



*Departamento de Medicina  
Unidad de Medicina Molecular*



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

**CARACTERIZACIÓN DE  
ALTERACIONES MOLECULARES  
EN TUMORES DE ENDOMETRIO**

*Tesis Doctoral*

**Mercedes Nolasco Lasso  
Octubre 2010**



DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DR. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo “Caracterización de alteraciones moleculares en tumores de endometrio” que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. Mercedes Núñez Lozano, si sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y, reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el comité evaluador correspondiente y optar al título de “Doctora en Farmacia” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 1 de Septiembre de 2010.

Fdo. Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Fdo. Dr. D. Juan Jesús Cruz Hernández

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

Durante el transcurso de este trabajo, Mercedes Núñez Lozano ha sido beneficiaria de una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Castilla y León (Orden EDU/1453/ 2005).

*"Conocemos la Verdad no solo por la Razón,  
sino por el Corazón"*

*Blaise Pascal (1623-1662)*

*A mis padres.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación por parte de la autora, su finalización no hubiese sido posible sin la enorme ayuda tanto científica como personal de las personas que, esperando hacer justicia, citaré en este espacio.*

*Al Dr. Rogelio González Sarmiento, por aceptarme para formar parte de su grupo y confiar en mí para el desarrollo de este trabajo. Por su entrega, ilusión y enseñanzas, las cuales han sido un constante estímulo a lo largo de esta etapa; y decisivas en mi formación como investigadora. Del mismo modo, al Dr. Juan Jesús Cruz Hernández, por su talante abierto, inmejorable disposición y gran profesionalidad.*

*A los Doctores Santiago Roperó de la Universidad de Alcalá de Henares y Juan Luis García del laboratorio 12 del CIC junto con Jose, por su asistencia en parte de los experimentos realizados, facilitando las líneas celulares de carcinoma endometrial, los ensayos de MS-MLPA y CGH.*

*Al Profesor Neumann del que ya es mi laboratorio adoptivo en Friburgo (Alemania), por su cortesía, bondad y su constante ayuda. A todos mis compañeros, Zoran por la gran amistad que desde entonces nos une, Aurelia por su generosidad, Tobias y Alex por su alegría, Gerit, Gani, Zina y Frau Reifsteck por su amabilidad y Mary, Maren y Janina por la gran acogida que recibí desde el laboratorio de las chicas. A todos estoy enormemente agradecida porque desde el primer momento me hicisteis sentir parte de esa gran familia que formáis. Vielen Danke!*

*Mi más sincera gratitud a Nieves Mateos y Estrella Muñoz, no sólo por su ayuda técnica y administrativa en este trabajo, sino por ser cada día Alma y Corazón del laboratorio.*

*A Irene, por su ayuda y entrega en el desarrollo de esta tesis interponiendo muchas veces su aprendizaje a la finalización de esta.*

*A mis compañeros, los que ya se fueron, todos un modelo a seguir, y a quienes deseo lo mejor en sus vidas. A Sandrita, mi primera maestra, Sergio, Pilar, Rosalía, Val, Nerea y Marta. Mis mayores agradecimientos por compartir conmigo vuestra sabiduría a pie de poyata. También a Esther, Xiana, Paula y Manu. Espero de todo corazón que la distancia no disipe nuestra amistad.*

*A mis compañeros actuales, los que persisten, Sara, Laura, Elena, Clara, y como no Irene. También en el CIC: Eva, Laurita, Dani, Jose Luis, Jesi, Catia, Chus, Mónica y Carlos. A todos vosotros por haber compartido conmigo un trocito del espacio-tiempo lleno de inmejorables momentos.*

*Mención especial merecen otros miembros del departamento como son Isabel Pastor, Marión Rascón, Jesús Pérez Losada y su grupo, Manolo del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y Encarna.*

*A mis amigos, los que siempre han estado y afortunada soy de contar con muchos. A Mónica, Lidia, Patri, Soraya, Nacho, Sandra, Néstor y el "coro" de Baltanás. A los últimos también, Alberto y Aída. Por darme muchos días felices y no dejar decaer mi ánimo.*

*Pero sobre todo a mis padres Jesús y Merche y a mi hermana Rebeca, porque sin ellos no sería nada, no habría llegado hasta aquí y no marcharía hacia delante. Por su amor absoluto y eternos desvelos. Por ayudarme a alcanzar mis sueños, creyendo en mí sin condiciones y haberme enseñado que toda lucha tiene su recompensa.*

*A mis abuelos, mis otros padres, los que me inculcaron valor y bondad. Aunque se encuentren tan lejos, siempre seguiré teniendo cerca.*

## ***DIFUSIÓN DE RESULTADOS***

● “Molecular Mechanisms of Endometrial Carcinoma: Study of Microsatellite Instability and Mutational Analysis of PTEN and PI3K genes”

**M. Núñez**, M. de Merino, N. Alonso, A. García, J. L. Lanchares, R. González-Sarmiento.  
XI ASEICA MEETING ON TRANSLATIONAL ONCOLOGY. Las Palmas de Gran Canaria,  
10-12 de Mayo de 2007. Comunicación Póster.

● “Study of PTEN and PIK3CA Mutations in Endometrial Carcinoma”

**M. Núñez**, I. Amigo, E. Serrano, M. Salas, A. García Iglesias, R. González-Sarmiento.  
XII NATIONAL CONGRESS ASEICA 2009. Madrid, 6-8 de Mayo de 2009. Comunicación Oral.

## SUMMARY

Endometrial carcinoma (EC) is one of the most frequent gynecological cancers in women. Although the molecular pathogenesis of the disease remains poorly understood. Different models suggest that the transition from normal endometrium to carcinoma is due to accumulation of alterations in many genes, defects in DNA repair system and epigenetic processes. Some of the most frequently mutated genes in EC are PTEN, PIK3CA, KRAS and BRAF,  $\beta$ -catenin, p53, p16 and E-Cadherin; all of which affect different signaling transduction pathways related to cell growth, differentiation, apoptosis, cell cycle progression, cell adhesion, etc. We analyzed these genes by PCR, conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) and automatic sequencing of the full coding region and the exon-intron boundaries in DNA obtained from 42 tumors of EC patients and in peripheral blood of 11 patients.

We identified mutations in PTEN in 57,1% of the cases, PIK3CA in 19%, KRAS in 14,3%, CTNNB1 in 19%, p53 in 23,8%, CDH1 in 4,8% and p16 in 2,4%. We also analysed the nature of certain mutations of PTEN, PIK3CA and p53 by cloning, endonuclease digestion, real time quantitative comparative PCR and Western blot in order to test allelic pertence of mutations, LOH and protein expression.

DNA mismatch repair system (MMR) defects results in an accumulation of mutations throughout the genome that can both alter normal function of proteins and trigger tumorigenesis in tissues. In order to examine the MMR system in EC, we evaluated microsatellite instability (MSI) of the tumors with 8 marker sequences (BAT25, BAT26, BAT40, MYCL1, PAX6, D2S123, D5S246 and D17S250). We also tested the MMR system by analyzing hMLH1 and hMSH2 genes, searching for genetic mutations and gross alterations in the sequence, and studying the methylation pattern of the promoter region of hMLH1. The methods used in these experiments, were PCR, CSGE, automatic sequencing, MS-MLPA, MLPA and real time quantitative comparative PCR.

Microsatellite instability was evident in 63,6% of the cases, mutations in hMLH1 gene in 4,8%, mutations in hMSH2 gene in 2,4% and gross alterations in both genes (one amplification and one deletion of the entire hMLH1 gene and one amplification and one three-exon amplification in hMSH2 gene) in 9,5% of the cases. The hMLH1 gene promoter was methylated in 38,1% of cases, hMSH2 in 21,4% of cases and hMSH6 in 26,2% of cases.

Finally, we studied histone deacetylases that are involved in post-transcriptional modification of nucleosomal histones and influence gene transcription regulation and protein expression. The expression of class I of HDAC (HDAC1, HDAC2 and HDAC3 proteins) is heterogeneous in EC. In order to find alterations in the histone deacetylase system in EC, we analyzed the truncating mutations in exon 1 of HDAC2 gene and the expression of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 proteins by Western blot.

Truncating mutations in exon 1 of HDAC2 gene were identified in 14,3% of the cases. The expression patterns of HDAC showed normal or high expression of three proteins in 60,5% of the cases, no expression of HDAC1 and HDAC3 in 13,2%, no expression of HDAC2 and HDAC3 in 7,9%, no expression of HDAC1 and HDAC2 in 5,2%, no expression of HDAC1 in 2,6% and no expression of the three proteins in 7,9%.

These results confirm the possibility of discrimination of EC by their genetic profile. We have also characterized novel mutations in PTEN and PIK3CA genes, rejecting the existence of recurrent mutations. The presence of mutations in both genes in the same tumors and a truncating mutation in PIK3CA that losses protein function suggest that these genes may act by different pathways in tumoral development.

Finally, genetic alterations of DNA repair genes are associated with EC. We have observed that PTEN mutations are related to promoter hypermethylation of DNA repair genes and not to MSI.

## ABREVIATURAS

- **ABD:** Dominio adaptador de unión.
- **AFX, FKHR, FKHL1:** factores Forkhead.
- **AIP1, NOXA, PUMA:** Genes proapoptóticos.
- **Akt/ PKB:** Proteína kinasa B.
- **AMPS:** Persulfato de amonio.
- **APC:** Gen “adenomatous polypous coli”.
- **API:** Aprotinina, epstatina, leupeptina.
- **ASK1:** Kinasa reguladora de la señal apoptótica 1.
- **ATP:** Adenosín trifosfato.
- **BAD:** Proteína que promueve la apoptosis.
- **BAI1, GD-AiF:** Genes angiogénicos.
- **BAX, BAK:** Factores proapoptóticos.
- **Bcl-2, Bcl-X, mcl-1:** Genes antiapoptóticos.
- **BER:** Reparación por escisión de bases.
- **bp:** Pares de bases.
- **BRAF:** Gen de la proteína B-raf.
- **BRCA1:** Gen de susceptibilidad al cáncer de mama.
  
- **BSA:** “Bovine Serum Albumin”, Seroalbúmina bovina.
- **C2:** Dominio proteico de unión a membranas.
- **CDH1:** Gen de E-Cadherina.
- **CDK:** Kinasas dependientes de ciclinas.
- **CDKN2A:** “Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A”, gen de p16.
- **cDNA:** DNA complementario.
- **CIAA:** Cloroformo y alcohol isoamílico.
- **c-IAP-1, c-IAP-2:** Genes de supervivencia celular.
- **CGH:** Hibridación genómica comparativa.
- **CGSE:** Electroforesis en gel sensible a la conformación.
  
- **CK2:** Caseína kinasa 2.
- **c-myc:** Oncogén de un factor de transcripción.
- **CpG:** Dinucleótidos CGs.
- **Ct:** Ciclo umbral.
- **CTNNB1:** Gen de  $\beta$ -catenina.
- **DBS:** Reparación de lesiones por rotura de doble cadena.
- **ddH<sub>2</sub>O:** Agua bidestilada.
- **DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- **DNA:** Ácido desoxiribonucleico.
- **DNMT1, DNMT3A, DNMT3B:** Metiltransferasas.
- **dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato.
  
- **EC:** Carcinoma endometrial.
- **EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético.
- **EIN:** Neoplasias intraepiteliares de endometrio.
- **eNOS:** Nitrógeno sintasa endotelial.
- **ESE:** “Exon splicing enhancers”, sitios exónicos de potenciación del procesamiento.
- **ER:** Receptores de estrógenos.
- **EXO1/HEXI, FEN1:** Exonucleasas.
- **Fas-1, IGFBP1, Bim:** Genes relacionados con el crecimiento y la apoptosis.
- **FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.
- **g:** Unidad de velocidad angular.
- **GADD45:** Factor inducible de parada del crecimiento y daño a DNA.
  
- **GAP:** Dominio de unión a ras.
- **GDP:** Guanosil difosfato.

- **GEF**: Factor intercambiador de nucleotidos de guanina.
- **GTP**: Guanosil trifosfato.
- **GTPasas**: Guanosina trifosfatasa.
- **GSK-3 $\beta$** : Glucógeno Sintasa Kinasa 3 $\beta$ .
- **H2A, H2B, H3, H4**: Proteínas histonas.
- **HAT**: Acetiltransferasas de histonas.
- **HDAC**: Acetilasas de histonas.
- **HDACI**: Inhibidor de HDAC.
- **HER2/neu**: Receptor de crecimiento epidermal humano 2, también conocido como ErbB-2.
- **hMLH1**: Gen homólogo a MutL 1 humano.
- **hMLH3**: Gen homólogo a MutL 3 humano.
- **HMT**: Metiltransferasas de histonas.
- **hMSH2**: Gen homólogo a MutS 2 humano.
- **hMSH6**: Gen homólogo a MutS 6 humano.
- **HNPCC**: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.
- **hPMS1**: Proteína de segregación post-meiotica 1 humana.
- **hPMS2**: Proteína de segregación post-meiotica 2 humana.
- **HRP**: Peroxidasa de rábano.
- **I- $\kappa$ B**: Inhibidor de NF- $\kappa$ B.
- **INK4**: Inhibidores de CDKs.
- **IPTG**: Inositolfosfato tiogalactósido.
- **Kb**: Kilobases (1000 bp).
- **KDa**: Kilodalton.
- **KRAS**: Oncogen de la familia de ras.
- **Lef** : Factor activador linfoide.
- **LOH**: Pérdida de heterocigosidad.
- **MAP**: (MEK-ERK-MAP) “Mitogen activated proteins”, proteínas activadoras mitogénicas.
- **MDM2**: proteína reguladora de p53.
- **miRNA**: Micro RNA.
- **MLPA**: “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”, PCR multiplex dependiente de ligación.
- **MMP-7**: Metaloproteínasa 7.
- **MMR**: Reparación de emparejamientos erróneos.
- **mRNA**: RNA mensajero.
- **mTOR**: “Mamalian target of Rapamicine”, diana de rapamicina en mamíferos.
- **MSI**: Inestabilidad de microsatélites.
- **mSin3A, NRD, CoREST**: Factores activadores que forman parte de los complejos HDAC.
- **MS-MLPA**: “Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”, PCR multiplex específica de metilación dependiente de ligación.
- **MSS**: Estabilidad de microsatélites.
- **MutS, MutL, MutH**: Complejos enzimáticos de reparación de DNA en procariontes.
- **MUTS $\alpha$** : Complejo formado por hMSH2 y hMSH6.
- **MUTS $\beta$** : Complejo formado por hMSH2 y hMSH3.
- **NAD+**: Nicotin adenina dinucleótido.
- **N-CoR, SMRT**: Factores represores que forman parte de los complejos HDAC.
- **NER**: Reparación por escisión de nucleótidos.
- **NES**: Secuencia de exportación nuclear.
- **NF- $\kappa$ B**: Factor nuclear  $\kappa$ B.
- **NFR**: Regiones libres de nucleosomas.
- **NLS**: Secuencia de localización nuclear.
- **NP40**: Detergente tensioactivo.
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud.
- **PARP**: Poli ADP-ribosapolimerasas.
- **PBS**: Tampón fosfato salino.
- **pCAF**: Factor asociado a p300.
- **PCNA**: Antígeno nuclear de proliferación celular.
- **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.

- **PDZ:** Dominio de señalización de proteínas.
- **PH:** Dominio homólogos a plestrina.
- **PHTS:** Síndrome “PTEN Hamartoma Tumor”.
- **PI3K:** Fosfatidilinositol-3-fosfato kinasa.
- **PIK3CA:** Oncogén de la subunidad catalítica de PI3K (p110 $\alpha$ ).
- **PIK3CB:** Gen de la subunidad catalítica PI3K (p110 $\beta$ ).
- **PIK3CD:** Gen de la subunidad catalítica PI3K (p110 $\delta$ ).
- **PIP2:** Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato.
- **PIP3:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.
- **PKB:** Proteína Kinasa B.
- **PTEN:** Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, también llamado MMAC1 o TEP1.
- **PR:** Receptores de progesterona.
- **pRB:** Proteína retinoblastoma.
- **Rad51:** Proteína para la recombinación homóloga de cromosomas.
- **raf-1, A-raf, B-raf, C-raf:** Familia de los genes raf.
- **RBD:** Dominio de unión a ras.
- **Rho:** Proteína GTPasa de la familia de ras.
- **RIPA:** Tampón de lisis celular y solubilización de proteínas.
- **RFC:** Factor de replicación C.
- **RNA:** Ácido ribonucleico.
- **r.p.m.:** Revoluciones por minuto.
- **SAPK:** Proteínas kinasas activadoras de estrés.
- **SDS:** Dodecil Sulfato Sódico.
- **SDS-PAGE:** Electroforesis de geles de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico.
- **SH2/SH3:** Dominio homólogo a Src 2 y 3.
- **SIN3:** Proteína con hélices anfipáticas emparejadas, regulador de la transcripción.
- **SNP:** Polimorfismo de un único nucleótido.
- **SIRT:** Proteínas sirtius.
- **TBE:** Tampón tris, borato, EDTA.
- **TBS-T:** Tampón Tris salino-Tweed.
- **Tcf:** Factor de células T.
- **TEMED:** N, N, N, N' Tetrametilendiamina.
- **Tm:** Temperatura de fusión.
- **TP53:** Gen de p53.
- **UV:** Ultra violeta.
- **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular.
- **Wnt:** Ruta de señalización intracelular Wingless-Int.
- **X-Gal:** X galactosa.

# ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA</b>	
<b>ENDOMETRIAL.....</b>	<b>1</b>
<b>CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CARCINOMA</b>	
<b>ENDOMETRIAL.....</b>	
<b>2</b>	
<b>CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CARCINOMA</b>	
<b>ENDOMETRIAL.....</b>	<b>3</b>
<b>DESARROLLO DE LOS CARCINOMAS</b>	
<b>ENDOMETRIALES.....</b>	<b>8</b>
<b>FACTORES DE RIESGO DEL CARCINOMA</b>	
<b>ENDOMETRIAL.....</b>	<b>9</b>
<b>CARCINOMA ENDOMETRIAL NO</b>	
<b>ESPORÁDICO.....</b>	<b>9</b>
<b>PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CARCINOMA</b>	
<b>ENDOMETRIAL.....</b>	<b>10</b>
1. PTEN.....	10
2. PI3K.....	13
3. RUTA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE PTEN Y PI3K.....	15
4. KRAS.....	17
5. BRAF.....	1
8	
6. $\beta$ -CATENINA.....	19
7. E- CADHERINA.....	21
8. p53.....	22
9. p16.....	2
5	
10. REPARACION DE DNA.....	26
10.1. Mecanismo de Reparación de Emparejamientos Erróneos (MMR).....	27
10.2. Inestabilidad de Microsatélites (MSI).....	29
10.3. Alteraciones en los Genes de MMR.....	30
<b>EPIGENÉTICA.....</b>	<b>30</b>
1. METILACIÓN DE DNA.....	31
2. MODIFICACIÓN DE HISTONAS.....	33
2.1. Deacetilasas de Histonas (HDAC).....	34
2.2. Otros Efectos Post-Traduccionales de Histonas.....	37
3. REMODELAMIENTO DE LA CROMATINA.....	37
	<b>Pag.</b>
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>III. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>1. PACIENTES.....</b>	<b>41</b>

1.1. TEJIDO TUMORAL.....	41
1.2. SANGRE PERIFÉRICA.....	41
<b>2. OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE TEJIDO TUMORAL Y SANGRE PERIFÉRICA.....</b>	<b>41</b>
<b>3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. TEJIDO TUMORAL.....	43
3.2. LINEAS CELULARES.....	43
<b>4. ESTUDIO MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS CON EL CARCINOMA ENDOMETRIAL.....</b>	<b>43</b>
4.1. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR (“Polymerase Chain Reaction”).....	43
4.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	44
4.3. DETECCIÓN DE MUTACIONES MEDANTE CSGE-HETERODÚPLEX.....	45
4.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR.....	46
4.5. SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	46
4.6. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE CARCINOMA ENDOMETRIAL.....	47
4.6.1. Análisis del gen PTEN .....	47
4.6.2. Análisis del gen PIK3CA .....	47
4.6.3. Análisis del gen KRAS .....	48
4.6.4. Análisis del gen BRAF .....	49
4.6.5. Análisis del gen CTNNB1 .....	49
4.6.6. Análisis del gen TP53 .....	50
4.6.7. Análisis del gen CDH1 .....	50
4.6.8. Análisis del gen CDKN2A .....	51
	<b>Pag.</b>
4.6.9. Análisis del gen hMLH1 .....	52
4.6.10. Análisis del gen hMSH2 .....	53
4.6.11. Análisis del exón 1 del gen HDAC2 .....	53
4.7. ESTUDIOS DE PERTENENCIA ALÉLICA DE MUTACIONES EN EL GEN PTEN.....	54
4.8. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD DEL GEN PTEN MEDIANTE DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS.....	56
4.9. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD DE TP53 MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA.....	57
4.10. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).....	61
4.11. ANÁLISIS DE GRANDES ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DE LOS GENES hMLH1 Y hMSH2.....	63
4.11.1. MLPA (“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”).....	63

4.12. ANÁLISIS DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES hMLH1, hMSH2 y hMSH6.....	68
4.12.1. MS-MLPA (“Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.....	68
<b>5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CARCINOMA ENDOMETRIAL.....</b>	<b>7</b>
0	
5.1. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL.....	70
5.2. WESTERN BLOT.....	71
<b>6. MÉTODOS INFORMÁTICOS.....</b>	<b>74</b>
5.1. PROGRAMAS PARA ESTUDIOS <i>IN SÍLICO</i> DE MUTACIONES NO DESCRITAS.....	74
5.2. BASES DE DATOS.....	77
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANÁLISIS DE GENES IMPLICADOS EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.....</b>	<b>80</b>

	<b>Pag.</b>
1. ANÁLISIS DE GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	80
1.1. PTEN.....	80
1.1.1. Análisis mutacional del gen PTEN.....	80
1.1.2. Estudios de pertenencia alélica de mutaciones en el gen PTEN en casos con múltiples mutaciones.....	85
1.1.3. Estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) del gen PTEN en casos con mutaciones homocigotas.....	86
1.1.4. Análisis de expresión de la proteína PTEN.....	86
1.2. TP53.....	89
1.2.1. Análisis mutacional del gen TP53.....	89
1.2.2. Estudios de pérdida de heterocigosidad del gen TP53.....	91
1.3. CDH1.....	91
1.4. CDKN2A.....	93
2. ANÁLISIS DE ONCOGENES.....	95
2.1. PI3K.....	95
2.1.1. Análisis mutacional del gen PIK3CA.....	95
2.1.2. Análisis de expresión de la subunidad p110 $\alpha$ de PI3K.....	98
2.2. KRAS Y BRAF.....	101
2.3. CTNNB1.....	102
<b>ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN REPARADORA DEL DNA EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.....</b>	<b>102</b>
1. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	102

2.	ANÁLISIS DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA MAQUINARIA DE MMR.....	103
2.1.	Análisis de metilación de los promotores de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6.....	103
2.2.	Análisis mutacional del gen hMLH1.....	105
2.3.	Análisis mutacional del gen hMSH2.....	106
2.4.	Análisis de grandes alteraciones de los genes hMLH1 y hMSH2.....	107

**Pag.**

---

**ANÁLISIS DE LAS DEACETILASAS DE HISTONAS EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.....111**

1.	ANÁLISIS MUTACIONAL DEL EXÓN 1 DEL GEN HDAC2.....	111
2.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HDAC1, HDAC2 Y HDAC3.....	111

**V. DISCUSIÓN.....115**

1.	ESTUDIO DEL GEN PTEN.....	119
2.	ESTUDIO DEL GEN PIK3CA.....	124
3.	ESTUDIO DE LOS GENES KRAS Y BRAF.....	127
4.	ESTUDIO DEL GEN CTNNB1.....	129
5.	ESTUDIO DEL GEN TP53.....	130
6.	ESTUDIO DEL GEN CDH1.....	131
7.	ESTUDIO DEL GEN CDKN2A.....	132
8.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN REPARADORA DE DNA EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.....	133
11.	IMPLICACIONES DE HDAC EN CARCINOMA ENDOMETRIAL.....	136

**VI. CONCLUSIONES.....140**

**VII. BIBLIOGRAFÍA.....14**

2

**VIII. ANEXOS.....162**

# ***Introducción***



El útero es el lugar donde se produce la gestación durante el embarazo y por ello está sujeto a gran cantidad de cambios hormonales y modificaciones estructurales que varían cíclicamente. Este órgano se divide en tres partes: fondo, que es el extremo superior redondeado desde el cual se extienden las trompas de Falopio; cuerpo que es la región expandida donde ocurre la implantación del embrión; y cuello que es la porción cilíndrica inferior donde se encuentra la abertura (figura 1). Dentro de esta organización, el cuerpo es la región que presenta mayor complejidad estructural; está constituida por tres capas: una capa mucosa o endometrio, colocada en la parte más interna del útero, una capa muscular y una capa serosa externa. De todas estas capas, es en el endometrio en la que se desarrollan la mayoría de los tumores del tracto genital femenino. La patogénesis molecular del carcinoma endometrial todavía no está completamente comprendida debido a la gran variedad de tipos histológicos y a los múltiples y heterogéneos factores de riesgo, ambientales y genéticos, que la desencadenan.

