actividad de la telomerasa³⁹⁵, en nuestro trabajo observamos que el genotipo C/C se relaciona con los carcinomas no endometrioides, tumores más agresivos y de peor pronóstico, pero no con una menor longitud telomérica. Cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo C (C/C+C/T) y comparamos los diferentes subtipos, tan sólo obtuvimos diferencias significativas al equiparar los carcinomas mixtos con los carcinomas grado 2 y los carcinomas serosos. Este hecho se ajustaría a la menor longitud telomérica detectada en el grupo de los carcinomas mixtos pero al contar con tan sólo dos casos, sería conveniente aumentar el tamaño muestral para poder corroborarlo.

La distribución de genotipos en el polimorfismo *TERC-63G>A* no mostró diferencias significativas. Tan sólo se observó un p-valor significativo cuando se agrupó el alelo G (G/G+G/A vs A/A) y se equiparó el grupo de los carcinosarcomas con el de los carcinomas endometrioides de grado 3. Además, se observó una tendencia a la significación cuando se comparó el grupo de los carcinomas endometrioides de grado 3 con los carcinomas no endometrioides y con los carcinomas endometrioides de grado 2. En un 75% de carcinomas endometrioides de grado 3 estaba presente el alelo G mientras que en el resto de grupos el alelo A fue el más frecuente. Teniendo en cuenta que alelo G ha sido asociado a una menor actividad de la telomerasa, estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que el grupo de los carcinomas endometrioides de grado 3 presente una longitud telomérica menor a la del resto de grupos.

Por tanto, en nuestro trabajo no hemos observado una relación clara entre la longitud telomérica media y los diferentes tipos de tumores observando que tan sólo los carcinomas endometrioides de grado 3 y los carcinomas mixtos presentaban telómeros más cortos. El estudio de los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A* presentó una leve asociación

entre el alelo C y los carcinomas mixtos y el alelo G y los carcinomas endometrioides de grado 3.

Finalmente, sería conveniente el estudio de determinados aspectos epigenéticos en las regiones teloméricas y subteloméricas. Recientemente, se ha demostrado que la metilación y la desacetilación de las histonas localizadas en dichas zonas constituyen un importante represor de la recombinación del DNA telomérico^{452,453}. Cuando la metilación es reducida en las secuencias subteloméricas y teloméricas la cromatina telomérica se encuentra en un estado “abierto” permitiendo que la telomerasa y las proteínas del complejo accedan más fácilmente a la estructura para llevar a cabo la elongación de telómeros. De igual forma, un aumento en la acetilación favorece la conformación “abierta” y por tanto la elongación telomérica⁴⁵³. Teniendo en cuenta que los tumores están sometidos a frecuentes cambios epigenéticos, esta hipótesis resulta factible y estos eventos podrían jugar un papel importante en el desarrollo del tumor.

CONCLUSIONES



1. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirman la alta incidencia de mutaciones patogénicas en el gen *PPP2R1A* en los carcinomas de endometrio esporádico tipo seroso, aunque, el hecho de que lo hayamos observado mutado en otros grupos histológicos, sugiere la necesidad de estudiar este gen en otros subtipos tumorales.
2. La demostración de mutaciones en diferentes exones del gen *PPP2R1A* justifica el estudio completo del mismo, en lugar del análisis de exones seleccionados, para la realización de un correcto diagnóstico molecular. Por otra parte, nuestro trabajo muestra por primera vez que en algunos tumores de endometrio se detectan variantes de la proteína *PPP2R1A* de mayor tamaño, probablemente resultado de un procesamiento post-transduccional, siendo necesario profundizar en el estudio de estas variantes para determinar su posible papel en el desarrollo tumoral.
3. El gen *ARID1A* presenta una elevada tasa de mutaciones en el carcinoma de endometrio esporádico, sin observarse puntos calientes (hotspots), siendo necesaria su inclusión en los estudios genéticos de rutina de este tipo de tumores.
4. La longitud telomérica de los carcinomas de endometrio esporádico no guarda asociación con los diferentes grados y tipos histológicos.
5. En nuestro estudio, la inestabilidad de microsatélites y la ausencia de expresión de las proteínas *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* detectada mediante inmunohistoquímica, no se corresponde con la presencia de mutaciones, grandes reordenamientos ni metilación en dichos genes reparadores, por lo que parece necesaria la presencia de otros factores genéticos o epigenéticos que puedan estar implicados en la aparición de estas alteraciones en cáncer de endometrio esporádico.
6. En nuestro trabajo hemos observado que las mutaciones en el gen *PTEN* se correlacionan con la metilación de los genes MMR y principalmente del gen *hMLH1* en los carcinomas endometrioides, lo que sugiere que la alteración de los sistemas de reparación del DNA favorece las mutaciones en el gen *PTEN* en este tipo de tumores.
7. Finalmente, nuestro análisis de las alteraciones moleculares en tumores de endometrio esporádico muestra que, de las diferentes clasificaciones propuestas hasta el momento, la más adecuada, concreta y específica es aquella que tiene en cuenta el subtipo histológico del tumor y sus alteraciones moleculares, confirmando que el análisis histológico y molecular de un tumor facilita información acerca de su progresión y permitirá diseñar tratamientos específicos dirigidos.

1. The results of our study confirm the high incidence of the pathogenic mutations in the *PPP2R1A* gene in serous sporadic endometrial carcinoma, though, as it appears mutated in other histological groups, it is suggested the necessity of studying this gene in other tumour subtypes
2. The demonstration of mutations in different exons of the *PPP2R1A* gene justifies its full study, instead the analysis of only some selected exons, to perform a correct molecular diagnosis. On the other hand, our work shows for the first time that in some endometrial tumours it is detected larger *PPP2R1A* protein variants, probably because of a posttranscriptional processing, and therefore, it would be convenient further analysis of these variants to determine their possible role in tumour development.
3. The *ARID1A* gene shows a high rate of pathogenic mutations in sporadic endometrial carcinoma without observing hotspots, being necessary its study in routine genetic studies of these tumours.
4. The telomere length of the sporadic endometrial carcinomas is not associated with the different histological grades and subtypes.
5. In our study, the microsatellite instability and the lack of the hMLH1, hMSH2, and hMSH6 proteins expression, detected by immunohistochemistry, do not correspond to the presence of mutations, gross rearrangements and methylation of these MMR genes. Therefore, it seems to be necessary the presence of other genetic or epigenetic factors that can be implicated in the appearance of these alterations in sporadic endometrial carcinoma.
6. In our work, we have observed that the mutations in the *PTEN* gene correlate with the methylation of the MMR genes and mainly with the *hMLH1* gene in the endometrioid carcinomas, suggesting that alterations in the DNA repair systems favors mutations in the *PTEN* gene in this type of tumours.
7. Finally, our analysis of the molecular alterations in sporadic endometrial carcinoma shows that of the different classifications purposed so far, the most appropriate, accurate and specific is one that takes into account the histological subtype of the tumour and its molecular alterations. This confirms that histological and molecular analysis of the tumour provides information about its progression and they will allow designing specific and targeted treatments.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

- 1 Choi, E. Medical Dictionary (2011).
- 2 Galiano, A. Diccionario Ilustrado de Términos Médicos. (2010).
- 3 Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. (2010).
- 4 Bray, F., Loos, A. H., Oostindier, M. & Weiderpass, E. Geographic and temporal variations in cancer of the corpus uteri: incidence and mortality in pre- and postmenopausal women in Europe. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **117**, 123-131, doi:10.1002/ijc.21099 (2005).
- 5 Sorosky, J. I. Endometrial cancer. *Obstetrics and gynecology* **111**, 436-447, doi:10.1097/AOG.0b013e318162f690 (2008).
- 6 Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., Hao, Y., Siegel, R.L., et al. *Global Cancer Facts and Figures 2007*. (American Cancer Society, 2008).
- 7 Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **15**, 10-17 (1983).
- 8 Mutter, G. L. *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 924-930 (2000).
- 9 Sansal, I. & Sellers, W. R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 2954-2963, doi:10.1200/JCO.2004.02.141 (2004).
- 10 Lax, S. F., Pizer, E. S., Ronnett, B. M. & Kurman, R. J. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Human pathology* **29**, 551-558 (1998).
- 11 Sherman, M. E. *et al.* Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **10**, 963-968 (1997).
- 12 Hamilton, C. A. *et al.* Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *British journal of cancer* **94**, 642-646, doi:10.1038/sj.bjc.6603012 (2006).
- 13 Oehler, M. K., Brand, A. & Wain, G. V. Molecular genetics and endometrial cancer. *The journal of the British Menopause Society* **9**, 27-31 (2003).
- 14 Amant, F. *et al.* Endometrial cancer. *Lancet* **366**, 491-505, doi:10.1016/S0140-6736(05)67063-8 (2005).
- 15 Network, N. C. C. in *NCCN practise guidelines in oncology* (2009).
- 16 Society, A. C. *Cancer Facts and Figures 2010*. (American Cancer Society, 2010).
- 17 Clarke, B. A. & Gilks, C. B. Endometrial carcinoma: controversies in histopathological assessment of grade and tumour cell type. *Journal of clinical pathology* **63**, 410-415, doi:10.1136/jcp.2009.071225 (2010).
- 18 Tavassoli, F. A., Devilee, P. Pathology and genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC WHO Classification of Tumours* **4**, 217-257 (2003).
- 19 Silverberg, S. G. Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **13**, 309-327, doi:10.1038/modpathol.3880053 (2000).

Bibliografía

- 20 Zaino, R. J. *et al.* The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* **68**, 2293-2302 (1991).
- 21 Brown, L. Pathology of uterine malignancies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **20**, 433-447, doi:10.1016/j.clon.2008.04.005 (2008).
- 22 Tobon, H. & Watkins, G. J. Secretory adenocarcinoma of the endometrium. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **4**, 328-335 (1985).
- 23 Christopherson, W. M., Alberhasky, R. C. & Connelly, P. J. Carcinoma of the endometrium: I. A clinicopathologic study of clear-cell carcinoma and secretory carcinoma. *Cancer* **49**, 1511-1523 (1982).
- 24 Haibach, H., Oxenhandler, R. W. & Luger, A. M. Ciliated adenocarcinoma of the endometrium. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* **64**, 457-462 (1985).
- 25 Melhem, M. F. & Tobon, H. Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathological review of 18 cases. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **6**, 347-355 (1987).
- 26 Qiu, W. & Mittal, K. Comparison of morphologic and immunohistochemical features of cervical microglandular hyperplasia with low-grade mucinous adenocarcinoma of the endometrium. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **22**, 261-265, doi:10.1097/01.PGP.0000071043.12278.8D (2003).
- 27 Fadare, O. & Zheng, W. Insights into endometrial serous carcinogenesis and progression. *International journal of clinical and experimental pathology* **2**, 411-432 (2009).
- 28 Cameron, R. I. & McCluggage, W. G. Extensive psammomatous calcification of the uterus and cervix associated with a uterine serous carcinoma. *Journal of clinical pathology* **57**, 888-890, doi:10.1136/jcp.2004.017004 (2004).
- 29 Abeler, V. M. & Kjorstad, K. E. Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 97 cases. *Gynecologic oncology* **40**, 207-217 (1991).
- 30 Malpica, A., Tornos, C., Burke, T. W. & Silva, E. G. Low-stage clear-cell carcinoma of the endometrium. *The American journal of surgical pathology* **19**, 769-774 (1995).
- 31 Goodman, A. *et al.* Squamous cell carcinoma of the endometrium: a report of eight cases and a review of the literature. *Gynecologic oncology* **61**, 54-60, doi:10.1006/gyno.1996.0096 (1996).
- 32 Huntsman, D. G., Clement, P. B., Gilks, C. B. & Scully, R. E. Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases. *The American journal of surgical pathology* **18**, 364-375 (1994).
- 33 Seidman, J. D. & Chauhan, S. Evaluation of the relationship between adenosarcoma and carcinosarcoma and a hypothesis of the histogenesis of uterine sarcomas. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **22**, 75-82 (2003).
- 34 Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y. & McCormick, F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer research* **65**, 10669-10673, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2620 (2005).
- 35 Duggan, B. D., Felix, J. C., Muderspach, L. I., Tsao, J. L. & Shibata, D. K. Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer research* **54**, 1604-1607 (1994).

Bibliografía

- 36 Machin, P. *et al.* CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Human pathology* **33**, 206-212 (2002).
- 37 Dutt, A. *et al.* Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8713-8717, doi:10.1073/pnas.0803379105 (2008).
- 38 Kobayashi, K. *et al.* Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type. *Genes, chromosomes & cancer* **14**, 128-132 (1995).
- 39 Guan, B. *et al.* Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **35**, 625-632, doi:10.1097/PAS.0b013e318212782a (2011).
- 40 Urick, M. E. *et al.* PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer research* **71**, 4061-4067, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0549 (2011).
- 41 Cheung, L. W. *et al.* High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer discovery* **1**, 170-185, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0039 (2011).
- 42 Lax, S. F., Kendall, B., Tashiro, H., Slebos, R. J. & 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* **88**, 814-824 (2000).
- 43 Tashiro, H. *et al.* p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *The American journal of pathology* **150**, 177-185 (1997).
- 44 Lax, S. F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **444**, 213-223, doi:10.1007/s00428-003-0947-3 (2004).
- 45 Ignatov, A. *et al.* P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **111**, 365-371, doi:10.1016/j.ygyno.2008.07.037 (2008).
- 46 Yalta, T. *et al.* E-cadherin expression in endometrial malignancies: comparison between endometrioid and non-endometrioid carcinomas. *The Journal of international medical research* **37**, 163-168 (2009).
- 47 Widschwendter, A. *et al.* CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **109**, 163-166, doi:10.1002/ijc.11706 (2004).
- 48 Grushko, T. A. *et al.* An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* **108**, 3-9, doi:10.1016/j.ygyno.2007.09.007 (2008).
- 49 Konecny, G. E. *et al.* HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. *British journal of cancer* **100**, 89-95, doi:10.1038/sj.bjc.6604814 (2009).
- 50 Velasco, A. *et al.* Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **27**, 305-317, doi:10.1097/PGP.0b013e31815daf1a (2008).
- 51 McConechy, M. K. *et al.* Subtype-specific mutation of PPP2R1A in endometrial and ovarian carcinomas. *The Journal of pathology* **223**, 567-573, doi:10.1002/path.2848 (2011).