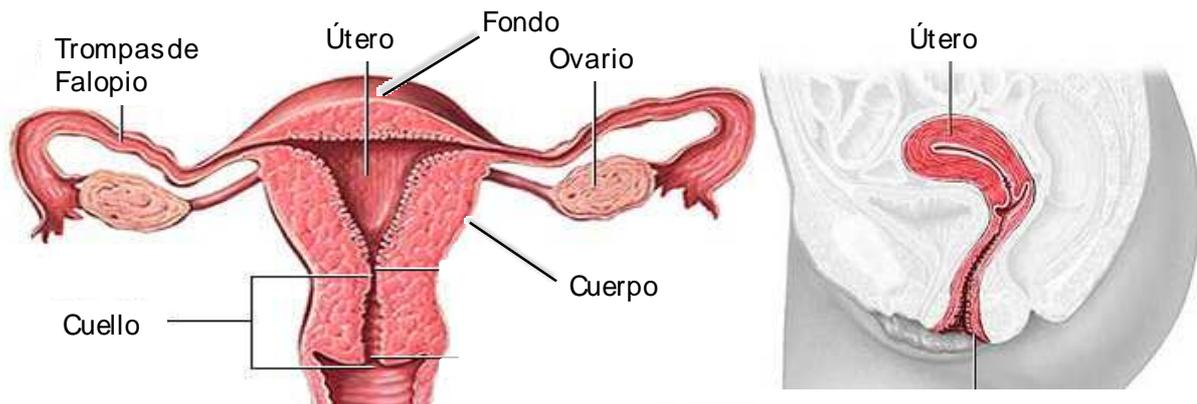


Figura 1, Cortes transversal y longitudinal del aparato reproductor femenino donde se observa la anatomía del útero.

## EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

El carcinoma endometrial se encuentra entre los tres cánceres más comunes en mujeres en la mayoría de los países industrializados, con una incidencia de aparición de 15 a 20 casos por cada 100.000 mujeres al año<sup>1</sup>. El pico de incidencia de la enfermedad se encuentra en mujeres entre 50 y 70 años, diagnosticándose el 75% de los casos en mujeres post-menopáusicas. Otra de las características epidemiológicas de este tipo de tumores es su buen pronóstico ya que se diagnostica generalmente en etapas precoces (80% en estadio I). En estadios más avanzados de la enfermedad las posibilidades de supervivencia empeoran progresivamente, siendo responsable del 3% de las muertes por cáncer en el mundo. El 95% de todos los casos son esporádicos, mientras que el 5% de las pacientes diagnosticadas de esta enfermedad a edad temprana tiene una historia familiar de cáncer, es decir, son de origen hereditario<sup>2</sup>.

## CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

El carcinoma endometrial de origen esporádico se ha clasificado en dos grupos en base a sus características clínico-patológicas<sup>3</sup> (tabla 1). Los tumores de tipo I o endometrioides, que constituyen la mayoría de los casos de carcinoma endometrial esporádico (aproximadamente el 80%), son de grado bajo, dependientes de estrógeno y suelen tener buen pronóstico. Generalmente se desarrollan en mujeres pre y post-menopáusicas y coexisten o son precedidos por hiperplasias complejas atípicas o hiperplasias endometriales. La aparición de estos carcinomas se asocia con obesidad, hiperlipemia, anovulación, infertilidad y menopausia tardía. Por el contrario, los tumores de tipo II son carcinomas no endometrioides, principalmente papilares, serosos y carcinomas de células claras, que aparecen mayoritariamente en mujeres de edad avanzada. Estos últimos son tumores agresivos y no relacionados con estimulación estrogénica, en los que aparecen ocasionalmente pólipos endometriales o atrofia endometrial como lesiones precancerosas. Los tumores de tipo I están asociados con inestabilidad de microsatélites (MSI) y alteraciones en la maquinaria de emparejamiento erróneos de DNA (MMR)<sup>4,5,6</sup>, así como con mutaciones en los genes PTEN<sup>7,8,9</sup>, KRAS<sup>10,11,12,13</sup>, y  $\beta$ -catenina<sup>14,15,16</sup>. Los tumores de tipo

II presentan mutaciones en p53<sup>12,17,18</sup>, pérdidas de heterocigosidad (LOH) en varios cromosomas<sup>19</sup> y otras alteraciones moleculares en p16<sup>20</sup>, E-Cadherina<sup>21,22</sup> y HER2/neu<sup>23</sup>. El desarrollo de los tumores endometriales se han explicado con modelos de progresión tumoral, postulados primeramente para el cáncer colorrectal por Volgestein (1988)<sup>23</sup>, en los que el tejido endometrial sano se transforma en carcinoma endometrial debido a acumulación de alteraciones moleculares. Esta hipótesis se sustenta en varias características de los carcinomas endometriales, como son:

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

**Tabla 1, Clasificación del carcinoma endometrial en base a sus características clínico-patológicas y moleculares.**

Parámetros	TIPO I	TIPO II
<b>Incidencia</b>	80%	<= 20%
<b>Edad</b>	Pre-postmenopausicas	>60 años
<b>Histología</b>	Endometroide	Serosas, claras, no endometroide
<b>Diferenciación celular</b>	Bajo grado	Alto grado
<b>Lesión precursora</b>	Hiperplásica	Atrófica
<b>Estimulación estrogénica</b>	Relacionado	No relacionado
<b>Comportamiento clínico</b>	No agresiva	Agresiva
<b>Alteraciones genéticas</b>	MSI, PTEN, KRAS, β-catenina	p53, LOH, p16, E-Cadheria, HER2/neu

Por otro lado, una pequeña minoría de carcinomas endometriales no muestra una separación tan clara para las características clínico-patológicas y moleculares lo que parece indicar que ciertos tumores de tipo II podrían originarse a partir de tumores endometrioides (tipo I) preexistentes y por tanto, compartir características de ambas clases<sup>24</sup>.

## CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

La clasificación y el estadiaje de los carcinomas endometriales se realiza mediante los criterios y recomendaciones establecidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2000<sup>25</sup> (tabla 2).

Estos organismos establecen una clasificación en base al grado de diferenciación tumoral, siendo:

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

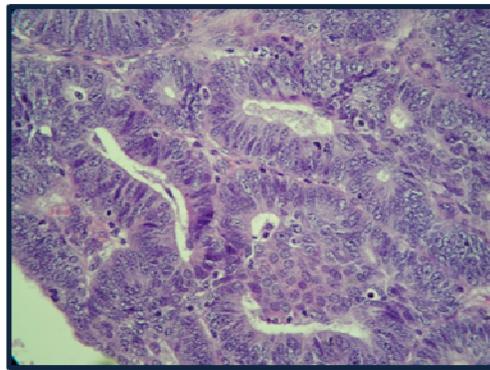
**Tabla 2, Clasificación de los carcinomas de endometrio por la OMS.**

2
---

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

Aunque los tumores no endometrioides son de alto grado por definición y no necesitan ser clasificados, el grado como parámetro diagnóstico cobra especial importancia en los tumores endometrioides ya que su clasificación varía desde diferenciados a casi no diferenciados<sup>26</sup>.

El carcinoma endometriode es un tumor por lo general de tipo I. Representa el 90% de todos los tumores epiteliales de endometrio y el 80% de todos los uterinos. Las glándulas forman ramas en las que casi no interviene el estroma. Los distintos grados vienen determinados por la proporción de lesiones que forman las glándulas y por su morfología nuclear. Suele tener buen pronóstico<sup>26</sup> (figura 2).



**Figura 2, Carcinoma endometrial endometriode, tinción hematoxilina-eosina.**

La variante con diferenciación escamosa muestra áreas con discreta diferenciación o 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 pronóstico<sup>27</sup>.

La variante papilar o villoglandular tiene por lo general características bien diferenciadas en el epitelio endometrial de los fondos papilares. Estos tumores no son peores que los de grado 2 y muestran un comportamiento similar a los carcinomas endometrioides<sup>28</sup>.

La 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<sup>29,30</sup> y núcleos pequeños e hiper cromáticos, característica por la que se diferencia del carcinoma de células claras.

La 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 normal<sup>31</sup>.

El carcinoma mucinoso representa un 1% de todos los tumores uterinos y se localiza en la endocervix. Es un tumor raro, de bajo grado cuyas células muestran mucina intracitoplasmática; además de tener buen pronóstico<sup>32,33</sup>. La diferenciación de este tumor con la metaplasia mucinosa de endometrio suele representar mayor dificultad en el diagnóstico. Este tipo de tumor exhibe proliferación atípica de epitelio con estratificación nuclear, pérdida de polaridad celular, mitosis atípicas, arquitectura anormal de las glándulas con prolongaciones, brotes glandulares, etc<sup>28</sup>. Por el contrario, la metaplasia mucinosa de endometrio no presenta anomalías en los núcleos o la arquitectura celular.

El adenocarcinoma microglandular de endometrio presenta una morfología característica en láminas de células o pequeñas glándulas fuertemente empaquetadas, a menudo con pequeñas intervenciones del estroma. El tejido se encuentra de forma frecuente plagado de células polimórficas dándole un aspecto de hiperplasia microglandular de la cérvix. Generalmente carece de vacuolas subnucleares y puede presentar metaplasia escamosa y estromal de células espumosas. El núcleo no es muy prominente a pesar de que se vean múltiples mitosis<sup>33</sup>.

El carcinoma 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 miometrio<sup>34</sup>. Suelen ser normales las colonizaciones del abdomen<sup>28</sup> aunque no depende de la profundidad de la invasión miometrial. Debido a este poder invasivo, suelen registrarse casos de metástasis<sup>34</sup>. 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 ocasionales formas multinucleares, muchos de ellos bizarros y pocas mitosis atípicas (figura 3). Todo esto es considerado de alto grado. Presentan frecuentes cuerpos psamomatosos que a veces no están asociados con células tumorales cuando aparecen calcificaciones<sup>35</sup>. 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 diferencia<sup>29</sup>.

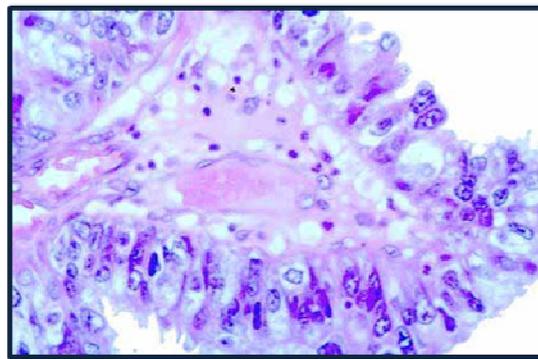


Figura 3, Carcinoma endometrial seroso, tinción hematoxilina-eosina.

El carcinoma 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 endometriode<sup>36</sup>. 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 desarrollo<sup>37</sup>. El tumor está compuesto de células claras con glucógeno o también células en forma de "hornails" creciendo en láminas, acinos lineares, cistos o papilas<sup>30</sup>. No presenta una localización concreta (figura 4).

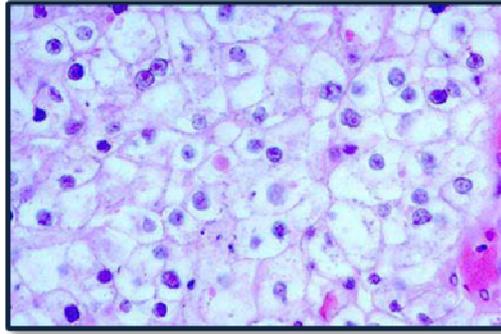


Figura 4, Carcinoma endometrial de células claras, tinción hematoxilina-eosina.

El carcinoma mixto 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 II. Tiene mal pronóstico<sup>28</sup>.

El carcinoma escamoso es un tumor raro de bajo grado, que se presenta con secreciones y sangrados. Se localiza en la ectocervix o la vagina y el diagnóstico suele ser difícil por biopsia ya que se puede confundir con epitelio ectocervical normal<sup>38</sup>.

El carcinoma transicional es otro tipo raro de carcinoma endometrial que se asemeja a células transicionales de carcinoma de bazo<sup>28</sup>.

El carcinoma de células pequeñas es un tipo de tumor agresivo que reacciona a los marcadores neuroendocrinos comunes<sup>39</sup> y muestra gránulos densos típicos por microscopía electrónica. 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 distintivas<sup>28</sup>. Los componentes del carcinoma de células pequeñas se pueden confundir con otra variante del carcinoma endometriode llevando a una posible confusión con los carcinosarcomas<sup>40</sup>.

Los sarcomas de endometrio representan del 2 al 5 % de los tumores uterinos y sus variantes más frecuentes son carcinosarcoma, leiomiomasarcoma y sarcoma del estroma. La variante carcinosarcoma constituye el 50% de este tipo. También se les llama tumores mulerianos mixtos, están formados por una mezcla de epitelio maligno generalmente adenocarcinoma endometriode con una componente estromal. Los elementos epiteliales y estromales están predominantemente separados. Muchos de ellos muestran un alto grado de estroma, aunque un 16% tiene como característica bajo grado<sup>40</sup>. La variante leiomiomasarcoma 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 al estroma endometrial con células hiper cromáticas pequeñas, redondas o alargadas y que presenta frecuentemente varios grados de atipia y gran actividad mitótica<sup>28</sup>.

## DESARROLLO DE LOS CARCINOMAS ENDOMETRIALES

El carcinoma de endometrio se origina en el revestimiento epitelial de la cavidad uterina. El tumor crece infiltrándose localmente en la pared del útero y afectando progresivamente a las capas musculares y a la serosa. La capacidad de infiltración está relacionada con el grado de diferenciación tumoral. En tumores bien diferenciados, el crecimiento se suele limitar a la superficie endometrial, mientras que en los poco diferenciados la invasión es mayor llegando hasta el miometrio. A partir de ahí, la invasión continua al cérvix, vagina, vejiga y recto. La infiltración de la pared uterina se relaciona con la probabilidad de afectación ganglionar y, por consiguiente, de metástasis<sup>28</sup>.

Los carcinomas endometriales son consecuencia de la acumulación de alteraciones moleculares, genéticas y epigenéticas, que aparecen en diferentes regiones del genoma. Éstas incluyen tanto a proto-oncogenes, como a genes supresores de tumores y genes relacionados con procesos de reparación de

DNA. El efecto acumulativo de estas alteraciones en el carcinoma endometrial de tipo I produce la transición de células endometriales normales a hiperplasia endometrial atípica y posteriormente a carcinoma<sup>8,41</sup>. Sin embargo, el carcinoma de tipo II puede ir precedido de lesiones premalignas de gran utilidad clínica. Estas lesiones llamadas neoplasias intraepiteliares de endometrio (EIN), pueden ser reconocidas por tinciones de secciones de tejido y sometidas a estudios morfométricos. Aproximadamente, de un 5 a un 8% de estas lesiones premalignas progresan a carcinoma, por lo que es importante su detección. A día de hoy la clasificación de las lesiones EIN consiste en la determinación de parámetros moleculares, histomorfométricos y clínicos<sup>42</sup>.

Los parámetros anatomopatológicos empleados en el diagnóstico de carcinoma de endometrio en la actualidad se dividen en uterinos y extrauterinos. Los parámetros uterinos son: tipo histológico, grado histológico, grado de invasión del miometrio, presencia de invasión vascular, presencia de hiperplasia endometrial atípica, relación cervical con el carcinoma, ploidía del DNA, fracción celular en fase de síntesis del ciclo celular y estado de los receptores hormonales. Por el contrario los factores extrauterinos incluyen citología peritoneal positiva, relación con las glándulas adrenales, metástasis en nodos linfáticos pélvicos y para-aórticos, y metástasis peritoneal<sup>24,42</sup>.

## FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CARCINOMA ENDOMETRIAL

En el desarrollo del carcinoma endometrioide juega un papel fundamental la exposición hormonal, bien sea endógena o exógena, ya que estas moléculas promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Este tipo de tumores muestra sobreexpresión de los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR)<sup>43</sup>. Por el contrario, en los tumores no endometrioides, no ha habido una identificación de factores hormonales hasta el momento, siendo la expresión de receptores hormonales débil o negativa<sup>44</sup>.

Otros de los factores de riesgo conocidos que se asocian con esta enfermedad son la obesidad, la hipertensión, la diabetes mellitus, la nuliparidad, la menarquía temprana y la menopausia tardía; muchos de ellos relacionados con los estilos de vida de las pacientes y con las características de su vida fértil<sup>2</sup>.

## CARCINOMA ENDOMETRIAL NO ESPORÁDICO

Los procesos tumorigénicos de los carcinomas endometriales hereditarios son diferentes a los de los carcinomas esporádicos. La mayoría de los casos de cáncer de endometrio hereditario se asocian con Síndrome de Lynch o cáncer hereditario colorrectal no polipósico (HNPCC)<sup>45</sup>. Este síndrome autosómico dominante predispone a los afectados a padecer varios tipos de tumores como son cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer de ovario, etc. Generalmente, el síndrome de Lynch se manifiesta de forma predominante como cáncer colorrectal; no obstante, en mujeres la incidencia de carcinoma endometrial se equipara con la aparición de cáncer de colon o incluso la supera<sup>46</sup>. El síndrome se caracteriza por la presencia de mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación de DNA como son hMLH1, hMSH2, hMSH6 y hPMS2; todos pertenecientes a la maquinaria de corrección de emparejamientos erróneos o MMR. De estos genes, hMLH1 y hMSH2 son los responsables de hasta un 90% de las alteraciones aparecidas en cáncer de colon relacionadas con este síndrome, mientras que los que presentan mayor probabilidad de contener mutaciones en carcinoma endometrial no esporádico son los genes hMSH2 y hMSH6, y particularmente este último cuando las pacientes presentan edades avanzadas<sup>47</sup>.

Todas estas alteraciones producen deficiencias en la reparación del DNA, haciendo que proliferen los fallos de secuencia en otras regiones del genoma 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 MMR<sup>48</sup>.

# PATOGENESIS MOLECULAR DEL CARCINOMA ENDOMETRIAL

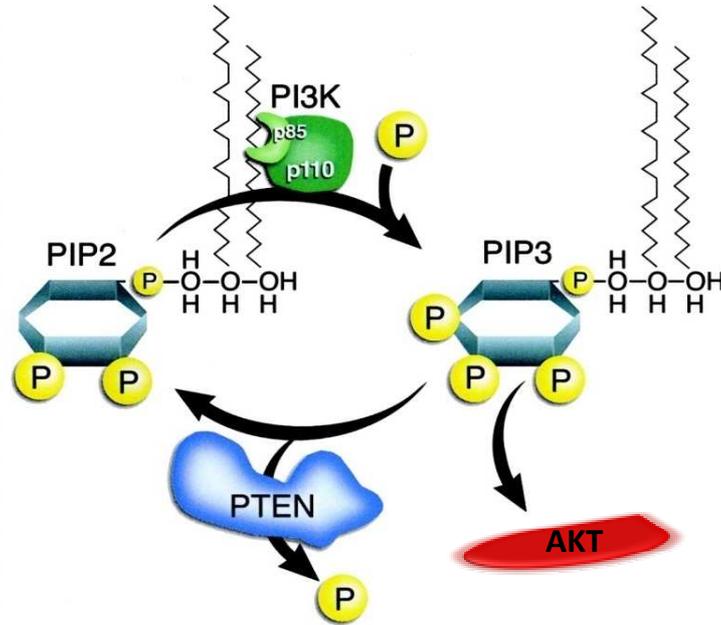
## 1. PTEN

El gen supresor de tumores PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), también llamado MMAC1 o TEP1, fue clonado en 1997 y localizado en el cromosoma 10q23, región donde se encontraban deleciones somáticas en multitud de tumores<sup>49,50</sup>.

Este gen está formado por 9 exones codificantes y produce una proteína de 403 aminoácidos con una masa molecular de 47 KDa aproximadamente<sup>51</sup>. La secuencia de aminoácidos del gen PTEN revela que su estructura corresponde a una fosfatasa, enzima que facilita la eliminación de los grupos fosfato de otras macromoléculas, y pertenece a las proteínas de la superfamilia de fosfatasas de tirosina. Además, también contiene una secuencia que codifica un dominio catalítico con cierta homología a proteínas del citoesqueleto, lo que sugiere que PTEN podría regular procesos como la invasión tumoral y metástasis, aunque este supuesto todavía no se ha aclarado<sup>52</sup>.

La proteína PTEN está formada por cinco dominios: el extremo amino terminal donde se encuentra el dominio catalítico fosfatasa; una parte central donde se encuentra el dominio C2, que es la zona a través de la que establece uniones con otras proteínas y lípidos, entre ellos los lípidos de membrana<sup>52,53</sup>, secuencias PEST, que son regiones ricas en aminoácidos prolina, glutamato, aspartato, serina y treonina que juegan un papel destacado en el reconocimiento del proteosoma y la degradación de la proteína<sup>54</sup>. Los últimos 50 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína contienen un dominio de unión PDZ, motivo que le permite unirse a proteínas de andamiaje con otros dominios PDZ<sup>55,56</sup>, y sitios de fosforilación para CK2 (caseína quinasa 2) que le permiten regular su función<sup>57</sup>. La estructura cristalográfica de PTEN muestra su centro catalítico más ancho y profundo que el del resto de las fosfatasas de la misma familia<sup>54</sup>.

La función de PTEN es, como ya se ha apuntado anteriormente, actuar como una fosfatasa<sup>50,52</sup>. Aunque esta actividad comprende la posibilidad de defosfatar tirosinas, también tiene la capacidad de actuar sobre serinas y treoninas aunque esta actividad es minoritaria<sup>58</sup>. PTEN está considerado gen supresor de tumores, dedicando la actividad fosfatasa de la proteína que codifica, a la eliminación de fosfatos de compuestos formados en la membrana plasmática como son el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) y el fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2). Estos compuestos son dos segundos mensajeros formados a partir de señales extracelulares como es la activación de receptores de membrana, que posteriormente son fosforilados por acción de la proteína fosfatidilinositol-3-fosfato quinasa (PI3K). Los compuestos formados transducen una señal en las células a través de la ruta de activación de la proteína Akt, también conocida como PKB (proteína quinasa B), una serina-treonina quinasa. Cuando estos compuestos pierden su fosfato en la posición D3 por la acción fosfatasa de PTEN, inactivan la señal iniciada, creándose así un mecanismo “on/off” para las señales generadas<sup>51,59</sup> (figura 5). El papel de PTEN como interruptor “off” de la señal producida por PI3K es una de las claves para atribuirle la función como gen supresor de tumores.



**Figura 5, Actividad “on/off” del sistema PTEN/PI3K donde se fosforilan y defosforilan 2º mensajeros generados en la membrana plasmática como PIP2.**

La cascada intracelular en la que actúan tanto PTEN como PI3K para la activación/desactivación de la proteína Akt, contiene multitud de consecuencias para la célula, entre las que se encuentran: regulación del ciclo celular y supervivencia, adhesión y motilidad celular, angiogénesis, homeostasis de la glucosa, crecimiento celular y apoptosis, entre otras muchas<sup>9,50,51</sup>.

Además de su actuación en la ruta de Akt, PTEN tiene otros efectores pertenecientes a otras rutas de señalización diferentes, entre los que se encuentran GTPasas de la familia de Rho que participan en procesos tales como motilidad celular, alteración de la membrana y diseminación celular. Todos estos procesos están relacionados con la capacidad tumorigénica de la célula en procesos invasivos<sup>9</sup>.

PTEN se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, aunque se ha descrito también una localización nuclear. Esta localización coincide con la función que desempeña, interaccionando con las membranas para acceder a sus sustratos lipídicos. En este sentido, hay datos que sugieren que tanto el dominio fosfatasa como el C2, se encuentran relacionados con uniones electrostáticas entre PTEN y las membranas para un mayor aumento de la eficacia catalítica<sup>60,61</sup>. Por otro lado, la mayoría de las moléculas de PTEN son fosforiladas en sus extremos carboxilo terminales, lo que parece mantener a la proteína en una conformación tal que bloquea su asociación a la membrana, sugiriendo que en este nivel existe un importante mecanismo de regulación de la actividad biológica de la proteína<sup>56,57</sup>. Este mecanismo no es el único que regula la actividad de PTEN, sino que hay descritos otros muchos que operan a nivel transcripcional y por oxidación<sup>61</sup>.

Las alteraciones germinales en el gen PTEN se han relacionado con varios síndromes hereditarios, como el síndrome de Cowden. La relación de PTEN con este síndrome se conoce desde 1996 cuando se determinó que el locus para esta enfermedad se encontraba en la región 10q23, es decir, la que contenía el gen<sup>62</sup>. Esta enfermedad presenta mutaciones en PTEN en un 80% de los casos y se caracteriza por el desarrollo de hamartomas en folículos pilosos, membranas microcutáneas, alteraciones en pecho, tiroides y tejido intestinal, además confiere riesgo de aparición de tumores de endometrio y tracto genitourinario<sup>62</sup>. Mutaciones en PTEN también se han relacionado con el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, donde aparece mutado en un 60% de los casos y se caracteriza por macrocefalia, lipomatosis, hemangiomas y pene moteado. Los afectados, además, tiene alto riesgo de desarrollar cáncer de mama y tiroides<sup>63</sup>. También se ha encontrado en otros síndromes mucho menos frecuentes relacionados con Cowden como el síndrome de Proteus y de Bannayan-Zonana<sup>64</sup>. Es por esta variedad de síndromes relacionados con un mismo gen por lo que se propone clasificarlos dentro del síndrome llamado “PTEN Hamartoma Tumor” (PHTS) independientemente de la clínica de cada uno de ellos<sup>64</sup>.

Las alteraciones somáticas en el gen PTEN son un evento frecuente en los glioblastomas de alto grado<sup>65</sup>, cánceres de próstata<sup>66</sup> y endometrio<sup>67,68</sup>. La inactivación bialélica del gen ocurre en el 30-40% de los glioblastomas multiformes y, en menor término, en astrocitomas anaplásicos<sup>69</sup>. Aún así, es raro que se encuentren en gliomas de bajo grado y tumores neuronales<sup>70</sup>.

Las deleciones heterocigotas en la región 10q23 son un evento frecuente en tumores metastásicos de próstata, en los que la pérdida de heterocigosidad (LOH) se encuentra entre un 20 al 60% de los casos<sup>66</sup>. Además, la pérdida de la proteína PTEN ocurre en un 20% de los tumores primarios de próstata y esta pérdida tiene una estrecha correlación con los tumores avanzados<sup>71</sup>.

En los tumores endometriales, las mutaciones en PTEN parecen ser la casusa del desarrollo tumoral en hasta un 80% de los casos de tipo endometriode, siendo PTEN el gen más comúnmente mutado en este tipo de tumores<sup>67,68,72</sup>. Las mutaciones encontradas en el gen PTEN comprenden alteraciones de tipo “missense”, mutaciones sin sentido “nonsense”, deleciones e inserciones que alteran la fase de lectura o “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 p53<sup>7</sup>. Aunque las mutaciones truncantes y las “missenses” han sido encontradas en los nueve exones de PTEN, sólo las mutaciones de tipo “missense” tienden a agruparse en la región del dominio catalítico fosfatasa. Las mutaciones localizadas en esta región, pueden disminuir la actividad inositolfosfatasa de PTEN<sup>73</sup>, y las mutaciones localizadas fuera de los exones 5, 6 y 7, es decir, fuera de los dominios implicados en la actividad fosfatasa y de unión a proteínas y lípidos, se asocian con una mayor supervivencia a las pacientes<sup>74</sup>.

La hipermetilación de islas CpG de los promotores de los genes supresores de tumores es una característica muy observada en muchos de los tumores de origen esporádico y parece ser un mecanismo epigenético de silenciamiento génico alternativo a mutaciones y deleciones que pudieran tener estos genes<sup>75</sup>. PTEN es un gen que muestra este tipo de alteración tumores de próstata<sup>71</sup>, melanoma<sup>76</sup> y endometrio<sup>77</sup>. En este último, hay controversia sobre cómo afecta este proceso al desarrollo tumoral, ya que por una parte se ha asociado con carcinoma endometrial en etapas avanzadas y con la aparición de metástasis<sup>78</sup>, constituyendo el “second-hit” para el desarrollo del carcinoma endometrial; mientras que, también se ha descrito como una alteración temprana en el desarrollo de los carcinomas endometriales<sup>79</sup>. Aun así, los tumores que presentan metilación en la región promotora del gen PTEN son más agresivos y tienen peor pronóstico.

## 2. PI3K

PI3K pertenece a la familia de fosfatidilinositol-3-quinasas de clase IA de proteínas de señalización celular. Estas proteínas actúan formando heterodímeros en los que uno de sus monómeros tiene una función catalítica y el otro una función reguladora.

La subunidad catalítica de esta familia de proteínas puede estar formada por tres tipos de monómeros p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  o p110 $\delta$ , codificadas por los genes PIK3CA, PIK3CB y PIK3CD respectivamente<sup>80</sup>; mientras que la subunidad reguladora puede estar formada por los monómeros p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p85 $\beta$  o p55 $\gamma$ <sup>81</sup>. Todas estas isoformas muestran diferente distribución en los tejidos. PIK3CA y B se distribuyen ubicuamente<sup>82</sup>, mientras que PIK3CD se localiza principalmente en leucocitos<sup>83</sup>.

La función de PI3K viene determinada por su actividad kinasa, por la cual fosforilan la posición D3 de los fosfatidilinositoles<sup>84</sup>. Este proceso transforma PIP2, procedente de la formación de segundos mensajeros en la membrana plasmática, en PIP3, compuesto que tiene la capacidad de atraer otras proteínas con dominios PH (homólogos a pleckstrina) hacia la membrana plasmática para activarlas<sup>85</sup>. Una de las proteínas a las que activa, y quizás la más importante, es Akt, que regula innumerables procesos de supervivencia celular y apoptosis, progresión del ciclo celular, motilidad y metabolismo celular<sup>86</sup>.

La secuenciación de los genes de PI3K en múltiples cánceres humanos ha revelado la presencia de mutaciones en el gen PIK3CA<sup>87</sup>, pero no en los genes PIK3CB o PIK3CD. La elevada frecuencia de mutaciones, junto con el hecho de que casi todas las mutaciones parecen ser de carácter heterocigoto, se localizan en regiones altamente conservadas y están asociadas con un aumento de su capacidad enzimática, han hecho que se considere a PIK3CA como un oncogén<sup>88</sup>.

El gen PIK3CA se localiza en el loci 3q26 y está compuesto por 21 exones, de los cuales 20 son codificantes. Se encuentra mutado en el 36% de los cánceres endometriales, el 32% de los cánceres de colon y el 27% de los tumores de mama<sup>89</sup>. La proteína que codifica (p110 $\alpha$ ) 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. Por su parte, la subunidad reguladora p85 $\alpha$  a la que se une, comprende otros cinco dominios: un dominio SH3, un dominio GAP y tres dominios SH2, uno en el extremo amino terminal, otro en la región intermedia y el último en el extremo carboxilo terminal<sup>85</sup>, a través de los cuales interacciona con la subunidad catalítica para conservarla en un estado estable pero de baja actividad y así mantener a las células quiescentes<sup>90</sup>.

Todas estas características hacen que PI3K juegue un papel destacado en la regulación de la proliferación y supervivencia celular, su crecimiento y metabolismo<sup>86,88</sup>.

### 3. RUTA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE PTEN Y PI3K

La ruta en la que participan las proteínas PTEN y PI3K se encuentra conectada con la cascada de señalización intracelular de Akt. Esta ruta está estrechamente relacionada con las funciones atribuidas a PTEN y PI3K.

La señal activadora de esta ruta comienza con la recepción de señales de crecimiento extracelulares que interactúan con los receptores de membrana tirosina kinasa, receptores asociados a proteínas G e integrinas. La unión ligando-receptor que produce la formación de segundos mensajeros en forma de PIP2. Estos, a través de PI3K y PTEN, activan una serie de proteínas, entre las que se encuentra Akt, que es capaz de fosforilar una serie de intermediarios que son los que en último término producirán las funciones atribuidas a este sistema<sup>91</sup> (figura 6). Además de este mecanismo, también se han descrito otros mecanismos alternativos de activación de la vía independientes de ligando como son, por ejemplo, los que expresan de forma constitutiva proteínas ras en determinadas células tumorales<sup>92</sup>.

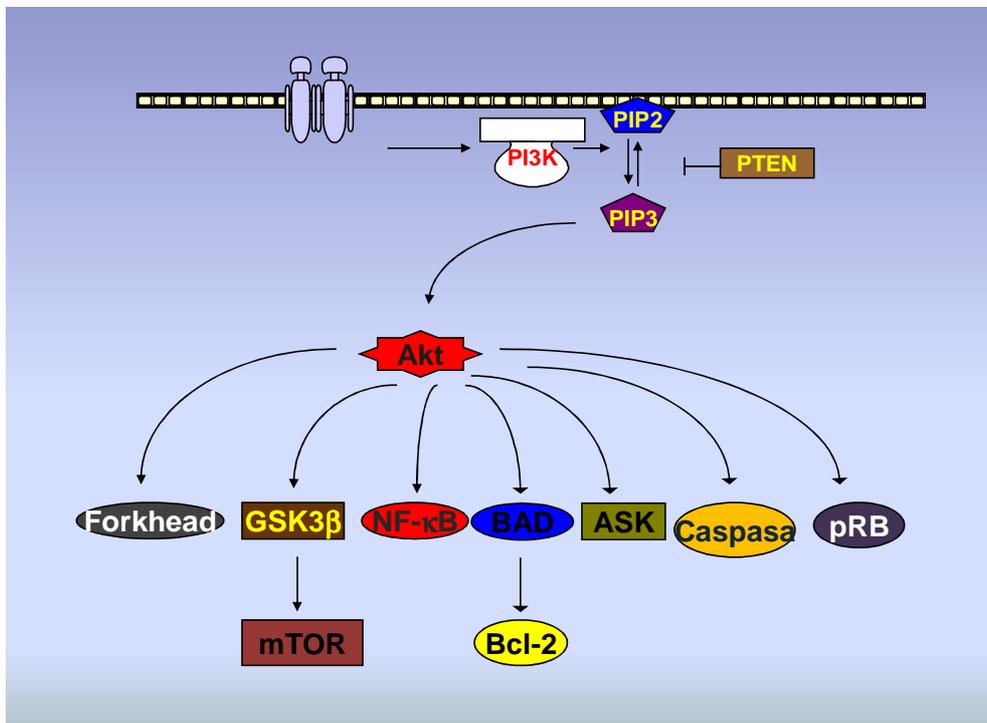


Figura 6, Ruta de señalización intracelular de Akt, con varios de los intermediarios sobre los que actúa.

Akt media la fosforilación de factores de transcripción Forkhead tales como AFX, FKHR y FKHL1<sup>93</sup> relacionados con la supervivencia celular, los cuales cambian de localización subcelular 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 $\beta$  (Glucógeno sintasa kinasa 3 $\beta$ ) por Akt y la fosforilación de sus sustratos participan en la regulación de la señalización celular de la proteína mTOR<sup>9</sup>, que tiene efectos sobre el control del ciclo celular y metabólico de la célula, además de inferir en la supervivencia de la misma.

Akt también activa otros factores de transcripción importantes relacionados con proliferación, apoptosis, supervivencia celular y otros mecanismos de la tumorigénesis como NF- $\kappa$ B, que media su función a través de citocinas, factores de crecimiento<sup>94</sup> y genes de supervivencia celular como son c-IAP-1 y c-IAP-2. Akt fosforila un inhibidor de NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) inactivándolo, degradándolo y evitando el secuestro de NF- $\kappa$ B<sup>95</sup>.

La proteína Akt incrementa la supervivencia celular a través de la regulación de la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 y mcl-1<sup>91</sup>. En condiciones basales, estos factores son antagonizados por unión de la proteína BAD promoviéndose la apoptosis. Cuando BAD se fosforila por acción de Akt, es secuestrada por la proteína 14.3.3 en el citoplasma, evitando así su unión con Bcl-2 y, de esta forma, favorece la apoptosis<sup>96</sup>. No obstante, se ha comprobado que este mecanismo varía en función del tipo celular donde se desencadena, pudiendo ser independiente de la fosforilación específica de Akt<sup>95</sup>.

Akt también fosforila ASK1 kinasa, que transduce la señal de estrés a las proteínas SAPK (proteínas kinasas activadoras de estrés) que se encuentran estrechamente unidas a la inducción de apoptosis por acción de estímulos tales como radiación ionizante, shock calórico o estrés osmótico, y a p38, proteína perteneciente a la ruta de las MAP kinasas (mitogen activated protein)<sup>19</sup>.

Akt también regula el paso de la fase G1 a S del ciclo celular. Esta acción se lleva a cabo a través de la proteína retinoblastoma pRB, que es fosforilada por Akt e inactiva CDKs importantes en el paso de una de estas fases a la otra en el ciclo celular<sup>91</sup>. También hay evidencias que sugieren que Akt regula directamente ciclina D<sup>98</sup>.

Por último, Akt también regula procesos tan importantes para la tumorigénesis como es la angiogénesis a través de la activación de HIF-1 (factor hipóxico 1), que aumenta la transcripción de genes relacionados como la angiopoyetina-1<sup>99</sup> y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)<sup>100</sup>; y por fosforilación de eNOS (nitrógeno sintasa endotelial) que produce neovascularización<sup>101</sup>. Por el contrario, un inductor negativo de la angiogénesis sería la trombospondina 1 que estaría regulado por Akt a través de PTEN<sup>91</sup>.

## 4. KRAS

El proto-oncogén KRAS pertenece a la familia de las proteínas ras (N-, H- y K-) que codifican GTPasas de membrana (proteínas G) y participan en procesos de transducción de señales al núcleo por la vía de MAP kinasas (Ras-Raf-MEK-ERK-MAP)<sup>102</sup> (figura 7). La activación de las MAP Kinasas resulta importante para reprimir o activar la expresión de determinados genes relacionados con la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Aproximadamente el 30% de todos los cánceres humanos contienen alteraciones puntuales en alguno de los miembros de la familia de ras<sup>103</sup>.

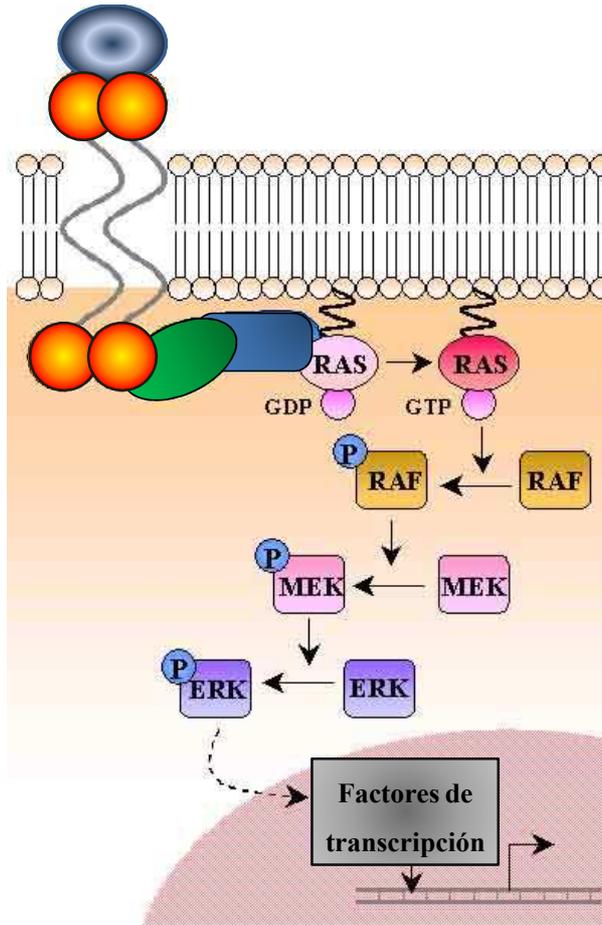


Figura 7, Vía de señalización intracelular Ras-Raf-MEK-ERK.

La proteína de KRAS intercambia GTP (guanósil trifosfato), que mantiene a la proteína en estado activo, a GDP (guanósil difosfato), en la que pasa a un estado inactivo. Esta transmutación es aprovechada por la célula para transducir señales desde los receptores de superficie, proteínas G heterotrímicas o integrinas al interior celular. Para esta función también son importantes las reacciones de unión/separación de los nucleótidos de guanina que se realizan a través de diversos factores GEF (guanine-nucleotide exchange factors)<sup>101</sup>. Aunque el efector inmediato de la activación de KRAS es la proteína BRAF, y por consiguiente la activación de la cascada de las MAP kinasas; PI3K también es activado por KRAS aunque de una forma minoritaria<sup>92</sup>.

El gen KRAS se encuentra localizado en el locus 12p12.1 y consta de 6 exones que dan lugar a dos isoformas por procesamiento alternativo del mRNA, expresándose de forma diferencial en los tejidos. Mutaciones germinales en este gen han sido identificadas en pacientes con síndromes que cursan con malformaciones craneoencefálicas como Noonan y Costello<sup>104</sup>, mientras que las de tipo somático aparecen en diverso tipo de cánceres como pulmón, colon o endometrio<sup>11,105,106,107</sup>. Las mutaciones somáticas tienden a reunirse en regiones “hot-spots” que comprenden los codones 12, 13 en el exón 2 que codifican glicina y, con una menor frecuencia, el codón 61 en el exón 3 que codifica glutamina<sup>103</sup>. Estas mutaciones todavía no han sido descritas en línea germinal, lo que sugiere un mecanismo de acción patogénico diferente dependiendo de la región de la proteína que alteran.