- 52 Le Gallo, M. *et al.* Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. *Nature genetics* **44**, 1310-1315, doi:10.1038/ng.2455 (2012).
- 53 Vogelstein, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* **319**, 525-532, doi:10.1056/NEJM198809013190901 (1988).
- 54 McConechy, M. K. *et al.* Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *The Journal of pathology* **228**, 20-30, doi:10.1002/path.4056 (2012).
- 55 Meyer, L. A., Broaddus, R. R. & Lu, K. H. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **16**, 14-22 (2009).
- 56 Vasen, H. F. *et al.* Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* **110**, 1020-1027 (1996).
- 57 Dunlop, M. G. *et al.* Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Human molecular genetics* **6**, 105-110 (1997).
- 58 Aarnio, M. *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **81**, 214-218 (1999).
- 59 Hampel, H. *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology* **129**, 415-421, doi:10.1016/j.gastro.2005.05.011 (2005).
- 60 Hendriks, Y. M. *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* **127**, 17-25 (2004).
- 61 Hampel, H. *et al.* Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer research* **66**, 7810-7817, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1114 (2006).
- 62 Watson, P. *et al.* The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **123**, 444-449, doi:10.1002/ijc.23508 (2008).
- 63 Starink, T. M. *et al.* The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clinical genetics* **29**, 222-233 (1986).
- 64 Marsh, D. J. *et al.* Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Human molecular genetics* **7**, 507-515 (1998).
- 65 Eng, C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *Journal of medical genetics* **37**, 828-830 (2000).
- 66 Brownstein, M. H., Wolf, M. & Bikowski, J. B. Cowden's disease: a cutaneous marker of breast cancer. *Cancer* **41**, 2393-2398 (1978).
- 67 Gruber, S. B. & Thompson, W. D. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **5**, 411-417 (1996).
- 68 MacMahon, B. Risk factors for endometrial cancer. *Gynecologic oncology* **2**, 122-129 (1974).
- 69 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947 (1997).

- 70 Steck, P. A. *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics* **15**, 356-362, doi:10.1038/ng0497-356 (1997).
- 71 Lee, J. O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334 (1999).
- 72 Vazquez, F. *et al.* Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48627-48630, doi:10.1074/jbc.C100556200 (2001).
- 73 Torres, J. & Pulido, R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 993-998, doi:10.1074/jbc.M009134200 (2001).
- 74 Das, S., Dixon, J. E. & Cho, W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7491-7496, doi:10.1073/pnas.0932835100 (2003).
- 75 Bigner, S. H., Mark, J., Mahaley, M. S. & Bigner, D. D. Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas. *Hereditas* **101**, 103-113 (1984).
- 76 Huang, C. H., Mandelker, D., Gabelli, S. B. & Amzel, L. M. Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle* **7**, 1151-1156 (2008).
- 77 Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657, doi:10.1126/science.296.5573.1655 (2002).
- 78 Nakamura, N. *et al.* Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Molecular and cellular biology* **20**, 8969-8982 (2000).
- 79 Slomovitz, B. M. & Coleman, R. L. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 5856-5864, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0662 (2012).
- 80 Risinger, J. I., Hayes, A. K., Berchuck, A. & Barrett, J. C. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer research* **57**, 4736-4738 (1997).
- 81 Tashiro, H. *et al.* Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer research* **57**, 3935-3940 (1997).
- 82 Minaguchi, T. *et al.* PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 2636-2642 (2001).
- 83 Shoji, K. *et al.* The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *British journal of cancer* **101**, 145-148, doi:10.1038/sj.bjc.6605109 (2009).
- 84 Rudd, M. L. *et al.* A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 1331-1340, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0540 (2011).
- 85 Salvesen, H. B., Stefansson, I., Kalvenes, M. B., Das, S. & Akslen, L. A. Loss of PTEN expression is associated with metastatic disease in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* **94**, 2185-2191, doi:10.1002/cncr.10434 (2002).

Bibliografía

- 86 Dutt, A. *et al.* Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma. *British journal of cancer* **101**, 1218-1219; author reply 1220-1211, doi:10.1038/sj.bjc.6605301 (2009).
- 87 Konopka, B. *et al.* PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. *Human pathology* **42**, 1710-1719, doi:10.1016/j.humpath.2010.01.030 (2011).
- 88 Shen, W. H. *et al.* Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170, doi:10.1016/j.cell.2006.11.042 (2007).
- 89 Freeman, D. J. *et al.* PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer cell* **3**, 117-130 (2003).
- 90 Maxwell, G. L. *et al.* Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer research* **58**, 2500-2503 (1998).
- 91 Levine, R. L. *et al.* PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer research* **58**, 3254-3258 (1998).
- 92 Hayes, M. P., Douglas, W. & Ellenson, L. H. Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma. *Gynecologic oncology* **113**, 370-373, doi:10.1016/j.ygyno.2008.12.021 (2009).
- 93 Catusus, L., Gallardo, A., Cuatrecasas, M. & Prat, J. Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**, 522-529, doi:10.1038/modpathol.2009.5 (2009).
- 94 Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews. Cancer* **7**, 295-308, doi:10.1038/nrc2109 (2007).
- 95 Boguski, M. S. & McCormick, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654, doi:10.1038/366643a0 (1993).
- 96 Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 127-137, doi:10.1038/35052073 (2001).
- 97 Zhong, H. *et al.* Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer research* **60**, 1541-1545 (2000).
- 98 Matsubara, K. *et al.* Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* **18**, 1303-1312, doi:10.1038/sj.onc.1202425 (1999).
- 99 Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457-467 (1997).
- 100 Brand, T. M. & Wheeler, D. L. KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases* **3**, 34-39, doi:10.4161/sgtp.18751 (2012).
- 101 Kiaris, H. & Spandidos, D. Mutations of ras genes in human tumors (review). *International journal of oncology* **7**, 413-421 (1995).
- 102 Trahey, M. & McCormick, F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542-545 (1987).

- 103 Santarpia, L., Lippman, S. M. & El-Naggar, A. K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* **16**, 103-119, doi:10.1517/14728222.2011.645805 (2012).
- 104 Forbes, S. A. *et al.* The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] Chapter 10*, Unit 10 11, doi:10.1002/0471142905.hg1011s57 (2008).
- 105 Semczuk, A. *et al.* K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients' outcome. *Journal of cancer research and clinical oncology* **124**, 695-700 (1998).
- 106 Cohn, D. E. *et al.* Genotypic and phenotypic progression in endometrial tumorigenesis: determining when defects in DNA mismatch repair and KRAS2 occur. *Genes, chromosomes & cancer* **32**, 295-301 (2001).
- 107 Mutter, G. L., Wada, H., Faquin, W. C. & Enomoto, T. K-ras mutations appear in the premalignant phase of both microsatellite stable and unstable endometrial carcinogenesis. *Molecular pathology : MP* **52**, 257-262 (1999).
- 108 Enomoto, T. *et al.* K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer research* **51**, 5308-5314 (1991).
- 109 Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S. & Matsubara, Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human mutation* **29**, 992-1006, doi:10.1002/humu.20748 (2008).
- 110 Maurer, G., Tarkowski, B. & Baccharini, M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* **30**, 3477-3488, doi:10.1038/onc.2011.160 (2011).
- 111 Crews, C. M., Alessandrini, A. & Erikson, R. L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480 (1992).
- 112 Meloche, S. & Pouyssegur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**, 3227-3239, doi:10.1038/sj.onc.1210414 (2007).
- 113 Mebratu, Y. & Tesfaijzi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* **8**, 1168-1175 (2009).
- 114 Wan, P. T. *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**, 855-867 (2004).
- 115 Poulidakos, P. I. & Rosen, N. Mutant BRAF melanomas--dependence and resistance. *Cancer cell* **19**, 11-15, doi:10.1016/j.ccr.2011.01.008 (2011).
- 116 Xing, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine reviews* **28**, 742-762, doi:10.1210/er.2007-0007 (2007).
- 117 Kawaguchi, M. *et al.* Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer. *International journal of oncology* **34**, 1541-1547 (2009).
- 118 Pappa, K. I. *et al.* Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutation status. *Gynecologic oncology* **100**, 596-600, doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.029 (2006).
- 119 Moreno-Bueno, G., Sanchez-Estevez, C., Palacios, J., Hardisson, D. & Shiozawa, T. Low frequency of BRAF mutations in endometrial and in cervical carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 3865; author reply 3865-3866, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0284 (2006).

Bibliografía

- 120 Feng, Y. Z. *et al.* BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 6133-6138, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2670 (2005).
- 121 Gumbiner, B. M. Signal transduction of beta-catenin. *Current opinion in cell biology* **7**, 634-640 (1995).
- 122 Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Byers, S. W. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* **272**, 24735-24738 (1997).
- 123 Lee, H. C., Kim, M. & Wands, J. R. Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **11**, 1901-1915 (2006).
- 124 Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., Voller, M., Smit, F. P. & Schalken, J. A. The genes for the calcium-dependent cell adhesion molecules P- and E-cadherin are tandemly arranged in the human genome. *Biochemical and biophysical research communications* **203**, 1291-1294 (1994).
- 125 Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455 (1991).
- 126 van Roy, F. & Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 3756-3788, doi:10.1007/s00018-008-8281-1 (2008).
- 127 Stemmler, M. P. Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems* **4**, 835-850, doi:10.1039/b719215k (2008).
- 128 Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* **7**, 619-627 (1995).
- 129 Ozawa, M., Ringwald, M. & Kemler, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4246-4250 (1990).
- 130 Takeichi, M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annual review of biochemistry* **59**, 237-252, doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.001321 (1990).
- 131 Gumbiner, B. M. & McCrea, P. D. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *Journal of cell science. Supplement* **17**, 155-158 (1993).
- 132 Yap, A. S., Niessen, C. M. & Gumbiner, B. M. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *The Journal of cell biology* **141**, 779-789 (1998).
- 133 Thoreson, M. A. *et al.* Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *The Journal of cell biology* **148**, 189-202 (2000).
- 134 Kobiela, A. & Fuchs, E. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 614-625, doi:10.1038/nrm1433 (2004).
- 135 Paredes, J. *et al.* Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1826**, 297-311, doi:10.1016/j.bbcan.2012.05.002 (2012).
- 136 David, J. M. & Rajasekaran, A. K. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer research* **72**, 2917-2923, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3498 (2012).
- 137 Shimoyama, Y. *et al.* Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer research* **49**, 2128-2133 (1989).

- 138 Holcomb, K. *et al.* E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium. *Obstetrics and gynecology* **100**, 1290-1295 (2002).
- 139 Moreno-Bueno, G. *et al.* Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *The Journal of pathology* **199**, 471-478, doi:10.1002/path.1310 (2003).
- 140 Risinger, J. I., Berchuck, A., Kohler, M. F. & Boyd, J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature genetics* **7**, 98-102, doi:10.1038/ng0594-98 (1994).
- 141 Park, J. H. *et al.* Hypermethylation of E-cadherin in endometrial carcinoma. *Journal of gynecologic oncology* **19**, 241-245, doi:10.3802/jgo.2008.19.4.241 (2008).
- 142 Yi, T. Z. *et al.* Prognostic value of E-cadherin expression and CDH1 promoter methylation in patients with endometrial carcinoma. *Cancer investigation* **29**, 86-92, doi:10.3109/07357907.2010.512603 (2011).
- 143 Schlosshauer, P. W., Ellenson, L. H. & Soslow, R. A. Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **15**, 1032-1037, doi:10.1097/01.MP.0000028573.34289.04 (2002).
- 144 Brachtel, E. F. *et al.* Distinct molecular alterations in complex endometrial hyperplasia (CEH) with and without immature squamous metaplasia (squamous morules). *The American journal of surgical pathology* **29**, 1322-1329 (2005).
- 145 Norimatsu, Y. *et al.* Immunohistochemical expression of PTEN and beta-catenin for endometrial intraepithelial neoplasia in Japanese women. *Annals of diagnostic pathology* **11**, 103-108, doi:10.1016/j.anndiagpath.2006.06.009 (2007).
- 146 Miller, C. *et al.* Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* **319**, 783-784, doi:10.1038/319783a0 (1986).
- 147 May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-7636, doi:10.1038/sj.onc.1203285 (1999).
- 148 Bode, A. M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* **4**, 793-805, doi:10.1038/nrc1455 (2004).
- 149 Murphy, M. *et al.* Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes & development* **13**, 2490-2501 (1999).
- 150 Soussi, T., Caron de Fromentel, C. & May, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**, 945-952 (1990).
- 151 Soussi, T. & May, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *Journal of molecular biology* **260**, 623-637, doi:10.1006/jmbi.1996.0425 (1996).
- 152 Romer, L., Klein, C., Dehner, A., Kessler, H. & Buchner, J. p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 6440-6460, doi:10.1002/anie.200600611 (2006).
- 153 Kruse, J. P. & Gu, W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell* **133**, 930-930 e931, doi:10.1016/j.cell.2008.05.020 (2008).
- 154 Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. & Vousden, K. H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **19**, 1751-1758 (1999).
- 155 Geyer, R. K., Yu, Z. K. & Maki, C. G. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nature cell biology* **2**, 569-573, doi:10.1038/35023507 (2000).