De forma general, las alteraciones en el gen KRAS tienden a incrementar la actividad intercambiadora de nucleótidos de guanósina o a disminuir su actividad GTPasa bloqueando la proteína en un estado permanentemente activo, dirigiendo a la célula a una constante activación de la vía y un aumento en la tasa de proliferación celular<sup>104</sup>.

En los tumores endometriales las mutaciones de los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS aparecen predominantemente en carcinoma endometrial de tipo I, (entre un 10 y un 30%), mientras que son casi

inexistentes en los tumores de tipo II, serosos, papilares y de células claras (2%). Las mutaciones en el gen KRAS se han asociado con mal pronóstico, independientemente de la edad de la paciente<sup>107</sup>. También se ha encontrado un alto porcentaje de mutaciones en KRAS en hiperplasias atípicas siendo consideradas como un evento temprano en el desarrollo de los carcinomas<sup>13</sup>. Además, estas alteraciones parecen coincidir con MSI, lo que sugiere que ambos acontecimientos surgen simultáneamente<sup>12</sup>.

## 5. **BRAF**

BRAF es un proto-oncogén de la cascada de señalización intracelular de ras. Este gen forma parte de la familia de los genes raf compuesta por raf-1, A-raf, B-raf y C-raf que codifican serina/treonina kinasas intracelulares efectoras de las MAP kinasas, encargadas de transducir la señal desde ras hasta MEK (figura 7) participando en procesos de regulación del ciclo celular y proliferación<sup>108</sup>.

Este gen, compuesto por 18 exones, se encuentra localizado en el cromosoma 17q34 y codifica una proteína formada por tres dominios. El primer dominio contiene el sitio de unión a ras, seguido de una región rica en cisteínas; un segundo dominio está compuesto por un alto número de residuos de serina y treonina que se fosforilan para su función biológica; y un tercer dominio, donde reside su función kinasa, que está flanqueado por una región rica en glicinas y un segmento de activación<sup>104</sup>.

Las alteraciones descritas en BRAF son principalmente de tipo “missense” y producen un aumento de función de la proteína. La incidencia de mutación en este gen es muy alta en melanomas (65%), carcinoma de tiroides (36-53%), carcinoma colorrectal (5-10%) y carcinoma endometrial (>5%)<sup>109</sup>. Las mutaciones suelen agruparse en la región rica en residuos de glicina codificada por el exón 11 y en el segmento de activación, codificado todo por el exón 15. De esta forma, 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 celular<sup>108</sup>. De especial importancia es la mutación c.1799T>A en el exón 15 que corresponde con la sustitución del codón V600E, ya que aparece con mayor frecuencia que cualquier otra en tumores humanos, y porque se ha comprobado que aumenta diez veces la actividad kinasa de la proteína<sup>110</sup>. No obstante, la aparición de esta mutación en carcinoma de endometrio es poco frecuente<sup>111</sup>.

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<sup>112,113</sup>.

Sin embargo, si se ha descrito que las mutaciones en el gen BRAF aparecen principalmente en las células que manifiestan pérdida de expresión de hMLH1, lo que apunta a una coincidencia con procesos de hipermetilación de promotor del gen hMLH1 o mutaciones en este locus y por consiguiente, a un mal funcionamiento de los mecanismos de reparación de DNA<sup>111</sup>.

## 6. **$\beta$ -CATENINA**

La proteína  $\beta$ -catenina fue identificada como una de las proteínas que forman parte del citoesqueleto y que pertenecen al sistema de adhesión célula-célula mediado por cadherina<sup>114</sup>. Posteriormente, se reconoció como un factor de transcripción activado por la ruta de señalización intracelular Wingless-Int (Wnt)<sup>115</sup>. La ruta Wnt 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 activa receptores de la familia “frizzled” y  $\beta$ -catenina<sup>115</sup>. En células epiteliales normales, donde no ha ocurrido una activación de estos receptores, existe un complejo proteico citoplasmático que contiene  $\beta$ -catenina, APC (adenomatous polypoid coli), axina y GSK-3 $\beta$  que es responsable de la fosforilación en los residuos de serina y treonina en el dominio regulador de  $\beta$ -catenina. Esta fosforilación constituye una señal de reconocimiento y marcaje por ubiquitinación para su posterior degradación en el proteosoma<sup>116,117</sup> (figura 8). Cuando la ruta Wnt se activa, este complejo se desensambla y la degradación de  $\beta$ -catenina se ve suprimida, permitiendo la translocación de la proteína al núcleo, donde forma complejos con las proteínas de unión a DNA Tcf y Lef (factor de células T y factor activador linfóide), lo que le permite ejercer su función de activación de la transcripción de genes como c-myc, ciclina D y MMP-7 (metaloproteína 7)<sup>118,119</sup> (figura 8). La proteína PTEN regula la estabilización de  $\beta$ -catenina,

su expresión nuclear y su función reguladora de la transcripción en líneas celulares prostáticas<sup>120</sup>, aunque no parece ser así para otros tipos de tumores<sup>121</sup>.

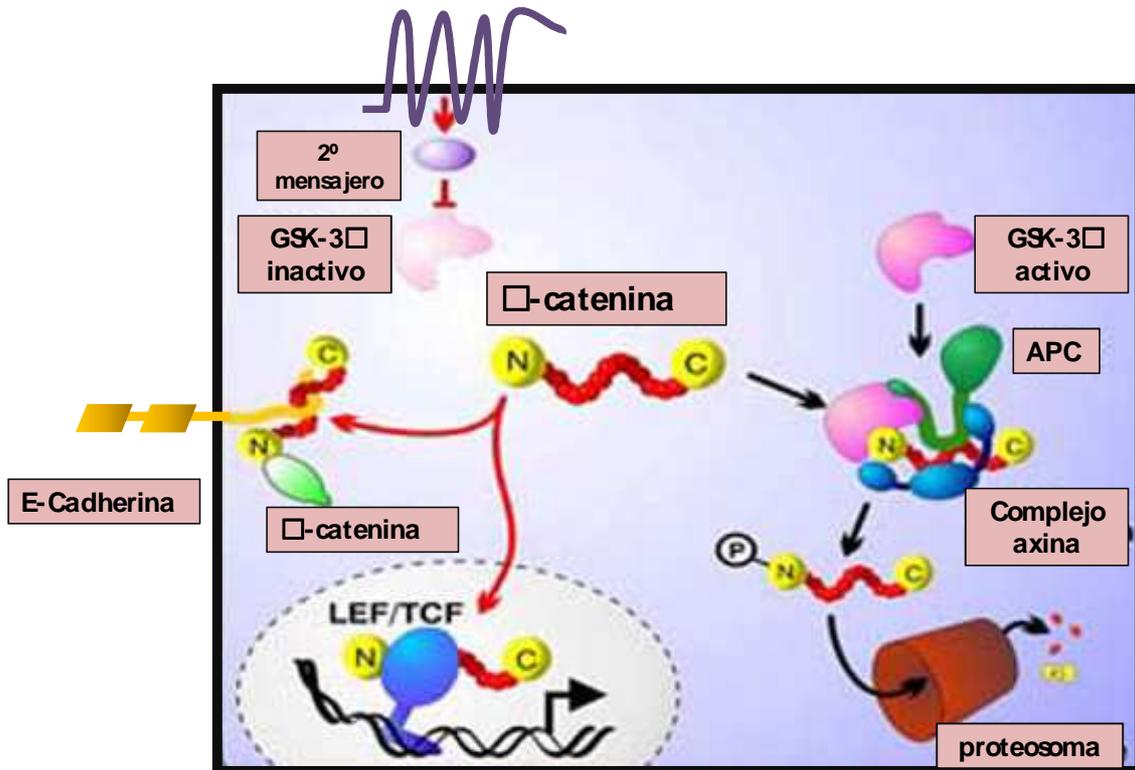


Figura 8, Vía de señalización de Wnt, donde se muestra el papel de  $\beta$ -catenina unido a un complejo de degradación, actuando sobre los procesos de transcripción genética y formando parte del citoesqueleto, junto con E-Cadherina.

Las mutaciones patogénicas que aparecen en el gen CTNNB1, localizado en el locus 3p21 y que codifica  $\beta$ -catenina, modifican los residuos de serina y treonina o los residuos adyacentes de su dominio regulador, codificados por el exón 3. De esta manera, se ve afectada su unión al complejo de degradación, aumentando la acumulación de la proteína en el citoplasma<sup>115,1165</sup>, lo que produce una mayor translocación hacia el núcleo. En esta localización es donde ejerce su función transcritora, facilitándose la sobreexpresión génica que aumenta la proliferación celular y el crecimiento de la célula, desempeñando un importante papel en la formación de varios tipos de tumores<sup>115</sup>.

La gran mayoría de mutaciones registradas en el gen CTNNB1 son heterocigotas, de tipo “missense” y se localizan en el exón 3. Estas alteraciones están involucradas en la patogénesis de multitud de tumores entre los que se encuentran el carcinoma de colon<sup>122</sup> y los cánceres de naturaleza ginecológica en donde se han registrado mutaciones entre un 20 y un 40%, dependiendo del tipo tumoral<sup>14,123</sup>. No obstante, muchos estudios inmunohistoquímicos de  $\beta$ -catenina, muestran patrones alterados de localización de la proteína en el compartimento citoplasmático que no se relacionan con las mutaciones encontradas en esta región<sup>14,15,123</sup>, lo que sugiere que el proceso tumorigénico relacionado con  $\beta$ -catenina no se conoce totalmente.

## 7. E-CADHERINA

El gen de E-Cadherina o CDH1 está localizado en el cromosoma 16q22 y comprende 16 exones distribuidos a lo largo de 100 Kb de DNA genómico. El producto que codifica es un receptor glicoproteico transmembrana de 120 KDa, perteneciente a la superfamilia de las cadherinas, y cuya expresión se localiza en uniones adherentes de la mayoría de las células epiteliales<sup>124</sup>.

La estructura de E-Cadherina comprende cinco dominios extracelulares donde se sitúan motivos muy conservados de unión a calcio, una región transmembrana y un dominio intracelular que interacciona con filamentos de actina a través de cateninas  $\beta$ ,  $\gamma$  y p120. Entre sus funciones destacan procesos de adhesión celular dependientes de unión a calcio, y mantenimiento de la polaridad y la arquitectura celular<sup>124</sup>.

En diferentes tumores se ha observado una disminución o pérdida de la expresión en E-Cadherina, lo que se ha asociado a una reducción de las fuerzas cohesivas célula-célula. Este hecho precede a cambios en la motilidad de células tumorales que determina procesos de progresión tumoral, invasión y metástasis, confiriendo peor pronóstico a los tumores que exhiben alguna alteración en el funcionamiento de este sistema<sup>125</sup>.

La primera vez que se asociaron alteraciones en el gen CDH1 con procesos cancerosos fue en casos de carcinoma gástrico<sup>126</sup> y, posteriormente, han ido descubriéndose en otros, tales como cánceres de mama de tipo lobular<sup>127</sup>.

En el carcinoma endometrial se describieron regiones con LOH en el locus 16q22<sup>128</sup>, región donde se encuentra localizado el gen CDH1 y, a continuación, se empezaron a encontrar mutaciones en regiones codificantes con una baja frecuencia<sup>129</sup> lo que relacionó este tipo de alteraciones con el desarrollo de carcinomas ginecológicos. A día de hoy, los eventos patogénicos que conciernen a E-Cadherina en la tumorigénesis endometrial son pérdidas alélicas, así como la represión transcripcional por hipermetilación del promotor del gen, y mutaciones en la secuencia de CDH1<sup>130</sup>. Los resultados de los estudios moleculares del carcinoma endometrial han revelado que alteraciones de estos tipos ocurren en un 62% de los carcinomas serosos y un 87% de los carcinomas de células claras, representando sólo un 22% de los tumores endometrioides<sup>131,132</sup>.

## 8. p53

La proteína p53 actúa en la regulación de varios procesos importantes para la supervivencia celular actuando como “guardián del genoma”<sup>133</sup> por su papel en la reparación del DNA, en la progresión del ciclo celular por estímulos de estrés o daño al DNA y en la apoptosis<sup>134</sup>. Esta proteína, que tiene una vida media muy corta, se mantiene en condiciones basales a baja concentración en las células y sufre un proceso de continuo marcaje por ubiquitinación y subsiguiente degradación en el proteosoma. Sin embargo, en condiciones de estrés, esta ubiquitinación se ve suprimida ganando estabilidad y translocándose hacia el núcleo donde forma complejos homotetraméricos que reconocen secuencias específicas de DNA por las que va a promover o reprimir la transcripción de más de 150 genes diferentes<sup>135</sup> (figura 9).

El gen TP53 localizado en el cromosoma 17p13.1 está formado por 11 exones, el primero de ellos no codificante. Este gen codifica la proteína p53 de 393 aminoácidos, cuya estructura proteica se divide en diferentes dominios funcionales. El extremo amino terminal, donde reside su actividad transcripcional, y un dominio SH3<sup>136</sup>; este dominio de transactivación interactúa con factores de transcripción, acetiltransferasas y la proteína MDM2, que regula su concentración celular<sup>135</sup>, el dominio SH3, es esencial para la unión de p53 con SIN3 que protege a p53 de la degradación<sup>137</sup>. La parte central de la proteína está compuesta principalmente por el dominio de unión a DNA; y el extremo carboxilo terminal que contiene secuencias de localización y exportación nuclear (NLS y NES), un dominio de regulación y un dominio de tetramerización<sup>135</sup>.

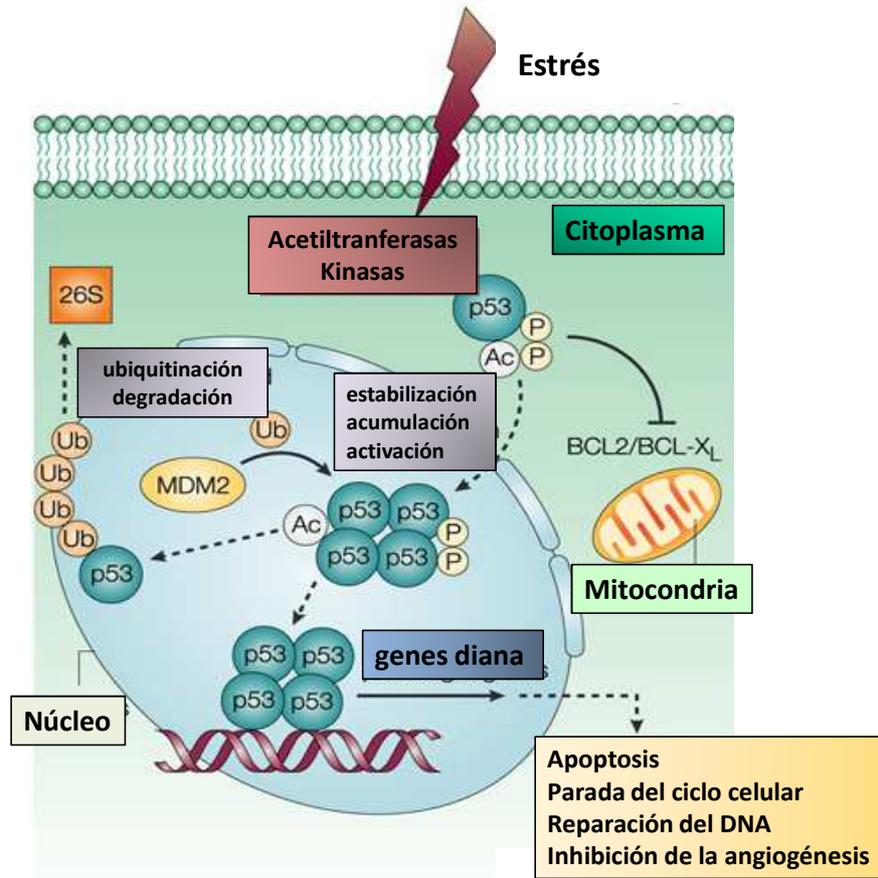


Figura 9, Mecanismo de acción y regulación de p53 donde ejerce funciones de transcripción genética en el núcleo y apoptótica en la mitocondria.

p53 interviene en la reparación del DNA por varios mecanismos conocidos: uniéndose a la proteína Rad51, miembro de la maquinaria de recombinación que actúa en la reparación por escisión de nucleótidos (VER)<sup>138</sup> y participando sin ayuda de intermediarios por unión directa a los ácidos nucleicos para su anillamiento<sup>139</sup>. Las demás funciones de p53 están relacionadas con la cantidad de genes que regula en la transcripción, por ejemplo, provocando un aumento de la expresión de GADD45, que produce parada del crecimiento celular por unión con PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) también implicado en reparación del DNA<sup>136</sup>. Todas estas funciones son desencadenadas en situaciones post-estrés como por exposición a radiaciones ionizantes o agentes quimioterápicos.

En su papel regulador del ciclo celular, p53 induce la expresión de la proteína p21, importante para la progresión de este, de la fase G1 a la de síntesis. Esta proteína inhibe CDKs que, como consecuencia, no se unen a ciclinas y promueven una parada del ciclo<sup>140</sup>. Otro de los mecanismos por los que p53 regula el ciclo celular, consiste en mediar el aumento de expresión de los oncogenes c-myc y ras, que a su vez aumentan la expresión de p16 y p14. p16 inhibe CDKs, parando el ciclo celular<sup>141</sup> y p14 degrada MDM2 aumentando los niveles de proteína p53<sup>142</sup>.

Como inductor de la apoptosis, p53 efectúa su actividad tanto en el núcleo, mediante aumento de la expresión de determinados genes<sup>140</sup>, como a nivel de la mitocondria, por unión a otras proteínas<sup>134</sup>. Los genes proapoptóticos AIP1, NOXA y PUMA son un ejemplo de esta inducción de la expresión por p53<sup>143</sup>. En la mitocondria, p53 se une a las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y BclX, para antagonizarlas y desencadenar una serie de eventos que activan los factores proapoptóticos BAX, BAK, caspasas, etc y, por consiguiente, la apoptosis (figura 9).

Por último, se ha relacionado la capacidad reguladora de la transcripción de p53 con una regulación de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis<sup>144</sup> induciendo un aumento de proteínas como trombospondina-1, BAI1, GD-AiF, etc, por lo que alteraciones en este mecanismo contribuyen a la progresión tumoral.

La regulación de la actividad de p53 ocurre de diversas formas. Las modificaciones en sus extremos amino y carboxilo con fosforilaciones y defosforilaciones, acetilaciones, etc, supone un mecanismo directo de regulación que es necesario para determinar su conformación, importante tanto para activar la transcripción como para unirse a otras proteínas<sup>145,146</sup>. Por otro lado, la unión a la proteína MDM2, también juega un papel importante en la regulación de los niveles de p53 al marcar a la proteína para su degradación por ubiquitinación de su dominio regulador<sup>147</sup>. Asimismo, la unión a otras proteínas favorece o impide su actividad transcritora, teniendo como ejemplo a las proteínas p300 y pCAF (factor asociado a p300), ambas acetiltransferasas de histonas (HATs) que de forma general desempaquetan el DNA, forman complejos con p53 y activan de forma más eficiente la transcripción mediada por p53<sup>148</sup>. También en determinados estados de actividad celular reductora las proteínas HIF-1 y Ref-1 pueden interaccionar con p53 y alterar la cantidad de proteína intracelular lo que aumenta o reduce su actividad. Otro mecanismo describe que directamente a través de su extremo carboxilo terminal y sin ningún otro intermediario, p53 se une al DNA e impide la transcripción de los promotores específicos sobre los que actúa<sup>139</sup>.

En la mayoría de los cánceres humanos han sido descritas mutaciones en el gen de p53, entre ellas en los carcinomas endometriales<sup>149</sup>. La proteína p53 mutada, aunque no es funcional, resiste su degradación y se acumula en la célula secuestrando a la proteína producida por el alelo germinal mediante su homotetramerización<sup>150</sup>. De ahí que en los primeros momentos de su descubrimiento se observara una sobreexpresión de la proteína en los tejidos con alteraciones en p53 y se confundiera su actividad con la de un oncogén. Del mismo modo y a diferencia de otros genes supresores de tumores, no es necesario un “second-hit” para producir un efecto patológico, sino que en este caso una única alteración es suficiente para transformar la célula sana en tumoral.

En tumores de endometrio han sido descritas mutaciones en el gen TP53. Estas alteraciones son más frecuentes en los tumores de tipo no endometriode que endometriode, apareciendo en un 80% de las lesiones precursoras EIN y constituyendo el 90% de las alteraciones que aparecen en los carcinomas serosos, mientras que solo representan un 10 a un 20% de las mutaciones en los tumores de tipo I<sup>1,12,17,132</sup>. Este evento debe de ser relativamente temprano en el desarrollo tumoral de los carcinomas serosos debido a que la sobreexpresión de p53 en estos tumores aparece en un 75% en las lesiones que los precede, mientras que sólo se detecta expresión en una muy pequeña proporción de hiperplasias atípicas precursoras de los carcinomas endometrioides, lo que sugiere, que alteraciones en p53 son un evento molecular tardío en el desarrollo de estos tumores<sup>34</sup>. Además, se ha visto que este pequeño porcentaje de alteraciones en el gen TP53 en tumores de tipo I no parece coincidir con alteraciones en otros genes como PTEN, KRAS,  $\beta$ -catenina<sup>12</sup>, y sin embargo, sí coincide con una mayor frecuencia de aparición de MSI<sup>18</sup>.

## 9. CDKN2A

La proteína p16 es codificada por el gen supresor de tumores CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) que se localiza en el cromosoma 9p21. Este gen, además, comparte su secuencia con otra proteína relacionada, p14, que presenta un marco de lectura diferente a CDKN2A<sup>151</sup> (figura 10).

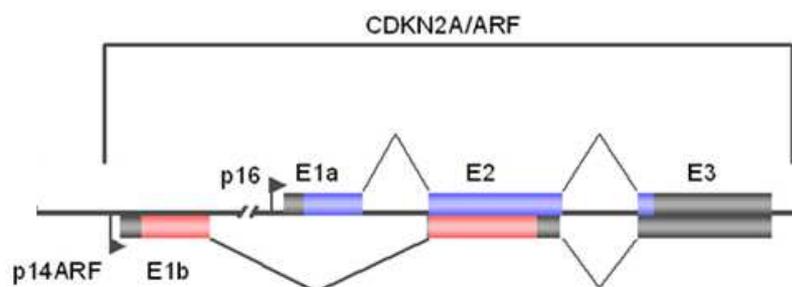


Figura 10. Organización genómica de p14 (cajas rojas) y p16 (cajas azules). p14 y p16 comparten los exones 2 y 3 pero tienen diferentes exón 1. Los transcritos generados por diferentes marcos de lectura generan dos proteínas diferentes.