- 156 Jesenberger, V. & Jentsch, S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 112-121, doi:10.1038/nrm731 (2002).
- 157 Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303, doi:10.1038/387299a0 (1997).
- 158 Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310, doi:10.1038/35042675 (2000).
- 159 Dornan, D. *et al.* COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer research* **64**, 7226-7230, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2601 (2004).
- 160 Leng, R. P. *et al.* Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**, 779-791 (2003).
- 161 Chen, D. *et al.* ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* **121**, 1071-1083, doi:10.1016/j.cell.2005.03.037 (2005).
- 162 Blattner, C. Regulation of p53: the next generation. *Cell Cycle* **7**, 3149-3153 (2008).
- 163 Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 402-412, doi:10.1038/nrm2395 (2008).
- 164 Friedman, P. N., Chen, X., Bargonetti, J. & Prives, C. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3319-3323 (1993).
- 165 Moll, U. M. & Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 1001-1008 (2003).
- 166 Taylor, W. R. *et al.* Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Molecular biology of the cell* **10**, 3607-3622 (1999).
- 167 Sionov, R. V. & Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145-6157, doi:10.1038/sj.onc.1203130 (1999).
- 168 Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816 (1993).
- 169 Classon, M. & Harlow, E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 910-917, doi:10.1038/nrc950 (2002).
- 170 Chan, T. A., Hwang, P. M., Hermeking, H., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes & development* **14**, 1584-1588 (2000).
- 171 Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer* **2**, 594-604, doi:10.1038/nrc864 (2002).
- 172 Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D. & Deppert, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current opinion in cell biology* **17**, 631-636, doi:10.1016/j.ceb.2005.09.007 (2005).
- 173 Wu, G. S. *et al.* KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics* **17**, 141-143, doi:10.1038/ng1097-141 (1997).
- 174 Buckbinder, L. *et al.* Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**, 646-649, doi:10.1038/377646a0 (1995).

Bibliografía

- 175 Fuster, J. J., Sanz-Gonzalez, S. M., Moll, U. M. & Andres, V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends in molecular medicine* **13**, 192-199, doi:10.1016/j.molmed.2007.03.002 (2007).
- 176 Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. & Moll, U. M. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO journal* **26**, 923-934, doi:10.1038/sj.emboj.7601560 (2007).
- 177 Mihara, M. *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* **11**, 577-590 (2003).
- 178 Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E. & George, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* **6**, 443-450, doi:10.1038/ncb1123 (2004).
- 179 Wahl, G. M., Linke, S. P., Paulson, T. G. & Huang, L. C. Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer surveys* **29**, 183-219 (1997).
- 180 Tanaka, H. *et al.* A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-49, doi:10.1038/35003506 (2000).
- 181 el-Deiry, W. S. Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in cancer biology* **8**, 345-357 (1998).
- 182 Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B. & Murphy, M. E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**, 6507-6521, doi:10.1038/onc.2008.315 (2008).
- 183 Chene, P. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *Journal of molecular biology* **281**, 205-209, doi:10.1006/jmbi.1998.1897 (1998).
- 184 Moll, U. M., Chalas, E., Auguste, M., Meaney, D. & Chumas, J. Uterine papillary serous carcinoma evolves via a p53-driven pathway. *Human pathology* **27**, 1295-1300 (1996).
- 185 Ambros, R. A. *et al.* MDM2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **9**, 1165-1169 (1996).
- 186 Kovalev, S. *et al.* Loss of p53 function in uterine papillary serous carcinoma. *Human pathology* **29**, 613-619 (1998).
- 187 Jia, L. *et al.* Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 2263-2269, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4837 (2008).
- 188 Zhang, X. *et al.* Molecular identification of "latent precancers" for endometrial serous carcinoma in benign-appearing endometrium. *The American journal of pathology* **174**, 2000-2006, doi:10.2353/ajpath.2009.081085 (2009).
- 189 Sherman, M. E., Bur, M. E. & Kurman, R. J. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human pathology* **26**, 1268-1274 (1995).
- 190 Kohler, M. F. *et al.* Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer research* **52**, 1622-1627 (1992).
- 191 Sakuragi, N. *et al.* Functional analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **116**, 514-519, doi:10.1002/ijc.21097 (2005).

Bibliografía

- 192 An, H. J., Logani, S., Isacson, C. & Ellenson, L. H. Molecular characterization of uterine clear cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **17**, 530-537, doi:10.1038/modpathol.3800057 (2004).
- 193 Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707, doi:10.1038/366704a0 (1993).
- 194 Serrano, M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental cell research* **237**, 7-13, doi:10.1006/excr.1997.3824 (1997).
- 195 Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677 (1996).
- 196 Michalides, R. J. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. *Journal of clinical pathology* **52**, 555-568 (1999).
- 197 Tao, W. & Levine, A. J. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6937-6941 (1999).
- 198 Perez-Sayans, M. *et al.* p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? *Cancer letters* **306**, 134-141, doi:10.1016/j.canlet.2011.02.039 (2011).
- 199 Okamoto, A. *et al.* p16INK4 mutations and altered expression in human tumors and cell lines. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **59**, 49-57 (1994).
- 200 Cairns, P. *et al.* Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nature genetics* **11**, 210-212, doi:10.1038/ng1095-210 (1995).
- 201 Caca, K. *et al.* Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **97**, 481-488 (2002).
- 202 Salvesen, H. B., Das, S. & Akslen, L. A. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 153-159 (2000).
- 203 Semczuk, A. *et al.* p16INK4A alterations are accompanied by aberrant protein immunostaining in endometrial carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology* **129**, 589-596, doi:10.1007/s00432-003-0482-2 (2003).
- 204 Wong, Y. F. *et al.* Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. *Cancer letters* **136**, 231-235 (1999).
- 205 Nakashima, R. *et al.* Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *British journal of cancer* **80**, 458-467, doi:10.1038/sj.bjc.6690379 (1999).
- 206 Hatta, Y. *et al.* Alterations of the p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies. *The Journal of urology* **154**, 1954-1957 (1995).
- 207 Tsuda, H., Yamamoto, K., Inoue, T., Uchiyama, I. & Umesaki, N. The role of p16-cyclin d/CDK-pRb pathway in the tumorigenesis of endometrioid-type endometrial carcinoma. *British journal of cancer* **82**, 675-682, doi:10.1054/bjoc.1999.0980 (2000).
- 208 Shi, Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-484, doi:10.1016/j.cell.2009.10.006 (2009).
- 209 Cho, U. S. & Xu, W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **445**, 53-57, doi:10.1038/nature05351 (2007).

- 210 Shih Ie, M. & Wang, T. L. Mutation of PPP2R1A: a new clue in unveiling the pathogenesis of uterine serous carcinoma. *The Journal of pathology* **224**, 1-4, doi:10.1002/path.2884 (2011).
- 211 Nagendra, D. C., Burke, J., 3rd, Maxwell, G. L. & Risinger, J. I. PPP2R1A mutations are common in the serous type of endometrial cancer. *Molecular carcinogenesis* **51**, 826-831, doi:10.1002/mc.20850 (2012).
- 212 Hemmings, B. A. *et al.* alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* **29**, 3166-3173 (1990).
- 213 Mumby, M. C. & Walter, G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological reviews* **73**, 673-699 (1993).
- 214 Zhou, J., Pham, H. T., Ruediger, R. & Walter, G. Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *The Biochemical journal* **369**, 387-398, doi:10.1042/BJ20021244 (2003).
- 215 Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. & Barford, D. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**, 99-110 (1999).
- 216 Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M. & Walter, G. Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *Journal of virology* **68**, 123-129 (1994).
- 217 Ruediger, R., Fields, K. & Walter, G. Binding specificity of protein phosphatase 2A core enzyme for regulatory B subunits and T antigens. *Journal of virology* **73**, 839-842 (1999).
- 218 Xing, Y. *et al.* Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* **127**, 341-353, doi:10.1016/j.cell.2006.09.025 (2006).
- 219 De Wulf, P., Montani, F. & Visintin, R. Protein phosphatases take the mitotic stage. *Current opinion in cell biology* **21**, 806-815, doi:10.1016/j.ceb.2009.08.003 (2009).
- 220 Feng, J. *et al.* Protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of replication protein A is required for the repair of DNA breaks induced by replication stress. *Molecular and cellular biology* **29**, 5696-5709, doi:10.1128/MCB.00191-09 (2009).
- 221 Heikkinen, P. T. *et al.* Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. *The Journal of biological chemistry* **285**, 3740-3749, doi:10.1074/jbc.M109.042978 (2010).
- 222 Sablina, A. A., Hector, M., Colpaert, N. & Hahn, W. C. Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. *Cancer research* **70**, 10474-10484, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2855 (2010).
- 223 Eichhorn, P. J., Creighton, M. P. & Bernards, R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1795**, 1-15, doi:10.1016/j.bbcan.2008.05.005 (2009).
- 224 Chen, W., Arroyo, J. D., Timmons, J. C., Possemato, R. & Hahn, W. C. Cancer-associated PP2A Aalpha subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity. *Cancer research* **65**, 8183-8192, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1103 (2005).
- 225 Calin, G. A. *et al.* Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene* **19**, 1191-1195, doi:10.1038/sj.onc.1203389 (2000).
- 226 Wang, S. S. *et al.* Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science* **282**, 284-287 (1998).

- 227 Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. & Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **8**, 1197-1206 (1997).
- 228 Cohen, S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* **51**, 1787-1791 (1983).
- 229 Yarden, Y. & Schlessinger, J. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**, 1443-1451 (1987).
- 230 Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* **265**, 7709-7712 (1990).
- 231 Marquardt, H. *et al.* Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 4684-4688 (1983).
- 232 Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6528-6532 (1988).
- 233 Shing, Y. *et al.* Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* **259**, 1604-1607 (1993).
- 234 Garcia de Palazzo, I. E. *et al.* Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer research* **53**, 3217-3220 (1993).
- 235 Margolis, B. *et al.* The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *The EMBO journal* **9**, 4375-4380 (1990).
- 236 Anderson, D. *et al.* Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* **250**, 979-982 (1990).
- 237 Lynch, T. J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* **350**, 2129-2139, doi:10.1056/NEJMoa040938 (2004).
- 238 Pao, W. *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13306-13311, doi:10.1073/pnas.0405220101 (2004).
- 239 Paez, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497-1500, doi:10.1126/science.1099314 (2004).
- 240 Ishii, S. *et al.* Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 4920-4924 (1985).
- 241 Albitar, L. *et al.* EGFR isoforms and gene regulation in human endometrial cancer cells. *Molecular cancer* **9**, 166, doi:10.1186/1476-4598-9-166 (2010).
- 242 Foster, J. M. *et al.* Clinical implications of novel activating EGFR mutations in malignant peritoneal mesothelioma. *World journal of surgical oncology* **8**, 88, doi:10.1186/1477-7819-8-88 (2010).
- 243 Karamurzin, Y. & Rutgers, J. K. DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **28**, 239-255, doi:10.1097/PGP.0b013e31818d8fe6 (2009).

Bibliografía

- 244 Jiricny, J. & Nystrom-Lahti, M. Mismatch repair defects in cancer. *Current opinion in genetics & development* **10**, 157-161 (2000).
- 245 Shah, S. N., Hile, S. E. & Eckert, K. A. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer research* **70**, 431-435, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3049 (2010).
- 246 Schofield, M. J. & Hsieh, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual review of microbiology* **57**, 579-608, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090847 (2003).
- 247 Modrich, P. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 24727-24730 (1997).
- 248 Karran, P. *Human Mismatch Repair: Defects and Predisposition to Cancer*. (Imperial Cancer Research Fund, 2001).
- 249 Peltomaki, P. & Vasen, H. F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **113**, 1146-1158 (1997).
- 250 Wijnen, J. *et al.* Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nature genetics* **23**, 142-144, doi:10.1038/13773 (1999).
- 251 Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. & Modrich, P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chemical reviews* **106**, 302-323, doi:10.1021/cr0404794 (2006).
- 252 Chao, E. C. & Lipkin, S. M. Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic acids research* **34**, 840-852, doi:10.1093/nar/gkj489 (2006).
- 253 Hickman, M. J. & Samson, L. D. Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Molecular cell* **14**, 105-116 (2004).
- 254 de la Chapelle, A. Microsatellite instability. *The New England journal of medicine* **349**, 209-210, doi:10.1056/NEJMp038099 (2003).
- 255 Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. Human DNA repair genes. *Science* **291**, 1284-1289, doi:10.1126/science.1056154 (2001).
- 256 Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558-561, doi:10.1038/363558a0 (1993).
- 257 Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* **58**, 5248-5257 (1998).
- 258 An, C. *et al.* Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 656-663 (2005).
- 259 Catusus, L., Machin, P., Matias-Guiu, X. & Prat, J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Human pathology* **29**, 1160-1164 (1998).
- 260 Duggan, B. D. *et al.* Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 1216-1221 (1994).