La proteína p16 que pertenece a la familia INK4 de inhibidores de CDKs, consta de 156 aminoácidos. Las funciones biológicas de p16 dependen de la unión específicamente a CDK4 y la consiguiente inhibición de la actividad catalítica de ciclina D, molécula clave para el control del ciclo celular en la fase G1, ya que inhiben la fosforilación de pRB<sup>141</sup>. Por otra parte, p14, aunque también parece interferir en el crecimiento tumoral, exhibe funciones diferentes de p16, que conllevan la estabilización de p53 mediante el secuestro y degradación de MDM2 en el nucléolo<sup>142</sup>.

Las alteraciones en el gen CDKN2A están relacionadas con el desarrollo de muchos tipos de cáncer como son melanomas, gliomas, cáncer de pulmón y endometrio<sup>152</sup>. En estos últimos ocurren tres tipos de eventos que alteran el sistema de p16: deleciones homocigotas, hipermetilación del promotor del gen de p16 y, en menor medida, mutaciones puntuales; todos ellos relacionados con la pérdida de expresión de la proteína. No obstante, hay controversia sobre la frecuencia de aparición de cada uno de ellos y, por tanto, su implicación en el desarrollo del carcinoma endometrial sigue sin comprenderse totalmente<sup>20</sup>. Asimismo, se ha observado que la pérdida de expresión de proteína p16 se correlaciona con mutaciones en KRAS y p53<sup>153</sup>.

En los cánceres de endometrio, la pérdida de la expresión de p16 es más frecuente en carcinomas de tipo no endometriode que endometriode (10%)<sup>19</sup> y aparece más frecuentemente en carcinomas con diferenciación escamosa, serosa y de células claras de alto grado (45%)<sup>37</sup>. Además, están relacionadas con un peor pronóstico de la enfermedad así como un aumento de la metástasis<sup>20</sup>.

## 10. REPARACIÓN DE DNA

El DNA, al igual que otras estructuras celulares, está expuesto a multitud de agresiones que pueden producirle daños alterando su integridad. El daño al DNA es una consecuencia parcial del efecto de diferentes factores ambientales, además de una gran proporción de mutágenos endógenos como la producción de radicales libres de O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ciertos metabolitos generados de los procesos biológicos. Debido a esto, el desarrollo de información codificada en el genoma humano que se traduce en forma de proteínas y que protege de posibles alteraciones que pudiera sufrir para conservar su secuencia intacta, resulta de gran valor. Estas proteínas supervisan constantemente el material hereditario en busca de alteraciones y las corrigen si llegara el caso.

Las células de los humanos han desarrollado cuatro mecanismos de reparación del DNA que incluyen más de 130 genes que participan en procesos clave para la supervivencia de la célula como son el reconocimiento de daño al DNA y la regulación del ciclo celular evitando que el daño se propague por replicación y división celular, hasta quedar reparado, o minimizado en la medida de lo posible<sup>154</sup>.

Estos cuatro mecanismos se conocen como:

- Mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (MMR).
- Mecanismo de reparación por escisión de bases (BER).
- Mecanismo de reparación de lesiones por rotura de doble cadena (DBS).
- Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

### 10.1. Mecanismo de Reparación de Emparejamientos Erróneos (MMR)

El mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) es un sistema de corrección del DNA que actúa en errores de tipo emparejamiento base-base y bucles extrahélice formados por pequeñas inserciones o deleciones. En 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 repeticiones de secuencia como los microsatélites,

produciendo incrementos o disminuciones en la longitud de una determinada hebra que no se puede emparejar correctamente<sup>155</sup>.

Dentro del mecanismo MMR se pueden observar una serie de etapas<sup>155</sup>:

- Reconocimiento del emparejamiento erróneo.
- Reclutamiento de nucleótidos y factores necesarios.
- Discriminación de las hebras de DNA.
- Degradación del segmento de DNA incorrecto.
- Síntesis de DNA.

En organismos procariontes, el sistema de reparación MMR se lleva a cabo mediante los complejos enzimáticos MutS, MutL y MutH. Sin embargo, en organismos eucariotes sólo han sido identificadas proteínas homólogas a MutS y MutL. Las proteínas homólogas a MutS se nombran MSH (MutS homolog) y las proteínas homólogas a MutL se nombran MLH (MutL homolog). En humanos se las diferencia añadiendo una "h"<sup>156</sup>. Estas proteínas forman complejos enzimáticos compuestos por heterodímeros. Uno de ellos se denomina MUTS $\alpha$ , donde se combinan las proteínas hMSH2 y hMSH6, que se encarga del reconocimiento de los errores en la cadena de DNA. Otro de estos heterodímeros, MUTS $\beta$ , se compone de hMSH2 y hMSH3, y también reconoce la formación de estas estructuras, aunque con una mayor afinidad por errores más complejos como las inserciones de 2 a 4 pares de bases. Asimismo, se ha observado un cierto grado de redundancia funcional entre MUTS $\alpha$  y MUTS $\beta$  lo que asegura que la corrección de todos los errores de replicación se inicien eficientemente a pesar de que la mayoría de ellos sean reconocidos sólo por MUTS $\alpha$ <sup>157</sup>.

Aunque el mecanismo de reconocimiento y reparación MMR no está totalmente descrito, se han identificado varias proteínas que intervienen en el proceso como son hMLH1, hMLH3, hPMS1 y hPMS2 (post-meiotic segregation protein), que se unen a los heterodímeros MutL $\alpha$  y MutL $\beta$ . Estos últimos son reclutados al sitio de reparación tras interactuar con hMSH2 y bajo la unión e hidrólisis de ATP. Posteriormente, otras proteínas como PCNA se unen 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 (replication factor C), que es un factor necesario para la unión de PCNA al DNA, y las exonucleasas EXO1/HEX1 y FEN1 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  $\delta$ , otras DNA polimerasas sensibles a afidiconina y DNA ligasas que finalizan el proceso de reparación de MMR<sup>158</sup> (figura 11).

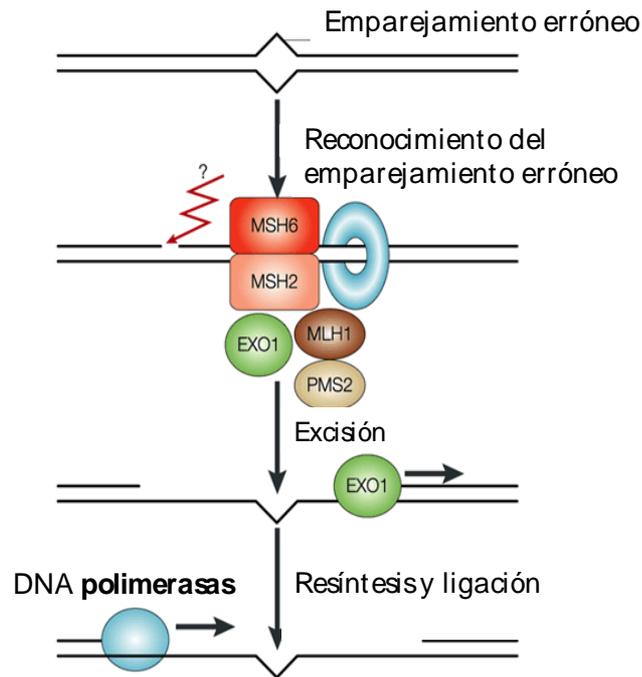


Figura 11, Mecanismo MMR de reparación de DNA.

Los genes que codifican las proteínas implicadas en el mecanismo MMR son susceptibles de sufrir alteraciones que conlleven una disfunción en la capacidad de reparar estos errores. Por lo tanto, las células con alteraciones en estos genes van a acumular errores en el DNA de forma más frecuente que las células normales, y estos errores van a suponer la acumulación de mutaciones somáticas en otros genes con las consecuencias que este hecho conlleva. Es por esta razón por lo que se ha denominado “fenotipo mutador” al que acompaña a las deficiencias en el sistema MMR<sup>156</sup>.

La maquinaria de MMR no solo tiene como función la búsqueda y reparación de errores en el DNA, sino que contribuyen al mantenimiento de la estabilidad genómica por inducción de la apoptosis en los casos en los que las alteraciones no hayan podido ser revertidas<sup>159</sup>. De esta forma, deficiencias en el mecanismo MMR producen una disminución de la tasa de apoptosis, confiriendo cierta ventaja en la supervivencia de las células que han adquirido mutaciones que contribuyen al desarrollo tumoral.

## 10.2 . Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

Los microsatélites son repeticiones múltiples de 1 a 5 nucleótidos que están distribuidos por todo el genoma. Concretamente, se han encontrado unas 50.000 a 100.000 secuencias de este tipo localizados principalmente en regiones no codificantes y sólo una pequeña cantidad reside en regiones codificantes. Debido a su estructura repetitiva, son secuencias muy susceptibles a error por resbalamiento de la DNA polimerasa durante el proceso de replicación. Generalmente estas secuencias suelen ser muy polimorfas, componiéndose de varios alelos donde sólo cambia el número de repeticiones entre ellos. Además, representan diferencias estables y heredables dentro de la población<sup>155</sup>.

El fenómeno de inestabilidad se produce cuando la longitud o número de repeticiones del microsatélite aumenta o disminuye con respecto a la línea germinal. Este hecho se produce cuando ha ocurrido algún error en el proceso de replicación y, además, la maquinaria de reparación no ha sido suficiente para remediarlo. La detección de inestabilidad de microsatélites en tumores es un reflejo de las deficiencias de los mecanismos de replicación y reparación del DNA<sup>154</sup>.

El fenómeno de MSI fue descrito inicialmente en el síndrome de Lynch (1993)<sup>160</sup> y posteriormente se encontró en algunos casos esporádicos de cáncer de colon. En el carcinoma endometrial la inestabilidad se ha encontrado en un 75% de los casos cuando están incluidos en el síndrome de Lynch, y en un 25 a 40% en carcinoma de endometrio esporádico. En este último supuesto, hay una fuerte asociación con los tumores de tipo I, y de fenotipo menos agresivo, mientras que sólo representa un 5% en los de tipo II<sup>4,5</sup>.

### 10.3. Alteraciones en los Genes de MMR

Las pacientes con el síndrome de Lynch que desarrollan carcinoma endometrial muestran mutaciones germinales en los genes hMLH1 y hMSH2, lo que supone la primera inactivación en estos genes. Para que se produzca el desarrollo del tumor es necesaria una segunda mutación (“second hit”) en el alelo contralateral, que produce una deficiencia en el mecanismo MMR que da lugar a alteraciones en las regiones de microsatélites y en determinados genes con la subsiguiente aparición del tumor<sup>161</sup>. No obstante, 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 de inactivación del sistema MMR. Esta hipótesis se comprobó al demostrarse que determinados casos con hipermetilación de la región promotora del gen hMLH1, contribuían a la inactivación de la proteína y, en último término, al “fenotipo mutador”<sup>162</sup>. Además de esto, también apareció un pequeño porcentaje de pacientes con esta alteración epigenética que no mostraban inestabilidad de microsatélites<sup>163</sup>.

En carcinoma endometrial esporádico, la inactivación del gen hMLH1 por hipermetilación de su promotor es la causa más frecuente de MSI<sup>162</sup>, seguido de mutaciones en los genes que componen la maquinaria MMR (hMLH1, hMSH2 y hMSH6). Así como en las proteínas hMSH2 y hMSH6 la pérdida de expresión no parece ser debidas al silenciamiento epigenético<sup>164</sup>, hMLH1 presenta falta de expresión proteica, como consecuencia de la metilación anormal de su promotor. En la mayoría de los casos, estas 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 MutLα 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 en una forma no activa<sup>165,166</sup>.

## EPIGENÉTICA

La organización del genoma en la célula viene determinada por el empaquetamiento del DNA en una estructura muy compacta llamada cromatina. Esta estructura es la que en último término establece cómo los genes son activados o silenciados por favorecer o reprimir su actividad transcripcional<sup>167</sup>.

La epigenética es la rama de la genética que se encarga de estudiar los cambios en el DNA que no afectan a la secuencia nucleotídica pero que producen cambios en su expresión. Estos cambios pueden ser transmitidos a las células hijas, y en la mayoría de los casos se ha comprobado que pueden ser revertidos. Hasta la fecha, han sido identificados muchos tipos de procesos epigenéticos siendo los más estudiados la metilación del DNA, el remodelamiento de la cromatina, la acetilación de histonas y los RNA de interferencia. Todas estas modificaciones epigenéticas intervienen en procesos celulares de especial importancia biológica, entre ellos el cáncer. La regulación epigenética más importante en cáncer aparece en los genes supresores de tumores y genes relacionados con la reparación del DNA y es de suma importancia ya que en células cancerosas estos genes no solo presentan alteraciones puntuales en su secuencia codificante, sino también defectos epigenéticos.

## 4. METILACIÓN DEL DNA

De todas las modificaciones de la cadena de DNA, exceptuando los cambios de secuencia, es la metilación el proceso con más repercusión biológica y más estudiado hasta el momento. La metilación del DNA constituye un mecanismo de supresión de la expresión génica y es el principal regulador de los

genomas “in vivo”. Esta modificación consiste en la unión covalente de un grupo metilo en la posición 5' del nucleótido citosina para formar metilcitosina. Esta reacción se lleva a cabo mediante enzimas de la familia de las DNA metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) que transfieren estos grupos metilo desde un sustrato<sup>168</sup> (figura 12A).

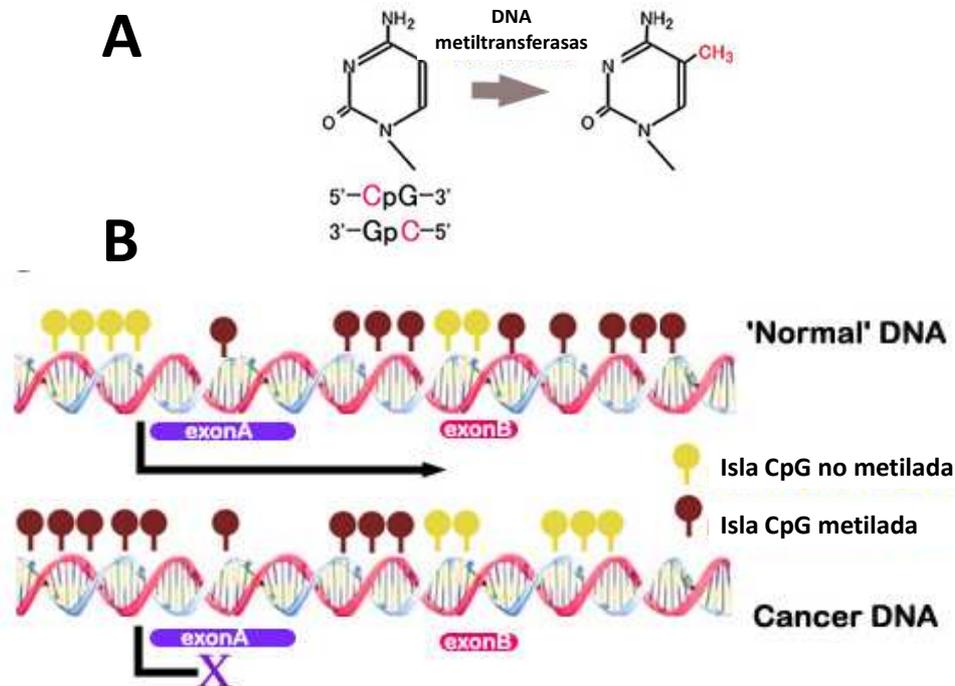


Figura 12, A) Metilación de las citosinas de las islas CpG a metilcitosinas por acción de las DNA metiltransferasas, B) Efecto de la hipermetilación de DNA en cáncer por silenciamiento de la expresión génica.

De forma general, las citosinas susceptibles de metilación son las que se encuentran en los dinucleótidos CGs llamándose islas CpG, por encontrarse reunidas en grupos y unidas por fosfatos. Las islas CpG se encuentran de forma frecuente en regiones promotoras de los genes, regiones centroméricas, retrotransposones, etc. Por esta razón, los efectos de la metilación del DNA producen una inhibición de la transcripción; al bloquear la unión de factores de transcripción<sup>169</sup>.

Cuando la metilación de los promotores se potencia, se produce un silenciamiento de genes que ven disminuida su expresión. En el contexto del cáncer es relevante la hipermetilación de promotores a nivel de los genes supresores de tumores, genes relacionados con la reparación de DNA, genes relacionados con el control del ciclo celular, apoptosis, etc, ya que la supresión de estos produce una ventaja en procesos de proclives al desarrollo de tumores (figura 12B)<sup>167,170</sup>.

Aunque menos estudiado y quizá con menor repercusión, el fenómeno de hipometilación de DNA, también puede contribuir al desarrollo tumoral. En este caso, las regiones susceptibles de esta metilación anormal disminuida son regiones repetitivas de retrotransposones que pueden llegar a translocarse, aumentando de esa manera la inestabilidad genómica<sup>171</sup>. También determinados promotores de oncogenes pueden ver aumentada su expresión de manera anormal y con ello su actividad, como parece ser el caso del gen R-ras<sup>172</sup>.

En los carcinomas endometriales se ha comprobado que existen varios genes que sufren este fenómeno como el gen supresor de tumores PTEN, en el que puede constituir el “second hit” que produce inactivación bialélica<sup>78,79</sup>.

Como ya se ha apuntado anteriormente, el gen hMLH1, que pertenece a la maquinaria de reparación MMR, también puede estar hipermetilado, contribuyendo a la aparición de MSI y del “fenotipo mutador” aumentando la susceptibilidad a la acumulación de mutaciones en otros genes relacionados con la carcinogénesis endometrial<sup>161,162</sup>.

A pesar de que tanto PTEN como hMLH1 son los genes con mayor inactivación por hipermetilación de sus promotores, se han descrito hipermetilación de los promotores de otros genes relacionados con el desarrollo de carcinoma endometrial, como son los genes CDH1<sup>21,131</sup> y CDKN2A<sup>20,153</sup>. Ambos genes, supresores de tumores, muestran ausencia de expresión a pesar de no detectarse alteraciones en su secuencia codificante lo que sugiere que debía de existir otro mecanismo de inactivación independiente de las alteraciones puntuales y que contribuía a su silenciamiento<sup>173</sup>.

## 5. MODIFICACIÓN DE HISTONAS

Los nucleosomas son las unidades estructurales de la cromatina y están formadas por octámeros de proteínas histonas (H2A, H2B, H3, H4) que envuelven un segmento del DNA de unas 146 bp aproximadas y que se estabilizan con el ensamblaje de la histona H1. Estas histonas presentan dos dominios: una región central plegada que interacciona con la cadena del DNA y un dominio amino terminal poco estructurado que consiste en una cadena de unos 20 a 30 aminoácidos. La composición de estas proteínas es muy característica por su elevado contenido en residuos de lisina, sobre todo en su extremo amino terminal, que les confiere carga eléctrica positiva<sup>174</sup>. Esta característica les hace idóneas para la regulación del empaquetamiento del DNA, ya que esta molécula exhibe carga eléctrica negativa por los enlaces de los grupos fosfato que unen los nucleótidos. Además, el empaquetamiento del DNA guía estructuras de compactación más complejas dando lugar a las fibras de cromatina y, en último término, a los cromosomas (figura 13). Las proteínas histonas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales por reacciones de acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, etc, en sus residuos de lisina, serina o arginina presentes en estos extremos amino terminales, llamados comúnmente colas<sup>170</sup>. De forma general, la mayoría de estas modificaciones covalentes neutraliza la carga positiva de estos residuos y desestabiliza la estructura del nucleosoma, permitiendo el desenrollamiento parcial de las hebras del DNA, y el consiguiente acceso de los factores de transcripción, que acaba 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 del DNA<sup>174</sup>. En los últimos años se ha ido desentramando el efecto de muchas de estas modificaciones en residuos concretos, determinándose que muchas de ellas también contribuyen al silenciamiento genético.

A todo el conjunto de modificaciones covalentes de las histonas y sus efectos se ha propuesto denominar “código de histonas”, ya que cada una de ellas determina específicamente el tipo de actividad que se va a producir en los genes diana y con ello se regula la actividad de las diferentes regiones de la cromatina<sup>175</sup>.

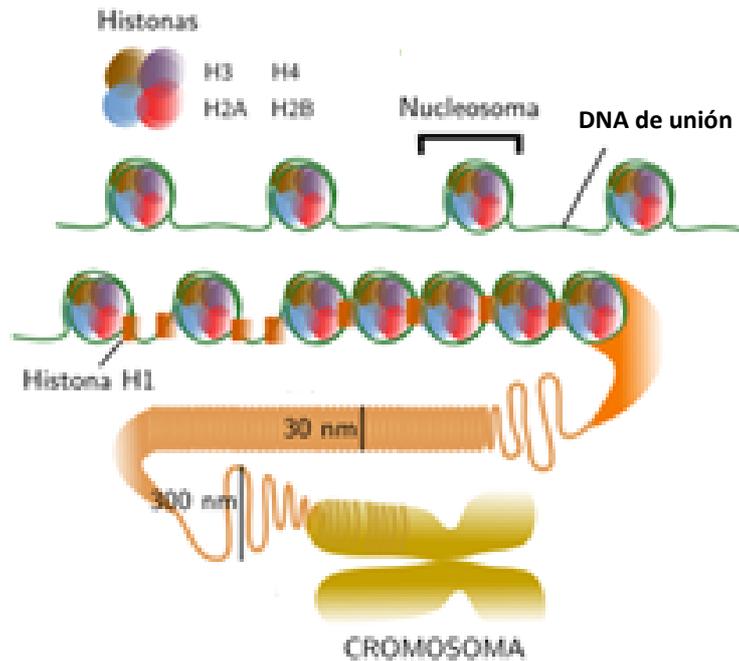


Figura 13, Empaquetamiento del DNA en los nucleosomas a través del octámero de histonas y formación de fibras de cromatina que forman los cromosomas.

## 2.1. Deacetilasas de Histonas (HDAC)

Las deacetilasas de histonas (HDAC) pertenecen a una familia de enzimas que actúan en la modificación post-traducciona de las proteínas histonas. Estas modificaciones, que suceden a través de la desacetilación de determinados residuos de lisina, ayudan a regular la actividad transcripcional del genoma<sup>176</sup>.

Hasta la fecha se han descrito 18 proteínas HDAC que pueden dividirse en al menos tres clases diferentes basándose en la homología de su secuencia, expresión, localización y requerimiento de cofactor. Las HDAC 1, 2, 3, 8 y 11, comprenden la clase I; HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10 pertenecen a la clase II y proteínas sirtius (SIRT) 1 a 7 son miembros de la clase III. Las proteínas HDAC pertenecientes a la clase I son mayoritariamente nucleares, altamente ubicuas y su secuencia consta de entre 350 y 500 aminoácidos, mientras que las HDAC de la clase II tienen más de 1000 aminoácidos, se localizan sobretodo 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<sup>+</sup> dependientes y pueden estar implicadas en otras funciones como la ubiquitinación<sup>177</sup>.

En el caso de la clase I de las deacetilasas de histonas, HDAC1 y HDAC2 se localizan exclusivamente en el núcleo de las células, mientras que HDAC3 puede encontrarse tanto en el núcleo como en el compartimento citoplasmático<sup>178</sup>. HDAC8, parece localizarse casi únicamente en el citoplasma, lo que no parece ajustarse de una forma muy precisa a la función general de las demás HDAC<sup>179</sup>.

Todas las HDAC, independientemente de la clase a la que pertenecen, actúan hidrolizando los enlaces de los grupos acetilo de los residuos de lisina que, en el caso de los nucleosomas, pertenecen a las colas de las histonas H3 y H4, histonas situadas en el centro del nucleosoma. Se han descrito de veinticuatro a veintiséis sitios potenciales de acetilación que pueden ser también modificados por la familia de enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT), que actúan catalizando el traspaso de un grupo acetilo desde una molécula de acetil-CoA a los grupos ε-amino de las lisinas, y por tanto tiene una acción antagónica a la de HDAC regulando la expresión génica mediante modificaciones transitorias y reversibles<sup>176</sup>. Así, la acetilación es característica de una estructura abierta de cromatina

transcripcionalmente competente, mientras que la desacetilación se ha asociado con un estado represivo de la cromatina cerrada y compacta que no permite la transcripción<sup>167</sup> (figura 14).

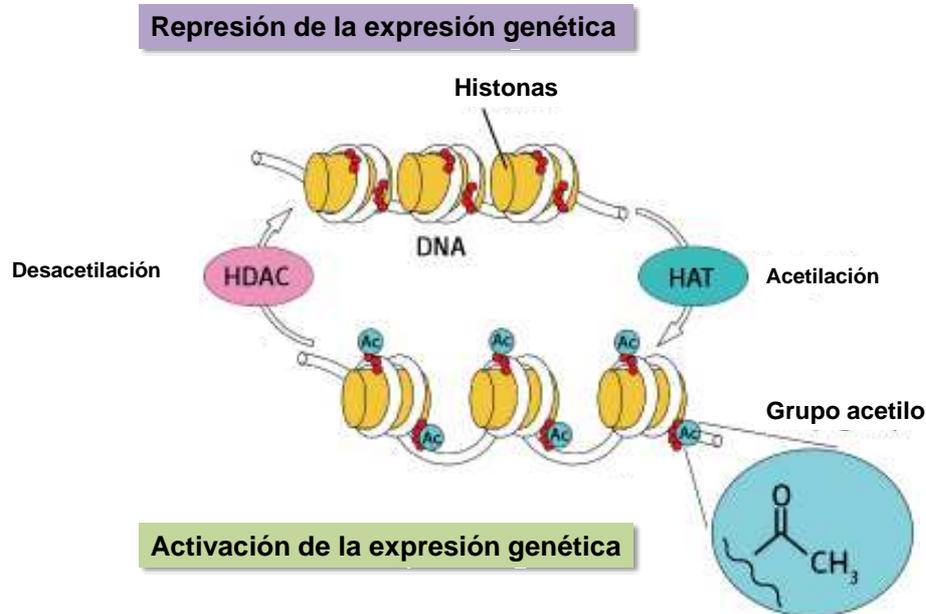


Figura 14, Efecto de la acetilación y desacetilación de histonas mediada por proteínas HAT y HDAC donde se produce activación o represión de la actividad transcripcional.

Todas las enzimas HDAC actúan formando complejos multiproteicos con factores represores de la transcripción. En el caso de HDAC1 y HDAC2 forman por lo menos tres complejos diferentes que contienen factores como mSin3A<sup>180</sup>, NRD<sup>181</sup> y CoREST<sup>182</sup>. HDAC3 por otro lado, se acompleja con N-CoR y SMRT<sup>183</sup>. Además, se ha comprobado que en estos complejos suelen estar presentes proteínas HAT, que junto con HDAC actúan de manera coordinada para producir una regulación fina del remodelamiento de la cromatina y el control de la expresión génica<sup>184</sup>.

Aunque inicialmente la acción de las proteínas HDAC fue restringida al compartimento nuclear<sup>178</sup>, en los últimos años se ha comprobado que su actividad comprende también la desacetilación de otras proteínas no histónicas, que pueden localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma, como son los casos de p53 y  $\alpha$ -tubulina, entre otras<sup>145,185,186</sup>.

En los últimos años y debido a todas estas acciones en la regulación de la expresión génica a través de la transcripción y modificación post-traduccional de determinadas proteínas, se ha empezado a relacionar a las HDAC con procesos de regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación, inhibición de la angiogénesis, apoptosis y por tanto en cáncer<sup>167,170,176</sup>. De forma general y en lo referente a la relación de HDACs con el desarrollo de cáncer, se ha observado una sobreexpresión generalizada de estas proteínas en diversos tipos de tumores. Así, se ha descrito una sobreexpresión de HDAC1 en cáncer de próstata<sup>187</sup>, mientras que HDAC2 se detecta elevada en cáncer gástrico, colorrectal, etc<sup>188,189,190</sup> y este aumento parece correlacionarse con una disminución de los niveles de p21. Muy recientemente ha sido descubierta la primera mutación en el gen de HDAC2 en el 25% de los tumores de colon, estómago y endometrio<sup>191</sup>.

Las proteínas HDAC están relacionadas con cambios en la expresión de genes implicados con la activación de receptores hormonales esteroideos como son los de estrógeno y progesterona que, a su vez, están estrechamente relacionados con la aparición de tumores endometrioides<sup>178,192</sup>. Además, se les ha relacionado con modificaciones de proteínas implicadas en los procesos tumorigénicos de los carcinomas endometriales como son p53<sup>185</sup>, PTEN<sup>193</sup>, PI3K<sup>194</sup>.

En los últimos años, han cobrado especial interés en el campo de las nuevas terapias los inhibidores de deacetilasas de histonas (HDACI) que en ensayos sobre líneas celulares de carcinoma endometrial han obtenido resultados positivos y prometedores. Los HDACI producen la muerte celular restaurando la integridad de las rutas apoptóticas que han sido bloqueadas o suprimidas en cáncer<sup>195</sup> y en algunos estudios clínicos se está probando su eficacia en el tratamiento de cánceres hematológicos y tumores sólidos<sup>196,197</sup>.

## 2.2. Otros Efectos Post-Traduccionales de Histonas

Hasta el momento han sido descubiertas y caracterizadas hasta ocho modificaciones covalentes de histonas, de entre las cuales, las más estudiadas son la acetilación, metilación y fosforilación<sup>198</sup> (tabla 3). La metilación puede suceder tanto en residuos de lisina como de arginina y de forma múltiple, es decir, pueden aparecer mono-, di- o trimetiladas, lo que dificulta su estudio en los efectos que presenta sobre la cromatina. Estas modificaciones son producidas por enzimas metiltransferasas de histonas (HMT), y a diferencia de la metilación de DNA, puede producir activación o represión de la transcripción dependiendo de qué residuo es modificado y el tipo y grado de modificaciones existentes. Un ejemplo de esto ocurre cuando se produce una trimetilación de las lisinas 4, 36 y 79 de la H3 lo que produce una activación de los promotores, mientras que la trimetilación de las lisinas 9 y 27 de la misma histona y 20 de la H4 produce represión transcripcional<sup>199</sup>. Sin embargo, esta correlación todavía no está clara ya que otras modificaciones en otras histonas o en las mismas pueden interferir en el resultado.

Con la excepción de la metilación, las demás modificaciones producen un cambio en la carga neta de los nucleosomas, que afecta a las interacciones DNA e histónicas u otros factores que pudieran acceder a la cromatina. Todas estas modificaciones requieren de familias de enzimas que catalizan la transferencia de los grupos químicos, así como enzimas que los eliminan, y que por tanto son susceptibles de interferir en los procesos dinámicos de la regulación de la transcripción y con ello en la carcinogénesis<sup>200</sup>.

**Tabla 3. Resumen de las posibles modificaciones post-traduccionales de histonas, donde se apunta el tipo de modificación, la función sobre la transcripción y la familia de enzimas que la realiza<sup>198</sup>.**

Modificación	Función	Enzimas
<b>Acetilación</b>	Activación de la transcripción	Acetiltransferasas (HAT)
<b>Metilación de lisinas</b>	Activación o represión de la transcripción	Lisina metiltransferasas (MTA)
<b>Metilación de argininas</b>	Activación o represión de la transcripción	Arginina metiltransferasas (MTA)
<b>Fosforilación</b>	Activación de la transcripción	Serina/treonina kinasas
<b>Ubiquitinación</b>	Activación o represión de la transcripción	Ubiquitilasas
<b>Sumoilación</b>	Represión de la transcripción	¿?
<b>ADP-ribosilación</b>	¿Activación o represión de la transcripción?	Poli ADP-ribosapolimerasas (PARPs)

## 6. REMODELAMIENTO DE LA CROMATINA

El remodelamiento local de la cromatina y los cambios dinámicos de los nucleosomas en el empaquetamiento del DNA son puntos clave en la regulación de la expresión génica, que posteriormente afectará al correcto funcionamiento de la célula, a su diferenciación y proliferación posterior. La propia estructura de la cromatina puede alterar, de igual modo que lo hacen las enzimas modificadoras de histonas, la activación transcripcional, bloqueando o favoreciendo el acceso de factores de transcripción a las secuencias que reconocen, evitando el ensamblaje de la maquinaria basal de transcripción<sup>201</sup>.

Este punto de regulación aparece por modificación en este caso, no covalente, de nucleosomas y se basa en la posición que ocupan éstos en el DNA y que llevan asociados la hidrólisis de ATP<sup>202</sup>. Este efecto produce desplazamiento o desestabilización de los nucleosomas, produciendo el encubrimiento o exposición de la secuencia de DNA. En los genomas eucarióticos se ha comprobado que existe un patrón de colocación de estos 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 al lugar de 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 transcripción<sup>203</sup>.



# ***HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS***

## ***HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS***

Los carcinomas endometriales son los tumores ginecológicos más comunes en países desarrollados<sup>1</sup>. La mayoría de los casos pueden dividirse en dos categorías basadas en las características clínico-patológicas de las pacientes y las características moleculares de los tumores. Además, la transición de endometrio sano a carcinoma parece venir determinado por la acumulación seriada de alteraciones en las vías de señalización celular, desencadenando disfunciones en los procesos celulares de crecimiento, diferenciación, apoptosis, adhesión, etc, todos ellos procesos de suma importancia para el mantenimiento de la estabilidad celular<sup>12,41</sup>.

Los cambios moleculares más comunes en el carcinoma endometrial han sido intensamente estudiado y se relacionan con las vías señalización intracelular de PTEN<sup>8,9</sup> y PI3K<sup>86</sup>, KRAS<sup>10</sup>, Wnt<sup>14,21</sup>, p53<sup>17,34</sup>, etc. No obstante, la patogénesis molecular del carcinoma endometrial continúa sin ser totalmente entendida y resulta controvertida.

Por otra parte, en la carcinogénesis endometrial esporádica se aprecia la aparición de inestabilidad de microsatélites (MSI) como evento en la formación del tumor<sup>4</sup>, lo que sugiere la disfunción de alguno de los integrantes de la maquinaria MMR. La causa de esta inestabilidad se atribuye mayoritariamente a los procesos de hipermetilación del promotor del gen hMLH1<sup>161,162</sup>. No obstante, como en carcinoma endometrial hereditario se han descrito mutaciones en los genes del sistema MMR<sup>155</sup>, hMLH1 y hMSH2, en tumores de endometrio esporádicos constituyen un proceso no muy estudiado a pesar de que el silenciamiento epigenético de hMLH1 no explica todos los casos con MSI.

Las HDAC clase I, junto con las HAT, actúan en el control de la expresión genética por modificación de la afinidad histona-DNA formando parte de complejos multiproteicos junto con los receptores de estrógeno<sup>177</sup> y p53<sup>137</sup>, dos factores implicados en la transformación de endometrio sano a tumoral. El interés de estas proteínas en procesos tumorales se incrementa por la aparición de HDACI como nueva terapia anticancerosa<sup>195,196,197</sup>. Por todo ello, resulta de gran interés el estudio de la implicación de estas proteínas en el desarrollo de cáncer de endometrio esporádico.

Por ello, nos hemos propuesto como objetivos de este trabajo:

- **Primer objetivo:** estudiar la organización de los genes PTEN, PIK3CA, KRAS, BRAF, CTNNB1, TP45, CDH1 y CDKN2A.
- **Segundo objetivo:** estudiar la inestabilidad de microsatélites, la presencia de patrones de metilación alterados en los promotores de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6; y la incidencia de mutaciones en los genes hMLH1 y hMSH2.
- **Tercer objetivo:** estudiar la expresión de las proteínas deacetilasas de histonas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en carcinoma endometrial y analizar la presencia de la mutación en la región A<sub>9</sub> del exón 1 del gen de HDAC2.



## ***PACIENTES y métodos***

## 5. PACIENTES

### 5.1. TEJIDO TUMORAL

Se han estudiado 42 muestras de carcinoma endometrial procedentes del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, obtenidas por extirpación quirúrgica e inmediata conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Estas muestras fueron analizadas para establecer el tipo y grado histológico según las recomendaciones de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>25</sup>, concluyéndose que la muestra se componía de 28 carcinomas endometrioides de diferente grado y variante, 5 carcinomas serosos, 1 carcinoma de células claras, 2 carcinomas mixtos y 6 sarcomas (5 carcinosarcomas y 1 sarcoma del estroma). La edad media de las pacientes con carcinoma endometrial fue de 69 años  $\pm 10$ .

### 5.2. SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron, siempre que fue posible, por venopunción antecubital de las pacientes operadas de carcinoma endometrial en el servicio de Ginecología del Hospital Clínico de Salamanca e inmediata conservación a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Todas ellas fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

## 6. OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE TEJIDO TUMORAL Y SANGRE PERIFÉRICA

La obtención de DNA a partir de tejido tumoral se realizó a partir de 100 mg de muestra, que se homogenizó con Politron® en 0,75  $\mu\text{L}$  de tampón Fornace (0,25 M Sacarosa, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

La obtención de las 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  $\text{ddH}_2\text{O}$  (bidestilada) a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, 1500 r.p.m.). Tras la recuperación de la interfase y lisis de la fracción eritrocitaria, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos. El botón de células nucleadas se resuspendió nuevamente en tampón Fornace a una concentración estimada de  $5 \times 10^6$  células/mL.

La extracción de DNA continuó añadiéndose EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) 0,5 M pH 8, el cual es un quelante de iones divalentes que dificulta la acción de las endonucleasas; SDS (Dodecil Sulfato Sódico) a una concentración final de 10%, que disuelve las membranas celulares; y Proteinasa K (Boehringer Mannheim), a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que degrada proteínas. Esta mezcla se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 8 a 16 horas. Tras esta incubación, se procedió con un tratamiento de fenol tamponado y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y se sometió a centrifugación. El DNA, que quedó en la fase acuosa, se limpió de otros residuos resuspendiendo la fracción correspondiente en CIAA y sometiendo a otra centrifugación. Tras este paso, se añadió a la fase acuosa, etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), lo cual hizo precipitar el DNA. Este se recuperó y lavó con etanol 70% con una centrifugación, se dejó evaporar el etanol residual y, posteriormente, se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$ .

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA obtenido, se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro Nanodrop® ND1000 por medio de la siguiente fórmula:

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

El multiplicador 50 es un factor de corrección introducido debido a que la unidad de densidad óptica con luz de longitud de onda 260 nm corresponde con el valor de absorbancia que tienen 50 µg de DNA/mL.

Se considera como valores adecuados de cociente  $D.O_{260}/D.O_{280}$ , los comprendidos entre 1,65 y 2,0, para la medida del grado de contaminación proteica. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del DNA. Valores superiores parecen indicar un exceso de RNA, el cual se eliminó con un tratamiento de RNAsa y purificación nuevamente según el método antes descrito.

Las muestras de DNA de concentración aproximada entre 1000 y 1500 µg/mL, se almacenaron en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación bacteriana.

## **7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS**

### **7.1. 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 Politrón®. Una vez homogeneizado, se incubó en hielo durante 30 minutos, durante los cuales se realizaron repetidos vortex y, posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación, se recogió el sobrenadante, que es el que contiene 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.

### **7.2. 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 1x PBS. En cada placa de cultivo se añadieron 800 µL de tampón de lisis frío con inhibidores de proteasas (Amersham Pharmacia Biotech). 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 vortex durante 1 minuto y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 10000 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® ND1000 a valores de absorbancia de 260 nm.

## **8. ESTUDIO MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS CON EL CARCINOMA ENDOMETRIAL**

## 8.1. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Las reacciones de amplificación se realizaron con los productos comerciales Eppendorf® 5 prime y Master Mix (Promega). Cada reacción fue preparada añadiendo 12,5  $\mu\text{L}$  de mezcla comercial (22 mM tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM  $\text{MgCl}_2$ , 220  $\mu\text{M}$  dNTPs, 22 U Taq DNA polimerasa), 1,0  $\mu\text{L}$  de mezcla de los dos oligonucleótidos flanqueantes y 1,0  $\mu\text{L}$  de DNA obtenido por el método anteriormente descrito (concentración entre 0,1 y 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El volumen final de reacción fue en todos los casos 25  $\mu\text{L}$ , que se ajustó con ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de Applied Biosystems. Las condiciones generales de amplificación en el termociclador fueron las siguientes (figura 15):

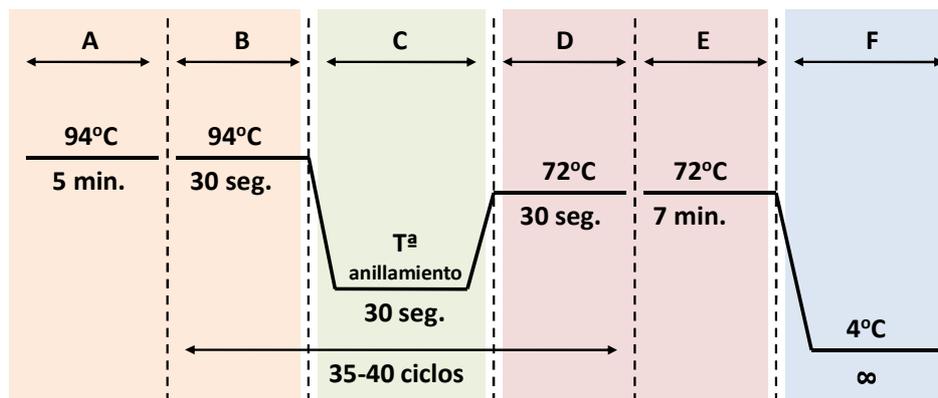


Figura 15, Esquema representativo de los programas del termociclador para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR, donde A es el tiempo de desnaturalización previa, BCD son las tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación, y E es el tiempo de extensión final seguido de una bajada de temperatura para su conservación (F), cuando finaliza. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo y el número de ciclos de BCD.

Para asegurar la ausencia de contaminación en la amplificación y que las reacciones hayan sido específicas, para cada mezcla de reacción se preparó siempre como control negativo una reacción paralela conteniendo todos los reactivos menos el DNA a amplificar.

## 8.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados o purificados de DNA, fueron separados por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5-2% con tampón 0,5<sub>x</sub> TBE (10<sub>x</sub> -0,089M Tris base, 0,089 M ácido bórico, 0,5 M EDTA (pH 8,0)).

En un pocillo de cada hilera en el gel de agarosa se cargaron 8  $\mu\text{L}$  de un marcador de tamaño de DNA comercial que corresponde con el DNA del fago  $\phi\text{X-174}$  digerido con la endonucleasa HaeIII. Este marcador de tamaño de DNA genera fragmentos de: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 bp. Para monitorizar la migración del DNA a través del gel se incluyeron en el tampón de carga los colorantes xileno, cianol y azul de bromofenol. Las electroforesis se llevaron a cabo con una diferencia de potencial eléctrico constante de 120V durante 30 minutos.

Tras la electroforesis, los fragmentos se visualizaron utilizando Sybr Safe® (0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas de DNA y emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV. Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un software informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D).

### 8.3. DETECCIÓN DE MUTACIONES MEDIANTE CSGE-HETERODÚPLEX

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 16). La preparación de las muestras para la electroforesis fue de 4 a 15 µL de los productos de PCR mezclado con 1 a 3 µL de tampón de carga (Cambrex).

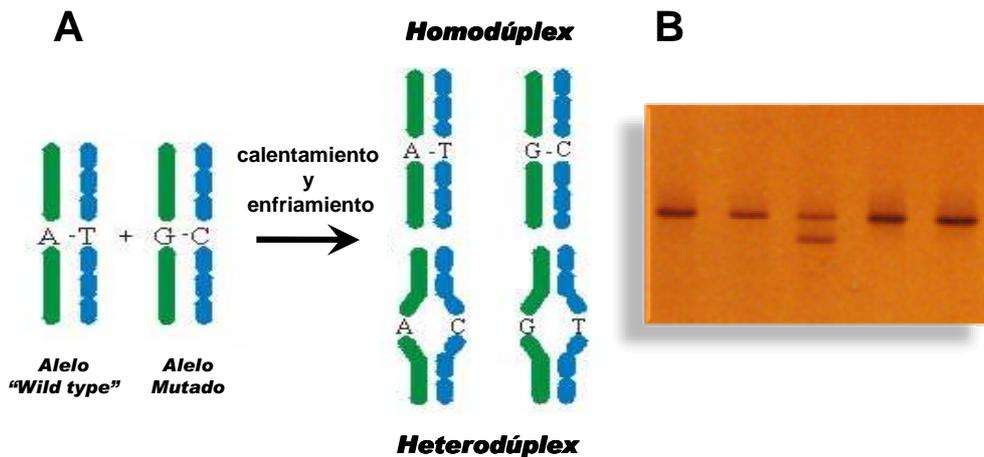


Figura 16, A) Esquema de la formación del heterodúplex tras la desnaturalización y renaturalización de los fragmentos amplificados en heterocigosis. B) Visualización de este heterodúplex en los gels de CSGE.