- 261 Burks, R. T., Kessis, T. D., Cho, K. R. & Hedrick, L. Microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Oncogene* **9**, 1163-1166 (1994).
- 262 Gurin, C. C., Federici, M. G., Kang, L. & Boyd, J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer research* **59**, 462-466 (1999).
- 263 Esteller, M. *et al.* hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *The American journal of pathology* **155**, 1767-1772, doi:10.1016/S0002-9440(10)65492-2 (1999).
- 264 Esteller, M., Levine, R., Baylin, S. B., Ellenson, L. H. & Herman, J. G. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* **17**, 2413-2417, doi:10.1038/sj.onc.1202178 (1998).
- 265 Simpkins, S. B. *et al.* MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Human molecular genetics* **8**, 661-666 (1999).
- 266 Salvesen, H. B. *et al.* Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 3607-3613 (2000).
- 267 Berends, M. J. *et al.* MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **92**, 398-403 (2001).
- 268 Hardisson, D. *et al.* Tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair (hMLH1 and hMSH2 genes) in endometrial carcinoma and atypical endometrial hyperplasia: relationship with microsatellite instability. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **16**, 1148-1158, doi:10.1097/01.MP.0000095646.70007.6A (2003).
- 269 Goodfellow, P. J. *et al.* Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5908-5913, doi:10.1073/pnas.1030231100 (2003).
- 270 Swisher, E. M. *et al.* Analysis of MSH3 in endometrial cancers with defective DNA mismatch repair. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **5**, 210-216 (1998).
- 271 Kawaguchi, M. *et al.* Analysis of candidate target genes for mononucleotide repeat mutation in microsatellite instability-high (MSI-H) endometrial cancer. *International journal of oncology* **35**, 977-982 (2009).
- 272 Risinger, J. I. *et al.* Gene expression profiling of microsatellite unstable and microsatellite stable endometrial cancers indicates distinct pathways of aberrant signaling. *Cancer research* **65**, 5031-5037, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0850 (2005).
- 273 Wang, G. G., Allis, C. D. & Chi, P. Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in molecular medicine* **13**, 373-380, doi:10.1016/j.molmed.2007.07.004 (2007).
- 274 Jones, P. A. & Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692, doi:10.1016/j.cell.2007.01.029 (2007).
- 275 Brero, A., Leonhardt, H. & Cardoso, M. C. Replication and translation of epigenetic information. *Current topics in microbiology and immunology* **301**, 21-44 (2006).
- 276 Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**, 6-21, doi:10.1101/gad.947102 (2002).

- 277 Bestor, T. H. The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Foundation symposium* **214**, 187-195; discussion 195-189, 228-132 (1998).
- 278 Balch, C., Matei, D. E., Huang, T. H. & Nephew, K. P. Role of epigenomics in ovarian and endometrial cancers. *Epigenomics* **2**, 419-447, doi:10.2217/epi.10.19 (2010).
- 279 Song, F. *et al.* Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3336-3341, doi:10.1073/pnas.0408436102 (2005).
- 280 Eckhardt, F. *et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature genetics* **38**, 1378-1385, doi:10.1038/ng1909 (2006).
- 281 Rakyan, V. K. *et al.* An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome research* **18**, 1518-1529, doi:10.1101/gr.077479.108 (2008).
- 282 Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics* **3**, 415-428, doi:10.1038/nrg816 (2002).
- 283 Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27-36, doi:10.1093/carcin/bgp220 (2010).
- 284 Nishigaki, M. *et al.* Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer research* **65**, 2115-2124, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3340 (2005).
- 285 Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R. & Eden, A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* **27**, 404-408, doi:10.1038/sj.onc.1210631 (2008).
- 286 Furlan, D. *et al.* The high frequency of de novo promoter methylation in synchronous primary endometrial and ovarian carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 3329-3336, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2679 (2006).
- 287 Salvesen, H. B. *et al.* PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **91**, 22-26 (2001).
- 288 Risinger, J. I., Maxwell, G. L., Berchuck, A. & Barrett, J. C. Promoter hypermethylation as an epigenetic component in Type I and Type II endometrial cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* **983**, 208-212 (2003).
- 289 Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Ahuja, N. & Issa, J. P. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 710-715 (2000).
- 290 Strathdee, G. *et al.* Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *The American journal of pathology* **158**, 1121-1127, doi:10.1016/S0002-9440(10)64059-X (2001).
- 291 Okamoto, A. *et al.* Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11045-11049 (1994).
- 292 Issa, J. P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature reviews. Cancer* **4**, 988-993, doi:10.1038/nrc1507 (2004).
- 293 Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705, doi:10.1016/j.cell.2007.02.005 (2007).

- 294 Lindner, H. H. Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis* **29**, 2516-2532, doi:10.1002/elps.200800094 (2008).
- 295 Kornberg, R. D. & Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294 (1999).
- 296 Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current opinion in genetics & development* **15**, 490-495, doi:10.1016/j.gde.2005.08.002 (2005).
- 297 Hildmann, C., Riestler, D. & Schwienhorst, A. Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Applied microbiology and biotechnology* **75**, 487-497, doi:10.1007/s00253-007-0911-2 (2007).
- 298 Thiagalingam, S. *et al.* Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* **983**, 84-100 (2003).
- 299 Gray, S. G. & Ekstrom, T. J. The human histone deacetylase family. *Experimental cell research* **262**, 75-83, doi:10.1006/excr.2000.5080 (2001).
- 300 Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 435-459 (2000).
- 301 Wolf, D., Rodova, M., Miska, E. A., Calvet, J. P. & Kouzarides, T. Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *The Journal of biological chemistry* **277**, 25562-25567, doi:10.1074/jbc.M201196200 (2002).
- 302 Gluzak, M. A. & Seto, E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **26**, 5420-5432, doi:10.1038/sj.onc.1210610 (2007).
- 303 Ropero, S. & Esteller, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology* **1**, 19-25, doi:10.1016/j.molonc.2007.01.001 (2007).
- 304 Yang, X. J. & Gregoire, S. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Molecular and cellular biology* **25**, 2873-2884, doi:10.1128/MCB.25.8.2873-2884.2005 (2005).
- 305 Yang, X. J. & Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 206-218, doi:10.1038/nrm2346 (2008).
- 306 Choi, J. H. *et al.* Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**, 1300-1304 (2001).
- 307 Kawai, H., Li, H., Avraham, S., Jiang, S. & Avraham, H. K. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **107**, 353-358, doi:10.1002/ijc.11403 (2003).
- 308 Zhu, P. *et al.* Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer cell* **5**, 455-463 (2004).
- 309 Ozdag, H. *et al.* Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC genomics* **7**, 90, doi:10.1186/1471-2164-7-90 (2006).
- 310 Khabele, D. *et al.* Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy. *Cancer biology & therapy* **6**, 795-801 (2007).
- 311 Weichert, W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer letters* **280**, 168-176, doi:10.1016/j.canlet.2008.10.047 (2009).

- 312 Krusche, C. A. *et al.* Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum Reprod* **22**, 2956-2966, doi:10.1093/humrep/dem241 (2007).
- 313 Weichert, W. *et al.* Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 1669-1677, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0990 (2008).
- 314 Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A. & Brown, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-852 (2000).
- 315 Liu, X. F. & Bagchi, M. K. Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**, 15050-15058, doi:10.1074/jbc.M311932200 (2004).
- 316 Singh, B. N. *et al.* Preclinical studies on histone deacetylase inhibitors as therapeutic reagents for endometrial and ovarian cancers. *Future Oncol* **7**, 1415-1428, doi:10.2217/fon.11.124 (2011).
- 317 Campos, E. I. & Reinberg, D. Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics* **43**, 559-599, doi:10.1146/annurev.genet.032608.103928 (2009).
- 318 Cervoni, N. & Szyf, M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 40778-40787, doi:10.1074/jbc.M103921200 (2001).
- 319 Maass, N. *et al.* Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **297**, 125-128 (2002).
- 320 P, L. *Basic Principles of Genetics*. (2009).
- 321 Jiang, C. & Pugh, B. F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature reviews. Genetics* **10**, 161-172, doi:10.1038/nrg2522 (2009).
- 322 Shivaswamy, S. *et al.* Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS biology* **6**, e65, doi:10.1371/journal.pbio.0060065 (2008).
- 323 Hargreaves, D. C. & Crabtree, G. R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell research* **21**, 396-420, doi:10.1038/cr.2011.32 (2011).
- 324 Saha, A., Wittmeyer, J. & Cairns, B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 437-447, doi:10.1038/nrm1945 (2006).
- 325 Wang, G. G., Allis, C. D. & Chi, P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends in molecular medicine* **13**, 363-372, doi:10.1016/j.molmed.2007.07.003 (2007).
- 326 Wang, X. *et al.* Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *The Biochemical journal* **383**, 319-325, doi:10.1042/BJ20040524 (2004).
- 327 Guan, B., Gao, M., Wu, C. H., Wang, T. L. & Shih Ie, M. Functional analysis of in-frame indel ARID1A mutations reveals new regulatory mechanisms of its tumor suppressor functions. *Neoplasia* **14**, 986-993 (2012).
- 328 Van Rechem, C., Boulay, G. & Leprince, D. HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochemical and biophysical research communications* **385**, 586-590, doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.115 (2009).

- 329 Gao, X. *et al.* ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6656-6661, doi:10.1073/pnas.0801802105 (2008).
- 330 Ho, L. & Crabtree, G. R. Chromatin remodelling during development. *Nature* **463**, 474-484, doi:10.1038/nature08911 (2010).
- 331 Reisman, D., Glaros, S. & Thompson, E. A. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* **28**, 1653-1668, doi:10.1038/onc.2009.4 (2009).
- 332 Jones, S. *et al.* Somatic mutations in the chromatin remodeling gene ARID1A occur in several tumor types. *Human mutation* **33**, 100-103, doi:10.1002/humu.21633 (2012).
- 333 Jones, S. *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* **330**, 228-231, doi:10.1126/science.1196333 (2010).
- 334 Wiegand, K. C. *et al.* ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England journal of medicine* **363**, 1532-1543, doi:10.1056/NEJMoa1008433 (2010).
- 335 Gui, Y. *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics* **43**, 875-878, doi:10.1038/ng.907 (2011).
- 336 Ayhan, A. *et al.* Loss of ARID1A expression is an early molecular event in tumor progression from ovarian endometriotic cyst to clear cell and endometrioid carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **22**, 1310-1315, doi:10.1097/IGC.0b013e31826b5dcc (2012).
- 337 Yamamoto, S., Tsuda, H., Takano, M., Tamai, S. & Matsubara, O. Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **25**, 615-624, doi:10.1038/modpathol.2011.189 (2012).
- 338 Rampino, N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967-969 (1997).
- 339 Markowitz, S. *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**, 1336-1338 (1995).
- 340 Wiegand, K. C. *et al.* Loss of BAF250a (ARID1A) is frequent in high-grade endometrial carcinomas. *The Journal of pathology* **224**, 328-333, doi:10.1002/path.2911 (2011).
- 341 Shain, A. H. *et al.* Convergent structural alterations define SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeler as a central tumor suppressive complex in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E252-259, doi:10.1073/pnas.1114817109 (2012).
- 342 Zhang, X. *et al.* Promoter Hypermethylation of ARID1A Gene Is Responsible for Its Low mRNA Expression in Many Invasive Breast Cancers. *PloS one* **8**, e53931, doi:10.1371/journal.pone.0053931 (2013).
- 343 Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573, doi:10.1038/350569a0 (1991).
- 344 Rodier, F., Kim, S. H., Nijjar, T., Yaswen, P. & Campisi, J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 977-990, doi:10.1016/j.biocel.2004.10.012 (2005).
- 345 Berg, J. M., Stryer, Tymoczko. *Biochemistry. Stryer. Sixth Edition edn*, (2007).

- 346 Baumann, P. & Cech, T. R. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science (New York, N.Y)* **292**, 1171-1175 (2001).
- 347 Gasser, S. M. A sense of the end. *Science (New York, N.Y)* **288**, 1377-1379 (2000).
- 348 Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514 (1999).
- 349 O'Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 171-181, doi:10.1038/nrm2848 (2010).
- 350 Martin, G. M., Sprague, C. A. & Epstein, C. J. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **23**, 86-92 (1970).
- 351 Hayflick, L. Human cells and aging. *Scientific American* **218**, 32-37 (1968).
- 352 Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015 (1994).
- 353 Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C. & Hoffman, A. R. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer research* **58**, 4168-4172 (1998).
- 354 Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Tanaka, M. & Inoue, M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **80**, 60-63 (1999).
- 355 Ueda, M. *et al.* Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer research* **57**, 370-374 (1997).
- 356 Norrback, K. F. & Roos, G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. *Eur J Cancer* **33**, 774-780, doi:10.1016/S0959-8049(97)00059-2 (1997).
- 357 Weng, N., Levine, B. L., June, C. H. & Hodes, R. J. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol* **158**, 3215-3220 (1997).
- 358 Igarashi, H. & Sakaguchi, N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* **89**, 1299-1307 (1997).
- 359 Blackburn, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53-56 (2000).
- 360 Shampay, J. & Blackburn, E. H. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 534-538 (1988).
- 361 Blackburn, E. H. The end of the (DNA) line. *Nature structural biology* **7**, 847-850, doi:10.1038/79594 (2000).
- 362 Cohen, S. B. *et al.* Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**, 1850-1853, doi:10.1126/science.1138596 (2007).
- 363 Wright, W. E. & Shay, J. W. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends in cell biology* **5**, 293-297 (1995).