Se emplearon para ello, gels MDE (Cambrex), 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: ddH<sub>2</sub>O 7,705 mL, formamida 99% 5,98 mL, etilenglicol 99% 4,025 mL, TBE 10<sub>x</sub> 2,415 mL, MDE® 2<sub>x</sub> 20,125 mL, TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina) 36,8 µL, AMPS (persulfato de amonio) 25% 138 µL para un volumen final de 40,25 mL. La electroforesis se llevó a cabo con tampón 0,6<sub>x</sub> TBE. A cada gel se le aplicó una diferencia de potencial eléctrico constante de 20V/cm durante 12 a 18 horas, o 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 PlusOne® DNA Silver kit (Amersham Biosciences) 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.

### 8.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR

La purificación de fragmentos de DNA procedentes de amplificación fue realizada mediante el sistema de 5 Prime PCR Extract®, 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. 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.

## 8.5. SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La secuenciación automática de los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. La visualización de las secuencias se llevó a cabo con ayuda del software Chromas.

## 8.6. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CARCIOMA ENDOMETRIAL

### 8.6.1. ANÁLISIS DEL GEN PTEN

Se amplificaron los 9 exones del gen PTEN en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 4).

Una vez realizada la amplificación, fueron analizados por secuenciación automática directa los fragmentos correspondientes a los exones 5, 6, 7 y 8; y mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex, los fragmentos correspondientes a los exones restantes. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

Tabla 4, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 9 exones del gen PTEN, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T° anillamiento
1	TCCTCCTTTTCTTCAGCCAC	GAAAGGTAAGAGGAGCAGCC	147	54
2	GCTGCATATTTCAATCAAACATA	ACATCAATATTTGAAATAGAAAAT C	116	54
3	TGTTAATGGTGGCTTTTTG	GCAAGCATACAAATAAGAAAAC	114	50
4	TTCCTAAGTGCAAAAGATAAC	TACAGTCTATCGGGTTAAGT	147	54
5	TTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTATC	GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	312	50
6	AGTGAAATAACTATAATGGAACA	GAAGGATGAGAATTCAAGC	232	55
7	AATACTGGTATGTATTTAACCAT	TCTCCAATGAAAGTAAAGTA	220	55
8	TTTTTAGGACAAAATGTTTAC	CCCACAAAATGTTTAATTTAAC	258	55
9	GTTTTCATTTAAATTTCTTTC	TGGTGTTTTATCCCTCTTG	245	54

### 8.6.2. ANÁLISIS DEL GEN PIK3CA

Se amplificaron los exones 7, 9 y 20 del gen PIK3CA en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 5).

Tabla 5, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los exones 7, 9 y 20 del gen PIK3CA, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
7	CCTTTTGGGGAAGAAAAGTG	GAGAGAAGGTTTACTGCCATAA	284	54
9.1	TGAAAATGTATTTGCTTTTCTGT	TCTCCTGCTCAGTGATTCAGAG	195	51
9.2	GGGAAAATGACAAAGAACAGC	ACATGCTGAGATCAGCCAAA	174	51
20.1	CATTTGCTCCAAACTGACCA	TGTGTGGAAGATCCAATCCA	288	54
20.2	TTGGCTCTGGAATGCCAGAA	GGTCTTTGCTGCTGAGAGT	257	51

Una vez amplificados, los fragmentos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.3. ANÁLISIS DEL GEN KRAS

Se amplificaron los exones 2 y 3 donde se encuentran los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 6).

Tabla 6, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los exones 2 y 3 del gen KRAS, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
2	GATACACGTCTGCAGTCAACTG	GGTCTGCACCAAGTAATATG	340	57
3	GGTGCCTGAATAATCCAGACT	CATGGCATTAGCAAAGACTCA	300	57

Una vez amplificados los fragmentos, fueron analizados mediante secuenciación automática directa. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.4. ANÁLISIS DEL GEN BRAF

Se amplificaron los exones 11 y 15 del gen BRAF en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 7).

Tabla 7, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los exones 11 y 15 del gen BRAF, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
11	TCCCTCTCAGGCATAAGGTAA	TAACACTGTTTCAGTATTAT	231	53
15	AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG	GGCCAAAATTTAATCAGTGG	231	55

Una vez amplificados, los fragmentos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex. Posteriormente y siempre que fue necesario, se extendió el análisis a las muestras de DNA

de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.5. ANÁLISIS DEL GEN CTNNB1

Se amplificó el exón 3 del gen CTNNB1 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 8).

**Tabla 8, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR del exón 3 del gen CTNNB1, con el tamaño del producto y la temperatura de anillamiento empleada en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
3	TGCTTTTCTTGCTGTCTTTC	CTGACTTTCAGTAAGGCAATGA	400	54

Una vez amplificado, el fragmento fue analizado mediante secuenciación automática directa. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.6. ANÁLISIS DEL GEN TP53

Se amplificaron los exones del 4 al 10 del gen TP53 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 10).

**Tabla 10, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los exones del 4 al 8 del gen TP53, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
4	CAACGTTCTGGTAAGGACAA	GCCAGGCATTGAAGTCTCAT	445	58
5	GCCGTGTTCCAGTTGCTTTA	AGGAGGGGCCAGACCTAAGA	351	60
6	AGCGCTGCTCAGATAGCGAT	TAAGCAGCAGGAGAAAGCCC	331	58
7	AAGGCGCACTGGCCTCATCTT	GAGGTGGATGGGTAGTAG	266	58
8	GACCTGATTCCTTACTGCCT	TCTCCTCCACCGCTTCTT	219	58
9	GGAGACCAAGGGTGCAGTAT	GCCCCAATTGCAGGTAAAAC	233	58
10	GGTACTTGAAGTGCAGTTTCT	CAGCTGCCTTTGACCATGAA	344	58

Una vez amplificados los fragmentos, fueron analizados mediante secuenciación automática directa. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.7. ANÁLISIS DEL GEN CDH1

Se amplificaron los 16 exones del gen CDH1 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 9).

Una vez realizada la amplificación, los fragmentos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex. Posteriormente y siempre que fue necesario, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

**Tabla 9, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 16 exones del gen CDH1, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
1	AATGCGTCCCTCGCAAGTCA	GTGAACCCTCAGCCAATCAG	271	52
2	TCACCCGGTTCCATCTAC	CAACCTCCTTCTTTAT	201	50
3	GCTCTTTTAAATCTGTC	GTACCAAGGCTGAGAAACCT	339	55
4	CTTGTTCTCATCTTCTTTTC	CCCTTCTCTCCTTGGTACT	260	55
5	GTTGGGATCCTTCTTACTA	AAATCCTGGTGGATGTTAC	398	55
6	CTCACTAGGTTCTTTCAG	AACCTTTGGGCTGGACA	313	55
7	AGCTTGCTAAACCTTCATC	GCTTAGACCATCACTGTATT	288	55
8	TTGGTTGTGTCGATCTCTCT	CAGATGTACCCTTAGTCG	262	55
9	GTACTTGTAATGACACATCTC	TGCCAGTTTCTGCATCTTGC	356	55
10	GTACTTGTAATGACACATCTC	AACCAGTTGTGCAAGTCAG	488	55
11	GTTGTTTGCTCGTCTATTTC	GAAGTAGCTAGGAGGTCGAG	248	55
12	TGGGGATTCACTACTCTTGC	GCATGGCAGTTGGAGCAAAGT	312	55
13	TTTCTCCCTGGTCTCATC	TGAGTCACTTGCCAGGA	386	55
14	CTCTCAACACTTGCTTC	AGAGATCACCCTGAGCTAC	206	55
15	CATAGCCTGTGTGTATGAC	CGGATGCTTGGCTTTCCAC	270	55
16	AGATGACATGTGTGCCCTTC	ATTCTGCATTCCAGCAC	390	55

### 8.6.8. ANÁLISIS DEL GEN CDKN2A

Se amplificaron los 2 exones del gen CDKN2A en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 11).

**Tabla 11, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 2 exones del gen CDKN2A, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
1	GAAGAAAGAGGAGGGGCTG	GCGCTACCTGATTCCAATTC	340	56
2	GCTCTACACAAGTTCCTTCCGTCA	GACCGGAGACTGGTCTCCCGGGCTG	481	56

Una vez amplificados, los fragmentos fueron analizados mediante secuenciación automática directa. Posteriormente y siempre que fue necesario, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.6.9. ANÁLISIS DEL GEN hMLH1

Se amplificaron los 19 exones del gen hMLH1 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 12).

Una vez realizada la amplificación, los fragmentos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex. Posteriormente y siempre que fue necesario, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración

en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

**Tabla 12, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 19 exones del gen hMLH1, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
1	TTCGACATGGCGGTGC	GTCCCTCCCAGCACG	285	56
2	ATGTACATTAGAGTAGTTGCAGACTGATAAATT	AGTTTCCAGAACAGAGAAAGGTCC	221	56
3	CAAGAAAATGGGAATCAAAGAGAT	CTAACAATGACAGACAATGTCATCAC	241	55
4	CCTTTGGTGAGGTGACAGTGG	CAGGATTACTCTGAGACCTAGGCAA	221	56
5	TTTTCCCTTGGGATTAGTATCTATC	CCCTGAAAACCTAGAAAGCAATTTTATTT	227	53
6	GGACATCTTGGGTTTTATTTCAAG	TGTTCAATGTATGAGCACTAGAACACA	235	56
7-8	GGGCTCTGACATCTAGTGTGTGTT	AAAATAATGTGATGGAATGATAAACA	417	56
9	TCTGATCTTTTGTAAATGTTTGAGTTTTG	CATAAAATCCCTGTGGGTGTTTC	241	55
10	CTGAGGTGATTTTCATGACTTGTGT	GAGGAGAGCCTGATAGAACATCTGT	251	56
11	GTGGGCTTTTCTCCCCCT	CTCTCACGTCTGGCCGG	281	56
12	TTTTTAATACAGACTTTGCTACCAGGAC	GTTTTATTACAGAATAAAGGAGGTAGGCTG	346	55
13	CCAAAATGCAACCCACAAAATT	AACCTTGGCAGTTGAGGCC	282	56
14	GGTGCTCTAGTTCTGGTGCCTG	TGCTGTGCTCCCTGGA	271	56
15	CCATTTTGTCCCACTGGTT	GAGAGTACTATTTTCAGAAACGATCAG	203	56
16	TGGGAATTCAGGCTTCATTG	GCACCCGGTGGAAATT	292	56
17	GCACTGGAGAAATGGGATTTG	CCTCCAGCACACATGCATG	221	56
18	AGTCTGTGATCCTCGTTTGAATGAG	TTGTATGAGGTCTGTCTAGTCCT	241	56
19	CATCAGCCAGGACACCAGTG	CGGAATACAGAGAAAGAACAACA	288	56

### 8.6.10. ANÁLISIS DEL GEN hMSH2

Se amplificaron los 16 exones del gen hMSH2 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 13).

Una vez realizada la amplificación, los fragmentos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex. Posteriormente y siempre que fue necesario, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

**Tabla 13, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 16 exones del gen hMSH2, con los tamaños del producto y las temperaturas de anillamiento empleadas en grados centígrados.**

Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
1	TTCGACATGGCGGTGC	GTCCCTCCCAGCACG	258	56
2	GAAGTCCAGCTAATACAGTGTGGA	AAACACAATTAATTTCTTCATTTTTATTTT	301	53
3	AGAGTTTGGATTTTTCCTTTTGC	TCATGTCAATTAAGAGCCTTCC	241	56
4	TTCATTTTIGCTTTTCTTATTCCTTTT	ATATGACAGAAATATCCTTCTAAAAAGTCACTAT	316	50
5	ACTGGATCCAGTGGTATAGAAATCTTC	GCTTCTCAGTATATGTCAATGAAAACA	285	53
6	GCGTAGTAAGGTTTCTACTAATGAGC	CATGTGGTAACCTGCAGGTTACA	256	56
7	TGAGACTTACGTGCTTAGTTGATAAATT	GCACATTGCCAAGTATATATTGTATGAG	341	53
8	TGATGCTTGTTTATCTCAGTCAAAAATT	AATCTACAACTTCTTAAAGTGGCCTT	257	53
9	GTCTTTACCCATTATTTATAGGATTTGTCA	GTATAGACAAAAGAATTATTTCCAACCTCC	217	56
10	ATTGAAAAATGGTAGTAGGTATTTATGGAA	CACATCATGTTAGAGCATTTAGGGA	274	54
11	ATATGTTTACAGTAGTACACATTGCTTCTA	TCAAATATCATGATTTTCTTCTGTTACC	249	54
12	GGGTTTTGAATCCCAAATG	ACAAAACGTTACCCCAACA	393	53
13	TGGGGGTAATATGGGCAGTA	TCCTTCTCACAGGACAGAGACA	442	48
14	TGTGGCATATCCTTCCCAATG	AATAATTTATACTAAGTAAAGGCAATTACTG A	452	55
15	TACATAAATGCTGTCTCTCTCATGC	AAAAACCTTCATCTTAGTGTCTGTTT	311	56
16	TAATTAATAATGGGACATTCATGTGT	TACCTTCATTCCACTACTGGGATTT	230	55

### 8.6.11. ANÁLISIS DEL EXÓN 1 DEL GEN HDAC2

Se amplificó el exón 1 del gen HDAC2 en las 42 muestras de DNA provenientes de tumores de endometrio utilizando los siguientes oligonucleótidos y las correspondientes condiciones de amplificación (tabla 14).

Tabla 14, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR del exón 1 del gen HDAC2, con el tamaño del producto y la temperatura de anillamiento empleada en grados centígrados.

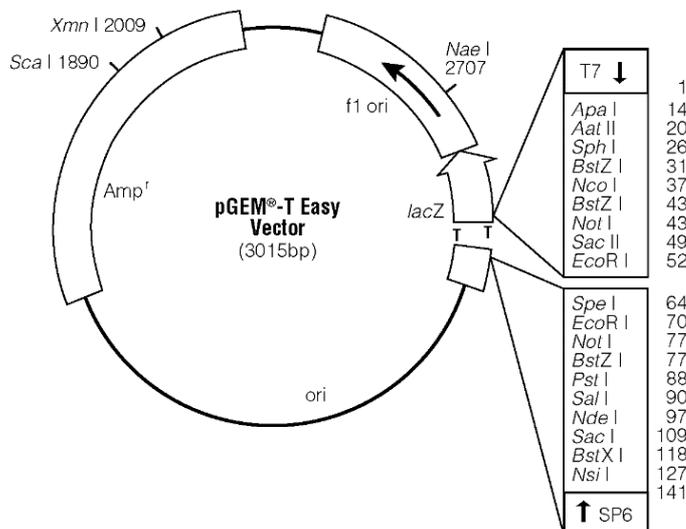
Exón	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T° anillamiento
1	ACCTCCCATTCGGAGCTTT	CCACTCACCCCTCTGAGTACT	282	55

Una vez amplificados, los fragmentos fueron analizados mediante secuenciación automática directa. Posteriormente y siempre que fue posible, se extendió el análisis a las muestras de DNA de sangre periférica de las mismas pacientes en las que había sido encontrada alguna alteración en su correspondiente muestra de DNA tumoral para comprobar la naturaleza germinal o somática de la alteración.

### 8.7. ESTUDIOS DE PERTENENCIA ALÉLICA DE MUTACIONES EN EL GEN PTEN

Para determinar la pertenencia a uno u otro alelo de las mutaciones en el gen PTEN en las muestras en las que aparecieron más de una alteración puntual se recurrió al clonaje de los fragmentos DNA de interés en vectores de clonación.

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), 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<sup>r</sup>*) (figura 17).



**Figura 17. Esquema del vector de clonación pGEM®-T easy (Promega). 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  $\mu\text{L}$  DNA del inserto y 20 ng del vector. Dicha mezcla se incubó en presencia de la enzima T4 DNA ligasa 1U, 1  $\mu\text{L}$  de tampón específico (2x Rapid ligation buffer) y ddH<sub>2</sub>O hasta un volumen de 10  $\mu\text{L}$  durante 3 a 4 horas a una temperatura de 22°C o bien durante 15 horas a temperatura de 15°C.

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de la cepa bacteriana competente TG1 derivada de *E. Coli*. 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.<sub>600</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> 100 mM a 4°C y, después de una nueva centrifugación de iguales condiciones, las bacterias se resuspendieron en 100 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Se distribuyeron en cantidades de 120  $\mu\text{L}$  que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana, se utilizó a un volumen de 30  $\mu\text{L}$  de bacterias competentes, descongeladas en hielo previamente, que se incubaron con 5  $\mu\text{L}$  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 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de IPTG (20 mg/mL), que induce la transcripción del operón *LacZ*, y 50  $\mu\text{L}$  del sustrato X-Gal (20 mg/mL), en medio sólido preparado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 12h.

Las colonias blancas, que no adquirieron coloración azul debido a que la clonación del inserto interrumpía la secuencia codificante del operón *LacZ* presente en el vector, se sembraron en 8 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 1500 r.p.m 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 Rapid DNA plasmid Miniprep® (GeneDan S.L.) según las especificaciones del fabricante, empleando una lisis alcalina seguido de un paso de precipitación y neutralización que hace 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 analizar si 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 *SacII* (Fermentas) cuyos sitios de corte se encuentran localizados a ambos lados del inserto y se usó un tampón de digestión específico (10x B+ buffer). 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%.

Por último, 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.

## **8.8. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD DEL GEN PTEN MEDIANTE DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS**

Para comprobar la presencia de los dos alelos en el gen PTEN en muestras de carcinoma endometrial, se procedió al estudio de un polimorfismo de este gen localizado en el intrón 4 (IVS4+109ins5), consecuencia de la inserción de las bases ACTAA.

Este estudio se realizó mediante amplificación por PCR de la región donde se localiza este polimorfismo, y posterior digestión con la endonucleasa AflII (BspTI) (Fermentas) del producto amplificado.

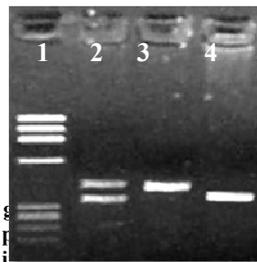
Las condiciones de la amplificación así como la secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la tabla 15.

**Tabla 15, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la región del polimorfismo IVS4+109ins5 del gen PTEN, con el tamaño del producto y la temperatura de anillamiento empleada en grados centígrados.**

PTEN	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T° anillamiento
Int 4	CTAATTGCATACACTTAATC	TAGGAAAAAGTATTGCATAAAG	453	56

La digestión del producto amplificado con la endonucleasa de elección se realizó según las especificaciones del fabricante en cuanto a concentración de reactivos, buffer utilizado, temperatura y tiempo necesario de incubación. 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 bp. Cuando el polimorfismo de la inserción de 5 bp ocurre en ambos alelos se genera una secuencia de corte para la endonucleasa AflII de tal forma que el resultado de la digestión produce un fragmento de 425 bp y 23 bp; y cuando el polimorfismo se encuentra en heterocigosis, el corte se producirá en un único alelo, generando fragmentos de tamaños 453 bp, 425 bp y 23 bp (figura 18).

El resultado de la digestión de fragmentos de PCR se resolvió realizando una electroforesis en gel de agarosa según las especificaciones apuntadas anteriormente en este trabajo.



**Figura 18, Resultado de la electroforesis en gel de agarosa del fragmento de PCR del polimorfismo IVS4+109ins5 del gen PTEN. El resultado del p**  
**heterocigota, pocillo 3 muestra homocigota sin i**  
**bp no se visualiza en los pocillos 2 y 4.**

## **8.9. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD DE TP53 MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA**

Para comprobar la presencia de los dos alelos del gen TP53 en muestras de DNA tumoral de carcinoma endometrial, recurrimos a la técnica 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 de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde (figura 19).

Por tanto, el uso de la PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, permite cuantificar la cantidad de DNA de un determinado fragmento comparando esta amplificación con otra realizada simultáneamente y siempre que ambas pertenezcan a la misma muestra. Para analizar estos cambios relativos se elige como patrón un fragmento de referencia que no varíe su carga genética en la patología a

analizar. 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.

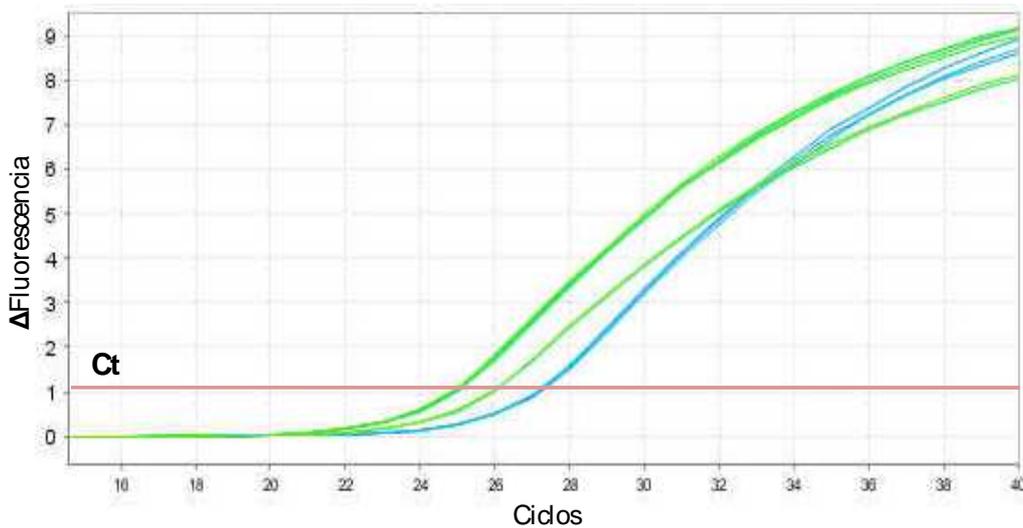


Figura 19, Gráfica de la curva de amplificación de la PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, donde se representa en el eje de abscisas el número de ciclos de la reacción y en el eje de ordenadas la diferencia de fluorescencia emitida (diferencia entre valor medido y el valor residual al inicio de la reacción) en unidades arbitrarias. El ciclo umbral corresponde con la intersección de la línea roja con el ciclo en el eje de abscisas.