- 364 Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Ichikawa, T. & Matsuura, Y. Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Japanese journal of cancer research : Gann* **83**, 159-164 (1992).
- 365 Sommerfeld, H. J. *et al.* Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer research* **56**, 218-222 (1996).
- 366 Broberg, K., Bjork, J., Paulsson, K., Hoglund, M. & Albin, M. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis* **26**, 1263-1271, doi:10.1093/carcin/bgi063 (2005).
- 367 Wu, X. *et al.* Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 1211-1218 (2003).
- 368 Jang, J. S. *et al.* Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer science* **99**, 1385-1389, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00831.x (2008).
- 369 Hou, L. *et al.* Telomere length in peripheral leukocyte DNA and gastric cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **18**, 3103-3109, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0347 (2009).
- 370 Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. & Bacchetti, S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* **85**, 2315-2320 (1995).
- 371 Hiyama, E. *et al.* Telomerase activity in human breast tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **88**, 116-122 (1996).
- 372 Wang, S. J. *et al.* The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic cancers. *Gynecologic oncology* **84**, 81-84, doi:10.1006/gyno.2001.6483 (2002).
- 373 Martinez-Delgado, B. *et al.* Shorter telomere length is associated with increased ovarian cancer risk in both familial and sporadic cases. *Journal of medical genetics* **49**, 341-344, doi:10.1136/jmedgenet-2012-100807 (2012).
- 374 Núñez Lozano, M. *Caracterización de alteraciones moleculares en tumores de endometrio* Tesis Doctoral thesis, Universidad de Salamanca, (2010).
- 375 Sambrook, J., *et al.* *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
- 376 Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159, doi:10.1006/abio.1987.9999 (1987).
- 377 Kuhn, R. M., Haussler, D. & Kent, W. J. The UCSC genome browser and associated tools. *Briefings in bioinformatics* **14**, 144-161, doi:10.1093/bib/bbs038 (2013).
- 378 Stitzel, N. O. *et al.* Structural location of disease-associated single-nucleotide polymorphisms. *Journal of molecular biology* **327**, 1021-1030 (2003).
- 379 Nakken, S., Alseth, I. & Rognes, T. Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Neuroscience* **145**, 1273-1279, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.09.004 (2007).
- 380 Ng, P. C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research* **11**, 863-874, doi:10.1101/gr.176601 (2001).
- 381 Ferrer-Costa, C. *et al.* PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* **21**, 3176-3178, doi:10.1093/bioinformatics/bti486 (2005).

- 382 Thomas, P. D. *et al.* PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research* **13**, 2129-2141, doi:10.1101/gr.772403 (2003).
- 383 Thomas, P. D. & Kejariwal, A. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15398-15403, doi:10.1073/pnas.0404380101 (2004).
- 384 Brunham, L. R. *et al.* Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS genetics* **1**, e83, doi:10.1371/journal.pgen.0010083 (2005).
- 385 Mathe, E. *et al.* Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic acids research* **34**, 1317-1325, doi:10.1093/nar/gkj518 (2006).
- 386 Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. & Sander, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research* **36**, D149-153, doi:10.1093/nar/gkm995 (2008).
- 387 Smith, P. J. *et al.* An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Human molecular genetics* **15**, 2490-2508, doi:10.1093/hmg/ddl171 (2006).
- 388 Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research* **31**, 3568-3571 (2003).
- 389 Heinemeyer, T. *et al.* Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic acids research* **26**, 362-367 (1998).
- 390 Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology* **292**, 195-202, doi:10.1006/jmbi.1999.3091 (1999).
- 391 Oda, S., Oki, E., Maehara, Y. & Sugimachi, K. Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucleic acids research* **25**, 3415-3420 (1997).
- 392 Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* **30**, e57 (2002).
- 393 Jeuken, J. W. *et al.* MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **87**, 1055-1065, doi:10.1038/labinvest.3700664 (2007).
- 394 Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research* **30**, e47 (2002).
- 395 Matsubara, Y. *et al.* Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochemical and biophysical research communications* **341**, 128-131, doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.163 (2006).
- 396 Njajou, O. T. *et al.* A common variant in the telomerase RNA component is associated with short telomere length. *PLoS one* **5**, e13048, doi:10.1371/journal.pone.0013048 (2010).
- 397 Vicente Villardón, J. Multbiplot: a packaged for multivariate analysis using Biplots. Spain patent (2010).
- 398 Fujii, G. H., Morimoto, A. M., Berson, A. E. & Bolen, J. B. Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudogene, psiPTEN. *Oncogene* **18**, 1765-1769, doi:10.1038/sj.onc.1202492 (1999).

- 399 Whibley, C., Pharoah, P. D. & Hollstein, M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews. Cancer* **9**, 95-107, doi:10.1038/nrc2584 (2009).
- 400 Yang, G., Rajadurai, A. & Tsao, H. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *The Journal of investigative dermatology* **125**, 1242-1251, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23931.x (2005).
- 401 Debniak, T. *et al.* CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer research* **65**, 835-839 (2005).
- 402 Hromas, R. *et al.* A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* **266**, 14183-14187 (1991).
- 403 Chuang, J. Y. *et al.* Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. *Molecular biology of the cell* **19**, 1139-1151, doi:10.1091/mbc.E07-09-0881 (2008).
- 404 Levanon, D. *et al.* AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* **23**, 425-432, doi:10.1006/geno.1994.1519 (1994).
- 405 Kim, J. *et al.* Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**, 345-355 (1999).
- 406 Garcia-Dios, D. A. *et al.* High-throughput interrogation of PIK3CA, PTEN, KRAS, FBXW7 and TP53 mutations in primary endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **128**, 327-334, doi:10.1016/j.ygyno.2012.11.037 (2013).
- 407 Vanhaesebroeck, B. *et al.* P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4330-4335 (1997).
- 408 Pallares, J. *et al.* Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **18**, 719-727, doi:10.1038/modpathol.3800347 (2005).
- 409 Kim, E. A. *et al.* Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) targets beta-catenin for phosphorylation and proteasomal degradation. *Biochemical and biophysical research communications* **394**, 966-971, doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.099 (2010).
- 410 Hagen, T. & Vidal-Puig, A. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochemical and biophysical research communications* **294**, 324-328, doi:10.1016/S0006-291X(02)00485-0 (2002).
- 411 Zhang, W. *et al.* Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **1**, 635-647 (2006).
- 412 Ropero, S. *et al.* A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nature genetics* **38**, 566-569, doi:10.1038/ng1773 (2006).
- 413 Shih Ie, M. *et al.* Somatic mutations of PPP2R1A in ovarian and uterine carcinomas. *The American journal of pathology* **178**, 1442-1447, doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.009 (2011).
- 414 Wu, J. I., Lessard, J. & Crabtree, G. R. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* **136**, 200-206, doi:10.1016/j.cell.2009.01.009 (2009).
- 415 Nie, Z. *et al.* A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Molecular and cellular biology* **20**, 8879-8888 (2000).

- 416 Shiau, A. K. *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**, 927-937 (1998).
- 417 Liang, H. *et al.* Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer. *Genome research* **22**, 2120-2129, doi:10.1101/gr.137596.112 (2012).
- 418 Kandoth, C. *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**, 67-73, doi:10.1038/nature12113 (2013).
- 419 Li, J., Mizukami, Y., Zhang, X., Jo, W. S. & Chung, D. C. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. *Gastroenterology* **128**, 1907-1918 (2005).
- 420 Zorn, A. M. *et al.* Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Molecular cell* **4**, 487-498 (1999).
- 421 Sinner, D. *et al.* Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* **27**, 7802-7815, doi:10.1128/MCB.02179-06 (2007).
- 422 Hoang, J. M. *et al.* BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer research* **57**, 300-303 (1997).
- 423 Stefansson, I. *et al.* Loss of hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-based study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 138-143 (2002).
- 424 Charbonnier, F. *et al.* MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer research* **62**, 848-853 (2002).
- 425 Nakagawa, H., Hampel, H. & de la Chapelle, A. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Human mutation* **22**, 258, doi:10.1002/humu.9171 (2003).
- 426 Grabowski, M. *et al.* Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genetic testing* **9**, 138-146, doi:10.1089/gte.2005.9.138 (2005).
- 427 Pistorius, S. *et al.* Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. *Cancer letters* **248**, 89-95, doi:10.1016/j.canlet.2006.06.002 (2007).
- 428 Darvishian, F., Stier, E. A., Soslow, R. A. & Lin, O. Immunoreactivity of p16 in anal cytology specimens: histologic correlation. *Cancer* **108**, 66-71, doi:10.1002/cncr.21711 (2006).
- 429 Alektiar, K. M. *et al.* Is there a difference in outcome between stage I-II endometrial cancer of papillary serous/clear cell and endometrioid FIGO Grade 3 cancer? *International journal of radiation oncology, biology, physics* **54**, 79-85 (2002).
- 430 Soslow, R. A. *et al.* Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences. *The American journal of surgical pathology* **31**, 979-987, doi:10.1097/PAS.0b013e31802ee494 (2007).
- 431 Bilbao, C. *et al.* Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer. *Eur J Cancer* **46**, 2821-2827, doi:10.1016/j.ejca.2010.06.116 (2010).

- 432 Peterson, L. M. *et al.* Molecular characterization of endometrial cancer: a correlative study assessing microsatellite instability, MLH1 hypermethylation, DNA mismatch repair protein expression, and PTEN, PIK3CA, KRAS, and BRAF mutation analysis. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **31**, 195-205, doi:10.1097/PGP.0b013e318231fc51 (2012).
- 433 Kang, S. *et al.* RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **119**, 1316-1321, doi:10.1002/ijc.21991 (2006).
- 434 Pallares, J. *et al.* Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **21**, 691-699, doi:10.1038/modpathol.2008.38 (2008).
- 435 Dewdney, S. B. *et al.* Aberrant methylation of the X-linked ribosomal S6 kinase RPS6KA6 (RSK4) in endometrial cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 2120-2129, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2668 (2011).
- 436 Velasco, A. *et al.* Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. *Human pathology* **42**, 185-193, doi:10.1016/j.humpath.2010.08.001 (2011).
- 437 O'Hara, A. J. & Bell, D. W. The genomics and genetics of endometrial cancer. *Advances in genomics and genetics* **2012**, 33-47, doi:10.2147/AGG.S28953 (2012).
- 438 Moreno-Bueno, G. *et al.* Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer research* **63**, 5697-5702 (2003).
- 439 Matias-Guiu, X. & Prat, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* **62**, 111-123, doi:10.1111/his.12053 (2013).
- 440 Callister, M., Ramondetta, L. M., Jhingran, A., Burke, T. W. & Eifel, P. J. Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: analysis of patterns of failure, prognostic factors, and treatment outcome. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **58**, 786-796, doi:10.1016/S0360-3016(03)01561-X (2004).
- 441 Ramondetta, L. M. *et al.* A phase II trial of cisplatin, ifosfamide, and mesna in patients with advanced or recurrent uterine malignant mixed mullerian tumors with evaluation of potential molecular targets. *Gynecologic oncology* **90**, 529-536 (2003).
- 442 Janku, F. *et al.* PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* **10**, 558-565, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0994 (2011).
- 443 Murray, S. *et al.* Low frequency of somatic mutations in uterine sarcomas: a molecular analysis and review of the literature. *Mutation research* **686**, 68-73, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.01.019 (2010).
- 444 Erratum: Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, doi:10.1038/nature12325 (2013).
- 445 Daikoku, T. *et al.* Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer research* **68**, 5619-5627, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1274 (2008).
- 446 Jacks, T. *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology : CB* **4**, 1-7 (1994).

Bibliografía

- 447 Batista, L. F. & Artandi, S. E. Telomere uncapping, chromosomes, and carcinomas. *Cancer cell* **15**, 455-457, doi:10.1016/j.ccr.2009.05.006 (2009).
- 448 Akbay, E. A. *et al.* Cooperation between p53 and the telomere-protecting shelterin component Pot1a in endometrial carcinogenesis. *Oncogene* **32**, 2211-2219, doi:10.1038/onc.2012.232 (2013).
- 449 Kim, S. H., Kaminker, P. & Campisi, J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature genetics* **23**, 405-412 (1999).
- 450 Hsu, H. L. *et al.* Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & development* **14**, 2807-2812 (2000).
- 451 Prescott, J., McGrath, M., Lee, I. M., Buring, J. E. & De Vivo, I. Telomere length and genetic analyses in population-based studies of endometrial cancer risk. *Cancer* **116**, 4275-4282, doi:10.1002/cncr.25328 (2010).
- 452 Gonzalo, S. *et al.* DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature cell biology* **8**, 416-424 (2006).
- 453 Blasco, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature reviews* **8**, 299-309 (2007).

ANEXOS



ANEXO 1: Condiciones de las reacciones de amplificación, secuencias de los oligonucleótidos empleados y tamaño del producto de PCR obtenido en cada gen estudiado. Anill.: anillamiento; Ext.: extensión.

ANEXO 2: Sondas utilizadas para el análisis de grandes reordenamientos mediante en los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* mediante la técnica de MLPA.

ANEXO 3: Sondas utilizadas para el análisis de la metilación de los promotores de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6* mediante la técnica de MS-MLPA.

ANEXO 4: Resultados por pacientes del análisis de la metilación de los promotores de los genes *hMLH1*, *hMSH2* y *hMSH6*.

ANEXO 5: Resultados por pacientes de la medida de la longitud telomérica y el ensayo de discriminación alélica realizado para los polimorfismos *TERT-1327C>T* y *TERC-63G>A*.

ANEXO 6: Relación de las alteraciones genéticas y epigenéticas encontradas en los 86 carcinomas de endometrio estudiados. E1: carcinoma endometriode de grado 1; E2: carcinoma endometriode de grado 2; E3: carcinoma endometriode de grado 3; SER: carcinoma de endometrio tipo seroso; CC: carcinoma de endometrio de células claras; CR: carcinosarcoma; LOH: pérdida de heterozigosidad; Exp.: expresión; Mut.: mutación; Met.: metilación; MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; MSI: Inestabilidad de microsatélites; Amp.: amplificado; Delec.: delecionado.

ANEXO 1



1. GENES SUPRESORES DE TUMORES

1.1 *PTEN*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	TCC TCC TTT TTC TTC AGC CAC	GAA AGG TAA AGA GGA GCA GCC	147	54	30	30
2	GCT GCA TAT TTC AAA CTA A	ACA TCA ATA TTT GAA ATA GAA AAT C	116	54		
3	TGT TAA TGG TGG CTT TTT G	GCA AGC ATA CAA ATA AGA AAA C	114	50		
4	TTC CTA AGT GCA AAA GAT AAC	TAC AGT CTA TCG GGT TTA AGT	147	54		
5	TTT TTT TTT CTT ATT CTG AGG TTA TC	GAA GAG GAA AGG AAA AAC ATC	312	50		
6	AGT GAA ATA ACT ATA ATG GAA CA	GAA GGA TGA GAA TTT CAA GC	232	55		
7	AAT ACT GGT ATG TAT TTA ACC AT	TCT CCC AAT GAA AGT AAA GTA	220	55		
8	TTT TTA GGA CAA AAT GTT TCA C	CCC ACA AAA TGT TTA ATT TAA C	258	55		
9	GTT TTC ATT TTA AAT TTT CTT TC	TGG TGT TTT ATC CCT CTT G	245	54		

1.2 *TP53*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
4	CAA CGT TCT GGT AAG GAC AA	GCC AGG CAT TGA AGT CTC AT	445	58	30	30
5	GCC GTG TTC CAG TTG CTT TA	AGG AGG GGC CAG ACC TAA GA	351	58		
6	AGC GCT GCT CAG ATA GCG AT	TAA GCA GCA GGA GAG AAA GCC C	331	58		
7	AAG GCG CAC TGG CCT CAT CTT	GAG GTG GAT GGG TAG TAG	266	58		
8	GAC CTG ATT TCC TTA CTG CCT	TCT CCT CCA CCG CTT CTT	219	56		
9	GGA GAC CAA GGG TGC AGT AT	GCC CCA ATT GCA GGT AAA AC	233	58		
10	GGT ACT TGA AGT GCA GTT TCT	CAG CTG CCT TTG ACC ATG AA	344	58		

1.3 *CDKN2A*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	GAA GAA AGA GGA GGG GCT G	GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC	340	58	30	60
2	GCT CTA CAA GCT TCC TTT CCG TCA	GAC CGG AGA CTG GTC TCC CGG GTG	481			

1.4 CDH1

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	GTG AAC CCT CAG CCA ATC AG	AAT GCG TCC CTC GCA AGT CA	271	52	30	30
2	TCA CCC GGT TCC ATC TAC	CAA CCT CCT CTT CTT TAT	201	50		
3	GCT CTT GTC TTT AAT CTG TC	CTA CCA AGG CTG AGA AAC CT	339	55		
4	CTT GTT CCT CAT CTT CTT TC	CCC TTT CTC TCC TTG GTA CT	260	55		
5	GTT GGC ATC CTT CTT TAC TA	AAA TCC TGG ATG GAT GTT AC	398	55		
6	CTC ACTTGG TTC TTT CAG CT	AAC CTT CGG CCT TGG ACA	313	55		
7	AGC TTG TCT AAA CCT TCA TC	GCT TAG ACC ATC ACT GTA T	288	55		
8	TTG GTT GTG TCG ATC TCT CT	GTC TCA TGG TAC ATT TTT AT	262	55		
9	GTA CTT GTA ATG ACA CAT CTC	TGC CAG TTT CTG CAT CTT GC	356	55		
10	ACT TCA TTG TTT CTG CTC TC	AAC CAG TTG CTG CAA GTC AG	488	55		
11	GTT GTT TGC TGG TCC TAT TC	GAA CTA GCT AGG AGG TCG AG	248	55		
12	TG GGA TTC ATT ACT GTT GC	GCA TGG CAG TTG GAG CAA AG	312	55		
13	TTT CCT CCC CTG GTC TCA TC	TGA GTC ACT TGC CAG CTG GA	386	55		
14	CTC TCA ACA CTT GCT CTG TC	AGA GAT CAC CAC TGA GCT AC	206	55		
15	CAT AGC CCT GTG TGT ATG AC	CGG ATG CTT TGG CTT TCC AC	270	55		
16	AGA TGA CAG GTG TGC CCT TC	ATT TCT GCA TTT CCC AGC AC	390	55		

1.5 PPP2R1A

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	AAC GCG AGC TTA GCC CTG GG	ACC CCT CCG CGT CTT CCC CAA	283	58	30	30
2	GTA ACC AAG CAA GGC TTC CAG	CTG CAC TTC TCT GAA TCC CT	351	55		30
3	GAA GAA CTG AGT GCT GAC AG	TGT TCT GAC GTG ATC CCC A	327	55		30
4	TCT CTG AGG AGA TGA GCC CAT	GGC TTT AGA GAA GGT TGG AGC T	394	56		30
5	ACA CAA CTG CAG AGT CTG TGC	GCT CTG GGA TTC TCT TTC ATG	299	56		30
6	CAT GAA AGA GAA TCC CAG AGC	ACC TCA GCT CCT ATA TGC TTC	303	56		30
7-8*	TTA GCA CTG CTT CCA AGG	ATC CCC AAA GCC TTG TCT CCA	502	62		90
9	TGC TTA GCC ACT TGC TGC TGC AG	GCA GAT TCC TGG TCA ATC TAG G	293	58		30
10	GTT GAT GCA GCT GAG CTC TT	TCA CAG CCT CCA CTA AGC CTT	365	56		30
11	TGT AGG TTC CAT GGG ATG TG	TGA CTC TAG CCT CCT CCA CT	245	55		30
12	TAA GCC ATG GTG AGT GTG ACCT	GAT GCA CTC CAT GTC TCC ATT	363	55		30
13	ATG AGA GTT AGC CAG GAG C	GGC TCT ACC TTC AAA GGT CA	277	56		30
14	GAG CCC TGT GCC CAC CTG TT	GAA CCA GAG CCC TCT CTC TG	294	55		30
15	GAC TTT GAG GAC AGG CAC TG	TTC CTC CCA AGG TCA CTG T	369	56		30

*añadir 0.5 uL de Betaína 0.5M

1.6 ARID1A

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1A	TCA TTC CCA GGC AAG GGC TTG	ACC TGA AGA ACT CGA ACG GG	599	60	30	60
1B	GGG AAA GGA GCT GCA GGA	CTG AGC TCC CCG AGA GGT	502	64		
1C*	CAG CAG AAC TCT CAC GAC	CAG GTA CAC AGC TGA GTG GG	560	58		
1D*	ACC CTC AAC CAA CTG CTC AC	GCC ATT GTC TGG CTC TTC TC	399	60		
2	AGG TTG GTC TCA TTG CTC TTT C	GAA TGT ATC CTT GGC TTC CAA	442	55		
3A	ACC CTG GGC CTC CTA AGT ATG	CCT CCA CCG CAG GTA AGA TAT	598	55		
3B	ACA ACC AGC AAA GTC CTC ACC	CAG AGT GGT TCT CTA ACG TGC A	495	58		
4	CAG TCC CAT AAC CCT TTC ACA	GTT CTG TCT CCC TGC CCA G	375	62		
5	AAA GAA CGT GTG TGA TGT ATT TGC	GGC TCA TGC CTG CAT AGT TTC	484	66		
6	TTG GCT GGA TCT CTT TGT GTG	GGA GAG CTG TTT GAC CAT GAA	319	55		
7	TCC CAG GAT AAG GAT GGA GAG	CTT GTG AGA GAA GGG CTG TCC	349	55		
8	TTG AAT GAC ATT GTT TGG TGT TC	GAT TAT TGA GAT GCT TCT GGA CC	486	55		
9	CAC AGC ACT ATT TGG CTC CAG	CAG CCA GCC CAG AGA TGA T	343	54		
10	GCC AAC AAT TCT GCA GGT AAG	GAG AGT GAC AAG ATC CCA GCC	309	56		
11	CAA GAG ACT TCT GAG ACC CTT AGC	CTG GCT TCA TGT GGT ACC ATG	369	55		
12*	GAA TAC CTT ACA GCC TGA TGG G	CCA ACA GGA TAT GCC AAG GAT	403	58		
13	GGC CTT AGG AAG AAC TTT CCC	GAC TCC TGC GTG TCC TTT GTT	368	55		
14	GGC TGA AGA TAA GTG CAT GGG	GAG AAT GGC TCA GGG TTC TTG	409	55		
15	GAA CTC TGA AGA GGG CCT GG	GCT CAA TCT GCC TCT CCA ATT	313	57		
16	CAG AGT GAG GTA AGC ATG ACC C	CAA TCA GTT CTC CAC CCA AGG	366	55		
17	GTG AGT AAA GCC TGG TCT CGG	CTG AAG AGC CAC GTC CTC AAT	342	60		
18A	GGA AGA AAG AGT GGT GGT TGC	CCA ATT TCC ATT CCA GTT TGG	458	60		
18B	GGA GAT GTA CAG CGT GCC ATA	CTA TCA TGG CGT GAA CCG A	427	55		
18C	GCT CAG CAA GGC ACC ATG T	AGT ACC TGC CTC GCA CAT AGC	402	64		
18D	CCT CCA TCT AAC TAC CAG CCC	CTC CTT CAT TGC CAT GCA AT	473	54		
19	AGA CAG AAA CTG CCT TCC ACC	GGG AAT GTC TCA TCT TTA GCC A	332	60		
20A	GGA GAA CCT TTG GGA AAG GAG	GAC CCA CTT CGA GAG CAA GAC	599	59		
20B	CAG GCA AGG ACA AGC CAG	TGT CCA ATA CCA TTC GAA GCC	600	64		
20C	GCT AAG AGT TCA GAG GCC ATC A	AAC ACC TTG GTT ACA CTC GCC	417	58		
20D	GCT AAG AGT TCA GAG GCC ATC A	TAG TGT GGA CAT GAT GCG G	918	60		
20E	CCT TGG TTA CAC TCG CCA AC	TAC TCT GTA CGA ATC ACG GCT G	598	55		
20F	CTCA GTG ACC GAA AGA ACC C	TCT CTC TCC TCC TTC CAC CTC	567	64		

*añadir 0.5 µL de DMSO

2. ONCOGENES

2.1 *PIK3CA*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
7	CCT TTT GGG GAA GAA AAG TG	GAG AGA AGG TTT GAC TGC CAT AA	284	54	30	60
9	TGA AAA TGT ATT TGC TTT TTC TGT	CCA CAA ATA TCA ATT TAC AAC CAT TG	401	51		
20	TGG GGT AAA GGG AAT CAA AAG	CCT ATG CAA TCG GTC TTT GC	525	54		

2.2 *CTNNB1*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
3	TGC TTT TCT TGG CTG TCT TTC	CTG ACT TTC AGT AAG GCA ATG A	400	54	30	30

2.3 *KRAS*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
2	GAT ACA CGT CTG CAG TCA ACT G	GGT CCT GCA CCA GTA ATA TG	340	57	30	30
3	GGT GCA CTG AAT AAT TCC AGA CT	CAT GGC ATT AGC AAA GAC TCA	300			

2.4 *BRAF*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
11	TCC CTC TCA GGC ATA AGG TAA	TAA CAC TGT TCA GTA TTA T	231	53	30	30
15	AAA CCT CTT CAT AAT GCT TGC TCT G	GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG	231	55		

2.5 *EGFR*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
18	CAA ATG AGC TGG CAA GTG CCG TGT C	GAG TTT CCC AAA CAC TCA GTG AAA C	400	55	30	30
19	ATC ACT GGG CAG CAT GTG GCA AC	AGA CAT GAG AAA AGG TGG GCC TGA	234	55		
20	CCA TGA GTA CGT ATT TTG AAA CTC	CAT ATC CCC ATG GCA AAC TCT TGC	408	53		
21	CTA ACG TTC GCC AGC CAT AAG TCC	GCT GCG AGC TCA CCC AGA ATG TCT GG	415	55		

3. GENES REPARADORES

3.1 *HMLH1*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	TTC GAC ATG GCG GTG C	GTC CCT CCC CAG CAC G	285	56	45	30
2	ATG TAC ATT AGA GTA GTT GCA GAC TGA TAA ATT	AGTTTCCAGAACAGAGAAAGTCC	221	56		
3	CAA GAA AAT GGG AAT TCA AAG AGA T	CTA ACA AAT GAC AGA CAA TGT CAT CAC	241	55		
4	CCT TTG GTG AGG TGA CAG TGG	CAG GAT TAC TCT GAG ACC TAG GCA A	221	56		
5	TTT TCC CCT TGG GAT TAG TAT CTA TC	CCC TGA AAA CTT AGA AGC AAT TTT ATT T	227	53		
6	GGA CAT CTT GGG TTT TAT TTT CAA G	TGT TCA ATG TAT GAG CAC TAG AAC ACA	235	56		
7-8	GGG CTC TGA CAT CTA GTG TGT GTT	AAA ATA ATG TGA TGG AAT GAT AAA CCA	417	56		
9	TCT GAT TCT TTT GTA ATG TTT GAG TTT TG	CAT AAA ATT CCC TGT GGG TGT TTC	241	55		
10	CTG AGG TGA TTT CAT GAC TTT GTG T	GAG GAG AGC CTG ATA GAA CAT CTG T	251	56		
11	GTG GGC TTT TTC TCC CCC T	CTC TCA CGT CTG GCC GG	281	56		
12	TTT TTT AAT ACA GAC TTT GCT ACC AGG AC	GTT TTA TTA CAG AAT AAA GGA GGT AGG CTG	346	55		
13	CCA AAA TGC AAC CCA CAA AAT T	AAC CTT GGC AGT TGA GGC C	282	56		
14	GGT GTC TCT AGT TCA GGT GCC TG	TGC CTG TGC TCC CTG GA	271	56		
15	CCC ATT TTG TCC CAA CTG GTT	GAG AGC TAC TAT TTT CAG AAA CGA TCA G	203	56		
16	TGG GAA TTC AGG CTT CAT TTG	GCA CCC GGC TGG AAA TT	292	56		
17	GCA CTG GAG AAA TGG GAT TTG	CCT CCA GCA CAC ATG CAT G	221	56		
18	AGT CTG TGA TCT CCG TTT AGA ATG AG	TTG TAT GAG GTC CTG TCC TAG TCC T	241	56		
19	CAT CAG CCA GGA CAC CAG TG	CGG AAT ACA GAG AAA GAA GAA CAC A	288	56		

3.2 *HMSH2*

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	TTC GAC ATG GCG GTG C	GTC CCT CCC CAG CAC G	258	56	45	30
2	GAA GTC CAG CTA ATA CAG TGC TTG A	AAA CAC AAT TAA ATT CTT CAC ATT TTT ATT TT	301	53		
3	AGA GTT TGG ATT TTT CCT TTT TGC	TCA TGT CAA TTA AAG AGC CTT TCC	241	56		
4	TTC ATT TTT GCT TTT CTT ATT CCT TTT	ATA TGA CAG AAA TAT CCT TCT AAA AAG TCA CTA T	316	50		
5	ACT GGA TCC AGT GGT ATA GAA ATC TTC	GCT TCT TCA GTA TAT GTC AAT GAA AAC A	285	53		
6	GCG TAG TAA GGT TTT CAC TAA TGA GC	CAT GTG GGT AAC TGC AGG TTA CA	256	56		
7	TGA GAC TTA CGT GCT TAG TTG ATA AAT TT	GCA CAT TGC CAA GTA TAT ATT GTA TGA G	341	53		
8	TGA TGC TTG TTT ATC TCA GTC AAA TT	AAT CTA CAA ACT TTC TTA AAG TGG CCT T	257	53		
9	GTC TTT ACC CAT TAT TTA TAG GAT TTT GTC A	GTA TAG ACA AAA GAA TTA TTC CAA CCT CC	217	56		
10	ATT GAA AAA TGG TAG TAG GTA TTT ATG GAA	CAC ATC ATG TTA GAG CAT TTA GGG A	274	54		
11	ATA TGT TTC ACG TAG TAC ACA TTG CTT CTA	TCA AAT ATC ATG ATT TTT CTT CTG TTA CC	249	54		
12	GGG TTT TGA ATT CCC AAA TG	ACA AAA CGT TAC CCC CAC AA	393	53		
13	TGG GGG TAA TAT GGG CAG TA	TCC TTC TCA CAG GAC AGA GAC A	442	48		
14	TGT GGC ATA TCC TTC CCA ATG	AAT AATT TATA CTA ACT TAG AAT AAG GCA ATT ACT GA	452	55		
15	TAC ATA AAT TGC TGT CTC TTC TCA TGC	AAA AAC CTT CAT CTT AGT GTC CTG TT	311	56		
16	TAA TTA CTA ATG GGA CAT TCA CAT GTG T	TAC CTT CAT TCC ATT ACT GGG ATT T	230	55		

3.3 HMSH6

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (pb)	Tª de anill. (°C)	Tiempo de anill. (seg.)	Tiempo de ext. (seg.)
1	TGT TGA TTG GCC ACT GGG	CAA CCC CCT GTG CGA GCC TC	463	62	45	30
2	TAA CTG CCT TTA AGG AAA CTT GAC CA	TCA TAT AGA AAA AAG TCT GCC TGT CTG	330	60		
3	CTG GTC TTG AAC TGC TGG GAT	CCC CTT TCT TCC CCC ATC	289	58		
4.1	TGC ACG GGT ACC ATT ATA AAG TCA	GTA TTC TTG GTT TCT GAT GAA ATG CTA G	450	58		
4.2	GAA GGA AAC GCC CTC AGC	CAG TTG CCT TTC ATG AAT ACC AG	420	58		
4.3	CCA CAT GGA TGC TCT TAT TGG A	TCA TCT GAA AAC TGA CCT ATG AAA AAC T	420	58		
4.4	TTT GTT GAT ACT TCA CTG GGA AAG TT	CTC CTG ATC AAT AAG GCA TTT TTT G	420	57		
4.5	CTC TAG GTG GTT GTG TCT TCT ACC TC	TGA GTA GCC TCT CAA GAT CTG GAA	420	57		
4.6	CGA AGT TGT AGA GCT TCT AAA GAA GCT	GTC CTA CAG CCA ATT CTG TTG C	480	57		
4.7	AGC CTC CTG GAA TAC CTA GAG AAA C	ACT TAT TTT TAG GGA TAA TAT ACA GCT GGC	420	58		
5	CAC TTA GGC TGA TAA AAC CCC C	GTA TGT TAT TCC TAA TGT CAC AAA TGA CTT T	386	57		
6	AAG ACA AAA GTT TAT GAA ACT GTT ACT ACC A	AGA AGC AAA TAT CTT TTA TCA CAT CTA AAT G	250	56		
7	TAA CCT AGA AGA TGA ATT TAT GTA ATA TGA TTT	TTC AGA TAA TCT TCT ATA AAA ATA GTT ATT TGT	224	53		
8	TGA GTT ACT TCC TTA TGC ATA TTT TAC T	AAT ATT AGC GAT ACA TGT GCT AGC A	275	57		
9	TGC TAG CAC ATG TAT CGC TAA TAT T	GCA TCA TCC CTT CCC CTT TTA	320	56		
10	GAA GGG ATG ATG CAC TAT GAA AAA	GTA GAA GGT AGA TAA GAA TTA AAA GGG TTT AAT TT	296	52		

ANEXO 2



1. ESTUDIO DE *HMLH1* Y *HMSH2*

Gen	Exón	Prueba Referencia	Sonda	Posición cromosómica	Tamaño (pb)
<i>SART1</i>	4	SÍ	04158-L03513	11q13.1	130
<i>EPCAM</i>	3	NO	04249-L03604	02p21	136
<i>MSH6</i>	7	NO	04243-L03598	02p16.3	142
<i>MLH1</i>	1	NO	01685-L01265	03p22.2	148
<i>VPS13B</i>	5	SÍ	10051-L10475	08q22.2	154
<i>MSH6</i>	8	NO	04244-L03599	02p16.3	160
<i>MLH1</i>	1	NO	01686-L01266	03p22.2	167
<i>MSH6</i>	9	NO	04245-L04021	02p16.3	174
<i>KCNE2</i>	1	SÍ	05072-L04472	21q22.11	184
<i>EPCAM</i>	8	NO	11983-L12811	02p21	190
<i>MSH6</i>	10	NO	04246-L03601	02p16.3	196
<i>MSH2</i>	5'-UTR	NO	12006-L12810	02p21	202
<i>MSH6</i>	1	NO	06230-L05733	02p16.3	208
<i>MSH6</i>	3	NO	12009-L13477	02p16.3	222
<i>CHEK1</i>	7	SÍ	08023-L07804	11q24.2	229
<i>MSH6</i>	5	NO	12010-L12846	02p16.3	238
<i>MSH6</i>	4	NO	12011-L12847	02p16.3	247
<i>NTNG1</i>	2	SÍ	06480-L06006	01p13.3	256
<i>MSH6</i>	2	NO	12012-L12848	02p16.3	265
<i>MSH6</i>	5	NO	12005-L00909	02p16.3	274
<i>RDX</i>	11	SÍ	01633-L01171	11q22.3	281
<i>MUTYH</i>	18	NO	04677-L03353	01p34.1	292
<i>MSH6</i>	1	NO	06229-L05732	02p16.3	301
<i>EPCAM</i>	9	NO	13131-L03603	02p21	310
<i>MLH1</i>	1	NO	07186-L13476	03p22.2	319
<i>MSH6</i>	1	NO	01250-L00798	02p16.3	328
<i>KCNK12</i>	2	NO	08663-L13228	02p21	337
<i>MSH6</i>	2	NO	04247-L03602	02p16.3	346
<i>MSH2</i>	1	NO	02735-L02162	02p21	355
<i>MSH6</i>	4	NO	01252-L00902	02p16.3	364
<i>PANK2</i>	8	SÍ	09563-L10017	20p13	373
<i>MSH6</i>	6	NO	01253-L00801	02p16.3	382
<i>MUTYH</i>	4	NO	04323-L01368	01p34.1	402
<i>EPCAM</i>	3'-UTR	NO	13146-L14626	02p21	412
<i>MUTYH</i>	5	NO	03964-L03351	01p34.1	418
<i>EPCAM</i>	9	NO	13215-L14404	02p21	427
<i>JAG1</i>	19	SÍ	09614-L09909	20p12.2	436

2. ESTUDIO DE *HMSH6*

Gen	Exón	Prueba Referencia	Sonda	Posición cromosómica	Tamaño (pb)
<i>IL4</i>	1	SÍ	00797-L21056	05q31.1	130
<i>CREM</i>	9	SÍ	00981-L00566	10p11.21	136
<i>MLH1</i>	1	NO	14701-L19726	03p22.2	142
<i>MSH2</i>	1	NO	12036-L02162	02p21	148
<i>MLH1</i>	2	NO	01008-L00577	03p22.2	154
<i>MSH2</i>	2	NO	00906-L00494	02p21	160
<i>MLH1</i>	3	NO	00888-L00476	03p22.2	166
<i>MSH2</i>	3	NO	01029-L00601	02p21	172
<i>MLH1</i>	4	NO	00889-L23928	03p22.2	178
<i>MSH2</i>	4	NO	00908-L00496	02p21	184
<i>MSH2</i>	1	NO	11287-L12006	02p21	190
<i>SLC26A3</i>	19	SÍ	17056-L20134	07q31.1	196
<i>MLH1</i>	5	NO	00890-L06064	03p22.2	202
<i>MSH2</i>	5	NO	00909-L00497	02p21	211
<i>MSH2</i>	1	NO	13145-L14624	02p21	217
<i>MLH1</i>	6	NO	14702-L16353	03p22.2	221
<i>MSH2</i>	6	NO	15298-L17064	02p21	231
<i>SCN1A</i>	hA	SÍ	15941-L18067	02q24.3	236
<i>MLH1</i>	7	NO	00892-L16355	03p22.2	242
<i>MSH2</i>	7	NO	11634-L16356	02p21	249
<i>MLH1</i>	8	NO	00893-L00481	03p22.2	256
<i>MSH2</i>	8	NO	00912-L00582	02p21	265
<i>MLH1</i>	9	NO	00894-L00482	03p22.2	274
<i>CPOX</i>	2	SÍ	14828-L16536	03q12.1	283
<i>MSH2</i>	9	NO	00913-L00583	02p21	292
<i>MLH1</i>	10	NO	00895-L00483	03p22.2	301
<i>MSH2</i>	10	NO	11288-L12007	02p21	310
<i>MLH1</i>	11	NO	00896-L00484	03p22.2	319
<i>MSH2</i>	11	NO	00915-L00503	02p21	329
<i>MLH1</i>	12	NO	14703-L16354	03p22.2	337
<i>MSH2</i>	12	NO	18133-L23925	02p21	346
<i>MLH1</i>	13	NO	00898-L23926	03p22.2	355
<i>MSH2</i>	13	NO	01013-L00575	02p21	364
<i>CASP6</i>	6	SÍ	00681-L11147	04q25	375
<i>MLH1</i>	14	NO	00899-L00586	03p22.2	382
<i>MSH2</i>	14	NO	00918-L00506	02p21	391
<i>MLH1</i>	15	NO	00900-L00488	03p22.2	401
<i>MSH2</i>	15	NO	00919-L00585	02p21	409
<i>MLH1</i>	16	NO	01009-L00576	03p22.2	418
<i>MSH2</i>	16	NO	01053-L14623	02p21	427
<i>MLH1</i>	17	NO	01030-L00602	03p22.2	436
<i>MLH1</i>	18	NO	01031-L00603	03p22.2	445
<i>MLH1</i>	19	NO	12094-L12994	03p22.2	454
<i>UPF2</i>	20	SÍ	00979-L00568	10p14	463
<i>EPCAM</i>	9	NO	13147-L14404	02p21	472
<i>EPCAM</i>	9	NO	18132-L24050	02p21	481
<i>LATS2</i>	8	SÍ	04274-L24051	13q12.11	490
<i>RPGRIP1</i>	13	SÍ	14882-L21050	14q11.2	499

ANEXO 3



Gen	Exón	Prueba Referencia	Sonda	Posición cromosómica	Tamaño (pb)
<i>CTTN</i>	16	SÍ	03896-L00020	11q13.3	130
<i>KCNJ6</i>	4	SÍ	03797-L04594	21q22.13	136
<i>PMS2</i>	1	NO	07935-L16571	07p22.1	142
<i>MLH1</i>	1	SÍ	01685-L01265	03p22.2	148
<i>PMS2</i>	1	NO	11966-L13112	07p22.1	154
<i>MSH6</i>	1	NO	06228-L05731	02p16.3	160
<i>MLH1</i>	1	NO	01686-L15580	03p22.2	166
<i>MGMT</i>	1	NO	14133-L15736	10q26.3	172
<i>TNFRSF1A</i>	1	SÍ	00554-L13113	12p13.31	178
<i>MSH2</i>	1	NO	06227-L07711	02p21	184
<i>PROKR2</i>	1	SÍ	11954-L12774	20p12.3	190
<i>MLH1</i>	1	NO	06222-L07712	03p22.2	196
<i>MGMT</i>	1	NO	05670-L14276	10q26.3	202
<i>MSH6</i>	1	NO	06230-L05733	02p16.3	208
<i>MGMT</i>	1	NO	12250-L14205	10q26.3	214
<i>MSH3</i>	1	NO	07940-L14208	05q14.1	220
<i>PAH</i>	4	SÍ	02334-L13114	12q23	232
<i>MLH1</i>	1	NO	07187-L07710	03p22.2	238
<i>MSH2</i>	7	SÍ	11634-L12398	02p21	247
<i>SEPTIN9</i>	8	SÍ	09646-L09804	17q25.3	256
<i>MLH1</i>	1	NO	06221-L01747	03p22.2	265
<i>MSH2</i>	1	NO	06142-L00599	02p21	274
<i>MSH3</i>	1	SÍ	11947-L00795	05q14.1	283
<i>MLH1</i>	1	NO	02258-L01745	03p22.2	292
<i>MSH6</i>	1	NO	06229-L05732	02p16.3	301
<i>CACNA1A</i>	11	SÍ	09065-L15938	19p13.2	310
<i>TSC1</i>	18	SÍ	04324-L03897	09q34.13	319
<i>KCNQ1</i>	7	SÍ	15055-L04802	11p15.5	328
<i>PMS2</i>	1	NO	07934-L16147	07p22.1	339
<i>MGMT</i>	1	NO	13716-L15582	10q26.3	346
<i>MLH3</i>	1	NO	07941-L07722	14q24.3	355
<i>CUGBP2</i>	6	SÍ	01234-L00781	10p14	364
<i>ABCB4</i>	17	SÍ	04727-L04144	07q21.12	373
<i>FBN1</i>	23	SÍ	02459-L01903	15q21.1	382
<i>MGMT</i>	1	NO	14136-L12791	10q26.3	391
<i>MSH2</i>	1	NO	06141-L13115	02p21	400
<i>MGMT</i>	1	NO	14135-L16573	10q26.3	409
<i>TSC2</i>	18	SÍ	13553-L12763	16p13.3	418

ANEXO 4



Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico

Anexo 4

Caso	hMLH1		hMLH2		hMSH6	
	Mediana	Estado de metilación	Mediana	Estado de metilación	Mediana	Estado de metilación
1		-		-		-
2	0.611	+		-		-
3		-		-		-
4	0.500	+	1.001	++		-
5	0.965	++	0.940	++	1.590	++
6	0.690	+	0.950	++	1.330	++
7	1.410	++	1.001	++	1.010	++
8	0.983	++		-		-
9		-		-		-
10		-		-		-
11		-		-		-
12	0.890	++	0.385	+		-
13	1.130	++	1.002	++	3.380	++
14		-		-		-
15		-		-		-
16		-		-		-
17		-		-	0.630	+
18		-		-		-
19		-		-		-
20		-		-		-
21	0.620	+		-		-
22		-		-		-
23		-		-		-
24		-		-	0.400	+
25	0.430	+	0.540	+	0.560	+
26		-		-		-
27		-		-		-
28		-		-		-
29		-		-		-
30		-		-		-
31		-		-	0.360	+
32	0.325	+		-	0.320	+
33		-		-		-
34	0.460	+	0.420	+		-
35	0.345	+		-	0.350	+
36		-		-		-
37	0.715	+		-		-
38	1.015	++		-		-
39		-		-		-
40		-		-		-
41	0.670	+	0.510	+	1.140	++
42	0.520	+	0.465	+	0.750	+
43		-		-		-
44	1.220	++		-		-
45	0.645	+	0.430	+	0.485	+
46		-		-	0.970	++
47		-		-		-
48	0.370	+		-		-
49		-		-		-
50		-		-		-
51		-		-		-
52	0.395	+		-	0.460	+
53	0.810	++	1.000	++	1.000	++
54	0.285	+		-	0.500	+
55	0.800	++		-		-

Caso	<i>hMLH1</i>		<i>hMLH2</i>		<i>hMSH6</i>	
	Mediana	Estado de metilación	Mediana	Estado de metilación	Mediana	Estado de metilación
56		-		-		-
57	0.330	+	0.920	++		-
58		-		-		-
59		-		-	0.400	+
60		-		-		-
61		-		-	0.400	+
62		-		-		-
63		-		-	0.350	+
64		-		-	0.530	+
65		-		-		-
66		-		-		-
67	1.215	++		-		-
68	1.985	++		-		-
69		-		-	0.490	+
70		-		-		-
71		-		-		-
72	0.330	+		-		-
73		-		-	0.500	+
74		-		-		-
75	0.440	+		-	0.310	+
76		-		-		-
77	0.375	+		-		-
78		-		-		-
79	0.435	+		-		-
80		-		-		-
81		-		-		-
82	1.005	++		-	0.560	+
83		-		-		-
84	0.665	+		-	0.520	+
85		-		-		-
86		-		-		-

ANEXO 5



Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico

Anexo 5

Caso	Longitud telomérica relativa	Tipo	Grado	Tumor	TERT -1327C>T	TERC -63G>A
1	2.0076139721	1	4	7	T/T	A/A
2	0.515679465400003	1	4	7	T/T	A/A
3	0.955814173599999	1	3	6	T/T	G/A
4	0.735209936599999	1	3	6	C/T	A/A
5	0.815955918600001	2	5	12	C/C	A/A
6	1.4066236185	1	3	6	C/T	A/A
7	1.6598747496	1	3	6	C/T	A/A
8	2.4389832994	1	3	6	C/T	A/A
9	1.0998733679	1	5	8	T/T	G/A
10	0.891607660599998	1	3	6	C/T	A/A
11	1.8650800418	2	5	12	T/T	G/A
12	1.0844065	1	3	6	C/C	A/A
13	1.4720299007	1	4	7	C/C	A/A
14	0.462639188899998	1	4	7	T/T	A/A
15	1.0165934525	1	4	7	C/T	A/A
16	0.937015717399997	2	5	12	T/T	A/A
17	1.4191234566	1	4	7	C/T	A/A
18	1.0695897954	1	3	6	C/C	A/A
19	1.7737159497	2	5	9	T/T	G/A
20	2.0177099812	2	5	9	C/T	A/A
21	0.9131306781	1	3	6	C/T	A/A
22	0.916435956300003	1	4	7	C/T	G/A
23	0.592092102599997	2	5	11	C/C	A/A
24	0.0908619251999964	2	5	12	C/T	A/A
25	2.0490732536	2	5	9	T/T	A/A
26	0.620777135400001	1	4	7	T/T	G/G
27	0.970984522600003	2	5	12	C/C	A/A
28	0.104352048699997	1	4	7	C/T	A/A
29	1.3767964559	2	5	9	T/T	A/A
30	1.5411812297	2	5	10	T/T	A/A
31	1.1851571508	1	3	6	C/T	G/A
32	0.762065060999998	2	5	9	C/T	G/A
33	1.6954838481	1	4	7	C/T	A/A
34	1.3921348354	1	3	6	C/C	A/A
35	1.5444474804	1	3	6	T/T	A/A
36	1.1681200699	1	5	8	T/T	A/A
37	0.9514832608	1	4	7	C/T	A/A
38	1.3986065566	1	5	8	C/T	A/A
39	1.0951736901	2	5	12	T/T	A/A
40	0.827495083100003	1	3	6	C/T	A/A
41	0.708557909800001	1	3	6	C/T	A/A
42	1.7256444865	1	3	6	C/T	A/A
43	2.7018634561	1	3	6	C/T	A/A
44	1.2008232875	1	4	7	C/T	A/A
45	2.084584804	1	4	7	C/T	A/A
46	2.2471250298	2	5	12	T/T	G/A
47	1.3961629868	1	3	6	T/T	A/A
48	0.294694403900001	1	3	6	C/T	G/A
49	2.3710699026	2	5	9	C/T	G/A
50	1.1641774974	1	3	6	C/T	G/A
51	2.0403689406	1	3	6	C/T	A/A
52	0.6099430767	1	5	8	T/T	G/A
53	0.577732630100001	2	5	12	T/T	A/A
54	1.5005921634	1	4	7	C/T	A/A
55	2.7974254068	1	4	7	C/T	A/A
56	1.0166911343	1	4	7	C/T	G/A
57	1.7850179989	1	4	7	T/T	A/A
58	1.5872546195	2	5	12	T/T	A/A

Caracterización de nuevos perfiles moleculares en carcinoma de endometrio esporádico

Anexo 5

Caso	Longitud telomérica relativa	Tipo	Grado	Tumor	TERT -1327C>T	TERC -63G>A
59	0.968921242300003	2	5	9	C/T	G/G
60	1.111499801	1	4	7	T/T	A/A
61	1.3237341316	1	4	7	C/T	G/A
62	2.5628350768	1	4	7	C/T	G/A
63	0.745056911700004	2	5	12	T/T	A/A
64	1.2379464965	1	3	6	T/T	G/G
65	1.4663703056	1	3	6	C/T	G/A
66	1.3439362778	2	5	11	C/T	A/A
67	0.749983979799999	1	5	8	C/C	G/G
68	0.792578563499999	1	3	6	T/T	A/A
69	0.892811783300002	1	4	7	C/T	A/A
70	0.549417356400005	2	5	9	T/T	A/A
71	1.2128476719	1	3	6	T/T	A/A
72	0.760830467499996	1	5	8	C/C	A/A
73	1.3793141086	1	3	6	C/T	A/A
74	1.61679017	1	3	6	C/C	G/G
75	2.3892792088	1	4	7	C/T	G/A
76	1.374557385	1	3	6	C/T	G/A
77	1.8506862334	1	3	6	C/T	G/A
78	1.0976471551	1	4	7	T/T	A/A
79	0.809394303800001	1	3	6	C/T	G/A
80	1.3916687735	1	5	8	T/T	G/A
81	1.6862085414	2	5	12	C/C	A/A
82	0*	1	5	8	C/T	G/A
83	0.0311174049000014	1	3	6	C/T	G/A
84	2.4378122394	2	5	12	T/T	A/A
85	0.8334123657	1	3	6	T/T	A/A
86	0.581491237000002	1	4	7	T/T	A/A

ANEXO 6



GENES		SUPRESORES DE TUMORES						ONCOGENES					LOH	MMR										EXPRESIÓN HDACs					
CASO	Tipo de Tumor	PTEN	TP53	CDKN2A	CDH1	PPP2R1A	ARID1A	PIK3CA	CTNNB1	KRAS	BRAF	EGFR		hMLH1				hMSH2				hMSH6				MSI	1	2	3
														Exp.	Mut.	Met.	MLPA	Exp.	Mut.	Met.	MLPA	Exp.	Mut.	Met.	MLPA				
46	CR							p.M1043V						+	-	+	-	+	++					Sí	Sí	Sí			
47	E1	p.N323fsX1												+	-	+	-	+	-					No	No	Sí			
48	E1	p.R335X	p.G266R				p.Q1614fsX20							-	+	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
49	SER						p.P179R							+	-	+	-	+	-			MSS		No	No	Sí			
50	E1							p.T1025A	p.S37F					+	-	+	-	+	-			MSI-L		No	No	Sí			
51	E1	p.E299X												+	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
52	E3	p.R130Q p.R142W p.R173Y	p.R175C				p.R48Q	p.G1549D	p.T1025A p.K1024N					+	+	+	-	+	+			MSI-L		Sí	No	Sí			
53	CR		p.N239D											+	++	+	++	+	++			MSS		Sí	Sí	Sí			
54	E2	p.N323fsX1								p.G12D				+	+	+	-	+	+			MSI-H		Sí	No	Sí			
55	E2						p.E1776X							-	++	+	-	+	-			MSI-H		Sí	Sí	Sí			
56	E2	p.R130P p.R130L							p.S45F					+	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
57	E2		p.P151S											+	+	+	++	+	-					Sí	No	Sí			
58	CR		p.R213X				p.S1000Y	p.M1043I						+	-	+	-	+	-					Sí	No	Sí			
59	SER						p.P179R							+	-	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
60	E2	p.R130G p.R130L					p.R1446X			p.G12D				+	-	+	-	+	-					Sí	No	Sí			
61	E2						p.V132fsX99							+	-	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
62	E2		p.A223D											+	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
63	CR	p.344deK												-	-	+	-	+	+					No	No	Sí			
64	E1	p.Q87fsX2												+	-	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
65	E1	IVS6+1G>A								p.G12V				+	-	+	-	+	-			MSS		Sí	No	Sí			
66	MIX						p.N106fsX5							-	-	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
67	E3						p.P146fsX253			p.G13D				+	++	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
68	E1						p.T1438fsX6		p.S37F p.G34R	p.G13D				+	++	+	-	+	-			MSI-L		Sí	Sí	Sí			
69	E2						p.W2091X		p.S37F					+	-	+	-	+	+			MSI-L		Sí	Sí	Sí			
70	SER		p.R175H p.G266R				p.P179R							-	-	+	-	+	-			MSI-L		Sí	No	Sí			
71	E1													-	-	+	-	+	-					Sí	No	Sí			
72	E3	p.R130Q												+	+	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
73	E1		p.R248Q											+	-	+	-	+	+					Sí	No	Sí			
74	E1	p.A86fsX4												+	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
75	E2	p.R233X					p.G371fsX19							-	+	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
76	E1	p.R130Q p.D252Y					p.P1115fsX44							+	-	+	-	-	-					Sí	Sí	Sí			
77	E1													+	+	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
78	E2	p.T319fsX5					p.P158fsX65	p.D1056N						-	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
79	E1	Traslocación	p.C135Y				p.P1175fsX4 p.E1864fsX35							+	+	+	-	+	-			MSI-H		Sí	Sí	Sí			
80	E3	p.G132D p.Q87fsX2					p.N1081fsX11			p.G12A				+	-	+	-	+	-			MSI-H		Sí	No	Sí			
81	CR													+	-	+	-	+	-					No	No	Sí			
82	E3	p.E285X p.T68H					p.P2114fsX20	p.M1043V		p.G12D				-	++	+	-	+	+					Sí	Sí	Sí			
83	E1													+	-	+	-	+	-					Sí	Sí	Sí			
84	CR	p.W274X	p.R249S				p.D1850fsX32							-	+	+	-	+	+					Sí	No	Sí			
85	E1	p.R308fsX8												+	-	+	-	+	-					Sí	No	No			
86	E2	p.D92H p.T318fsX1 p.L42P					g.5346_5377del							+	-	+	-	+	-			MSS		Sí	No	Sí			




**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