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 con el exón 7 del gen TP53, el fragmento de referencia, que en nuestro caso fue una región del cromosoma 12q14.3. Además, fue necesario utilizar un control que fue sometido a las mismas amplificaciones.

En estos ensayos, utilizamos Sybr Green como agente fluoróforo, ya que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces; los oligonucleótidos empleados para las amplificaciones se muestran en la tabla 16 y cada amplificación fue realizada con 3 réplicas para minimizar la variabilidad de concentración de las muestras.

Tabla 16, Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR a tiempo real cuantitativa comparativa del gen TP53 y de la región del cromosoma 12q14.3, con sus tamaños y sus temperaturas de anillamiento.

Locus	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	T <sup>a</sup> anillamiento
TP53 ex 7	AAGGCGCACTGGCCTCATCTT	GAGGTGGATGGGTAGTAG	266	63
12q14.3	GCGGCTGCCGGGAGTCTAGACAG	GGTAGGTATTGGAGCCCG	343	

La curva de fusión (“melting”) del producto es otro parámetro que permite la caracterización del producto amplificado de acuerdo con su temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) (figura 20). Ésta curva se obtiene tras el fin de 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 nos revela un pico máximo que corresponde con esta temperatura.

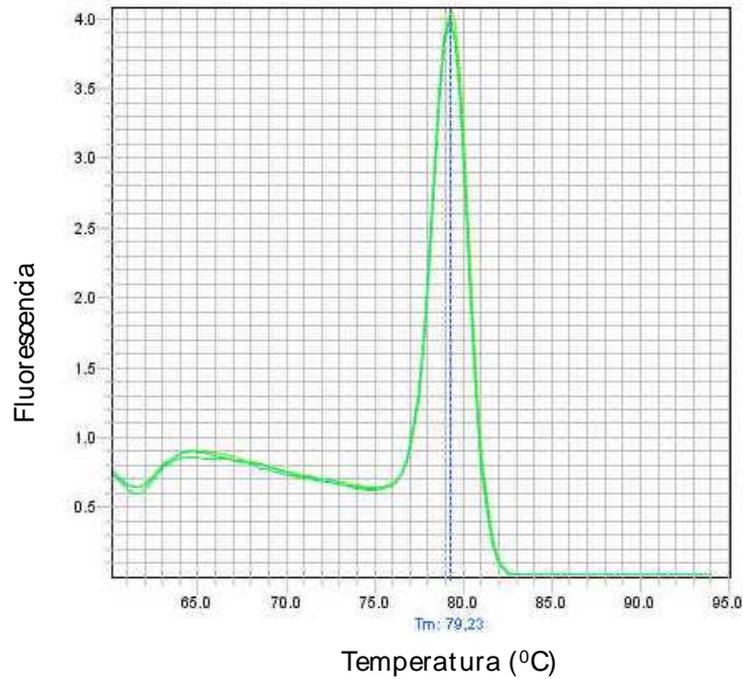


Figura 20, Gráfica de la curva de fusión del producto de amplificación, donde se representa en el eje de abscisas la temperatura en grados centígrados y en el eje de ordenadas la fluorescencia en unidades arbitrarias. La  $T_m$  corresponde con el punto más alto de fluorescencia del pico de la curva.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  con las siguientes condiciones: 10  $\mu\text{l}$  de SyBR Green® Master Mix (Applied Biosystems), 0,7  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido, 1,0  $\mu\text{l}$  de DNA a una concentración de 15 ng/ $\mu\text{l}$  mediada en un espectrofotómetro Nanodrop® ND1000 y 9  $\mu\text{l}$  de ddH<sub>2</sub>O 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 (“melting”) se expone en la figura 21.

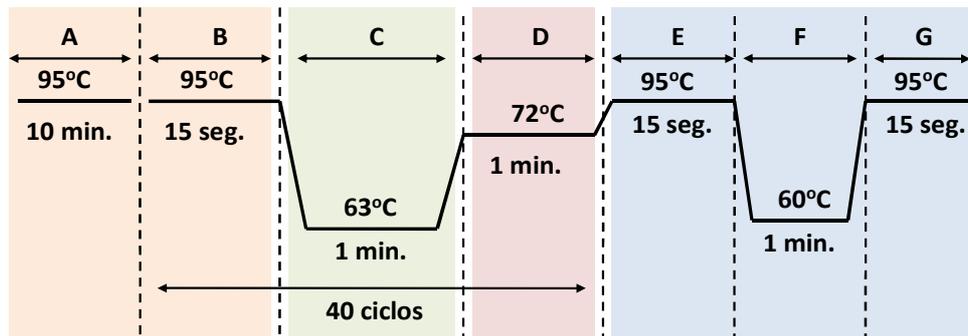


Figura 21, Esquema representativo del programa del termociclador para la cuantificación relativa de fragmentos de DNA mediante PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, donde A es el tiempo de desnaturalización previa, BCD son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y 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.

## 8.10. ANÁLISIS DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI)

Se analizó la inestabilidad de microsatélites en 11 muestras de tejido tumoral y sangre periférica. Se usaron ocho marcadores de microsatélites, incluidos los cinco recomendados en el panel de Bethesda<sup>155</sup> (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250) (tabla 17).

Tabla 17, Marcadores para el estudio de MSI donde se incluye la localización en el cromosoma y en el gen orrespondiente, 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	Tamaño (bp)
BAT25	4q12	Intrón del oncogén c-Kit	1 bp	TET	*TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC	110-130
BAT26	2p22-21	Intrón 5 del gen hMSH2	1 bp	HEX	*TGACTACTTTTGACTTCAGCCACC ATCAACATTTTTAAACC	100-120
D5S346	5q21-22	Locus del gen APC	2 bp	FAM	*ACTCACTTAGTGATAAAATCGGG AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT	100-130
D2S123	2p16	Locus del gen hMSH2	2 bp	FAM	AAACAGGATGCCTGCCTTTA GGACTTTCCACCTATGGGAC	200-230
D17S250	17q11.2	Locus cromosoma 17	2 bp	FAM	*GGAAGAATCAAATAGACAAT GCTGGCCATATATATATTTAAACC	140-170
BAT40	1p12	Intrón 2 del gen 2-β-OH-EDH	1 bp	HEX	*ATTAACCTCCTACACCACAAC GTAGAGCAAGACCACCTTG	125-130
PAX6	11p13	Locus del gen Paired Box	1 bp	HEX	*ACTTCTAGGACTCATTTCCTC CTGAATTAACAAATATTTTC	130-140
MYCL1	1p34.4	Locus del gen MYCL	1 bp	HEX	*TGGCGAGACTCCATCAAAG CTTTTAAGCTGCAACAATTC	160-170

Las reacciones de amplificación se realizaron con 0,08 µL de Gold Taq DNA polimerasa® (Applied Biosystems) 5U/µL, 1,0 µL de tampón adecuado (10x PCR Buffer II), 0,8 µL de solución de MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, 1,0 µL de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) 25 uM, 0,3 µL de cada oligonucleótido 0,3 uM 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 ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de Applied Biosystems, cuyas condiciones generales de amplificación se muestran en la figura 22.

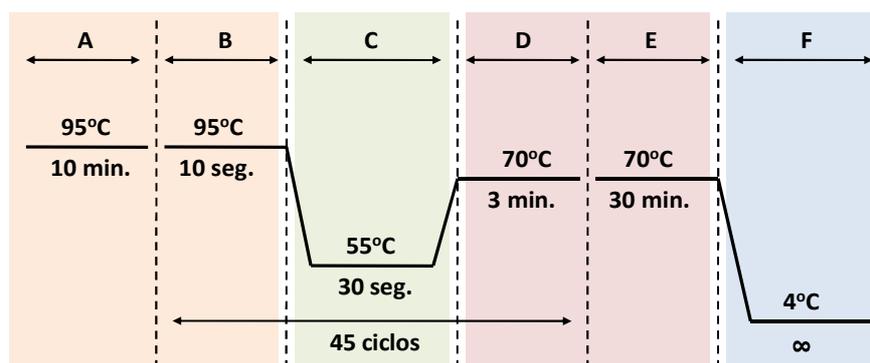


Figura 22, Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de fragmentos de DNA parande A es el tiempo de desnaturalización previa, BCD son las tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación, y E es el tiempo de extensión final seguido de una bajada de temperatura para su conservación (F), cuando finaliza. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo y el número de ciclos de BCD.

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).

Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 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 pico<sup>204</sup> (figura 23).

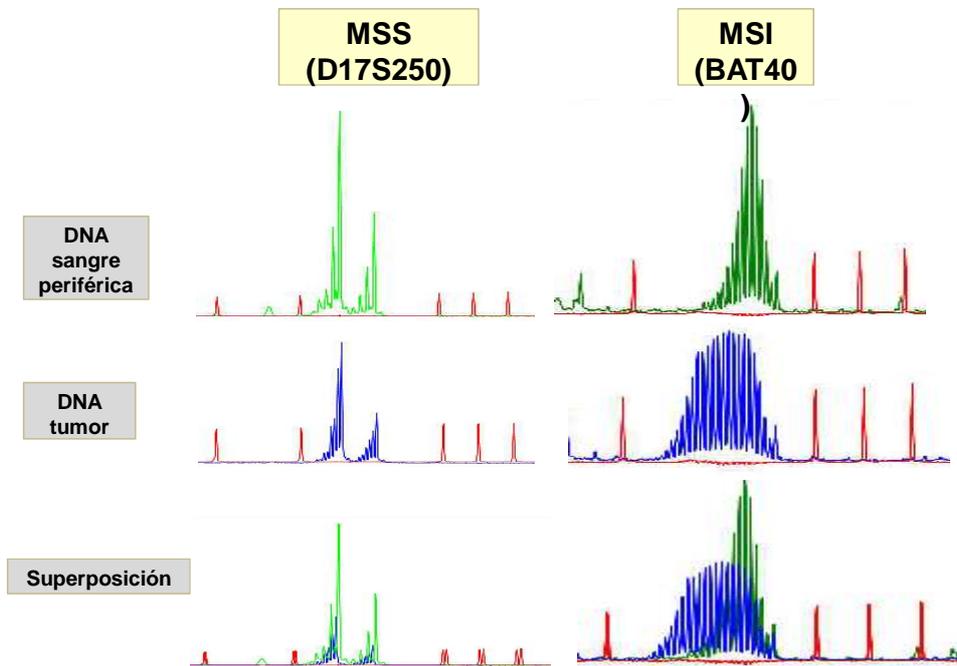


Figura 23, Espectros de las secuencias de microsatélites, donde los espectros azul y verde corresponden al marcador correspondiente (D17S259 y BAT40) y rojo a ROX500. MSS=marcador estable; MSI=marcador inestable.

## 8.11. ANÁLISIS DE GRANDES ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DE LOS GENES hMLH1 Y hMSH2

### 8.11.1. MLPA (“Multiplex Ligation–dependent Probe Amplification”)

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes hMLH1 y hMSH2 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 2002<sup>205</sup> y consta de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación.

Cada reacción de amplificación consta de dos tipos diferentes de sondas específicas (figura 24), 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.

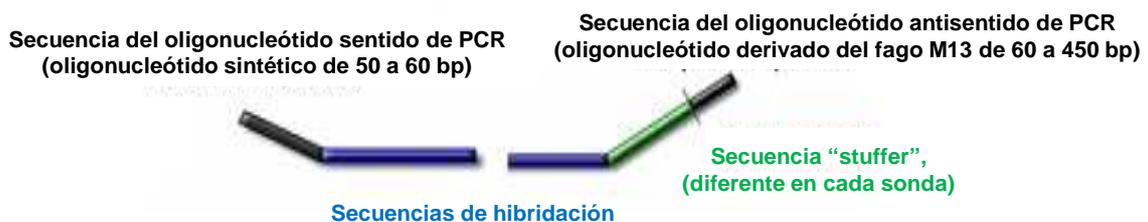


Figura 24, Esquema de las sondas empleadas para MLPA.

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 25).

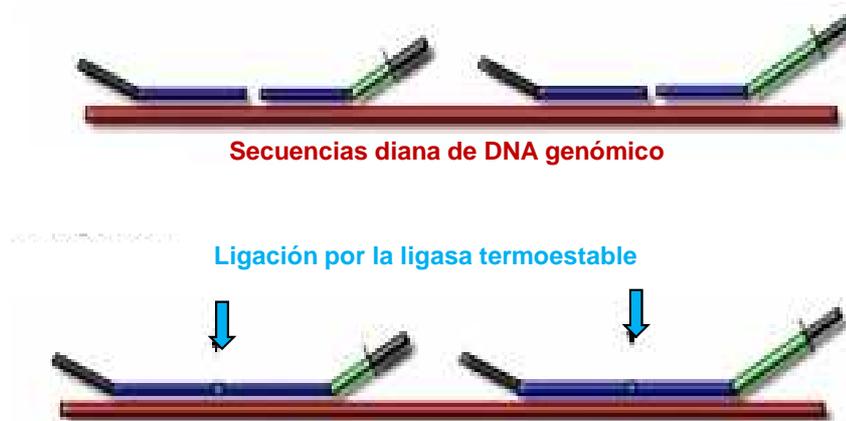


Figura 25, Etapa de hibridación y ligación de las sondas para MLPA.

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 SALSAS P003 MLH1/MSH2 (MCR-Holland, Amsterdam, Holanda). Este kit contiene una mezcla de 46 sondas para cada uno de 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 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 490 bp, según especificaciones del fabricante. La relación de sondas utilizadas, los tamaños de amplificación así como la región donde se localizan están recogidos en las tablas 56a y 56b del apartado anexos de este trabajo.

Los ensayos de MLPA se realizaron en los 42 DNA de tumor extraídos a partir de las muestras de carcinoma endometrial y en los DNA de las correspondientes muestras de sangre periférica en los que se encontró alguna alteración en la muestra tumoral. La preparación de las muestras para los ensayos de MLPA parten de 100 ng de DNA diluidos en ddH<sub>2</sub>O 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 26.

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 (GeneScan<sup>TM</sup>-500) y 2,0 µL del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0.



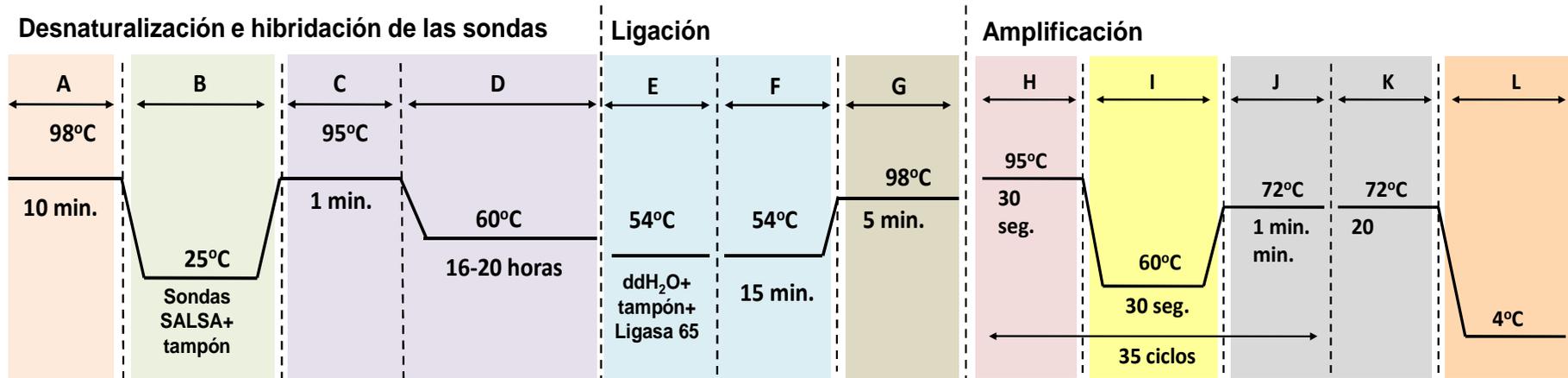


Figura 26, Esquema representativo del procedimiento para los pasos de desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación de los ensayos de MLPA, donde A es la fase de desnaturalización de DNA de la muestra. Posteriormente se añade el mix de sondas (B), seguido de la fase de hibridación de estas 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 ligación, finalmente 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 (TaqPolimerasa, 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 TaqPolimerasa (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.



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:

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

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 (delecciones o inserciones) en los productos amplificados genera valores de  $1 \pm 0,2$ . La presencia de delecciones de un alelo genera valores promedio de  $0,5 \pm 0,2$ , 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 y hMSH2 se recurrió a la técnica de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa anteriormente expuesta en este trabajo (tabla 18 y figura 21).

**Tabla 18. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR a tiempo real cuantitativa comparativa del gen hMLH1 y de la región del cromosoma 12q14.3, con sus tamaños y sus temperaturas de anillamiento.**

Locus	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño (bp)	Tª anillamiento
hMLH1 ex 3	CAAGAAAATGGGAATTCAAAGAGAT	CTAACAAATGACAGACAATGTCATCAC	241	63
hMLH1 ex 10	CTGAGGTGATTTTCATGACTTTGTGT	GAGGAGAGCCTGATAGAACATCTGT	251	
hMSH2 ex 8	TGATGCTTGTTTATCTCAGTCAAAATT	AATCTACAAACTTCTTAAAGTGGCCTT	257	
hMSH2 ex 11	ATATGTTTCACGTAGTACACATTGCTTCTA	TCAAATATCATGATTTTCTTCTGTACC	249	
12q14.3	GCGGCTGCCGGGAGTCTAGACAG	GGTAGGTATTGGAGCCCG	343	

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 20 µl cuyos componentes fueron : 10 µl de SyBR Green® Master Mix (Applied Biosystems), 0,7 µl de cada oligonucleótido, 1,0 µl de DNA a una concentración de 15 ng/µl y 9 µl de ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas. También se utilizaron controles negativos con todos los componentes de la reacción sin DNA para asegurar la ausencia de contaminación en las reacciones de amplificación. Cada amplificación fue realizada con 3 réplicas para minimizar la variabilidad de concentración de las muestras.

## 8.12. ANÁLISIS DEL ESTADO DE LA METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES hMLH1, hMSH2 Y hMSH6

### 8.12.1. MS-MLPA (“Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”)

El método MS-MLPA (PCR multiplex específica de metilación dependiente de ligación) 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 gen<sup>206</sup>. 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 HhaI que reconoce y produce un corte en la secuencia 5'-GCGC-3' cuando esta no se encuentra metilada (figura 27).



Figura 27, Esquema de las sondas empleadas para MS-MLPA.

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 bp, según especificaciones del fabricante. La relación de sondas utilizadas, los tamaños de amplificación así como la región donde se localizan están recogidos en la tabla 57 del apartado anexos de este trabajo.

Los ensayos de MS-MLPA se realizaron en los 42 DNA de tumor extraídos a partir de las muestras de carcinoma endometrial y en los DNA de las correspondientes muestras de sangre periférica. La preparación de las muestras para los ensayos partió de 100 ng de DNA diluidos en ddH<sub>2</sub>O 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 (GeneScan™-500) y 2,0 µL del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 (figura 28).

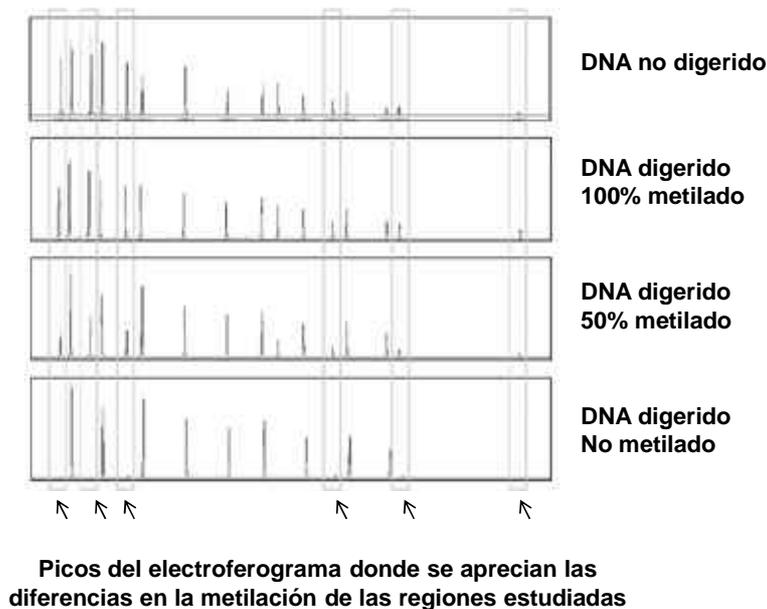


Figura 28, Electroferogramas de de las reacciones de MS-MLPA en DNA metilado, parcialmente metilado y no metilado, sometido o no a digestión con endonucleasa Hha1.

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.

## 9. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CARCINOMA ENDOMETRIAL

### 9.1. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ENDOMETRIAL

Para realizar los estudios de expresión de las proteínas en carcinoma endometrial se trabajó con 4 líneas celulares de carcinoma endometrial que se presentan la tabla 19.

Tabla 19, Líneas celulares de carcinoma endometrial utilizadas en este trabajo.

Línea celular	Especie	Tipo celular	Morfología
HEC1B	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	Células adherentes que crecen en monocapa
KLE	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	
AN3CA	<i>H. sapiens</i>	Carcinoma endometriode	
SKUT1	<i>H. sapiens</i>	Leiomiocarcinoma de útero	

Todas las líneas celulares empleadas en este estudio fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal 10% (Gibco-BRL), glutamina 1 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 U/mL.

Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en un incubador (Cultek) en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. 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 se almacenaron en crioviales en nitrógeno líquido (-179°C), donde sobreviven por periodos superiores a tres años en presencia de un agente crioprotector DMSO (dimetil sulfóxido), cuya función es la de sustituir las moléculas de H<sub>2</sub>O para evitar la formación de cristales que puedan romper estructuras celulares. Durante el proceso de descongelación, que ha de ser rápido puesto que el DMSO a temperatura ambiente es tóxico, se preparó en un tubo de 15 mL con 10 mL de medio completo atemperado, donde se fue añadiendo el contenido del criovial descongelado. Se procuró que las células se rehidrataran y que el DMSO difundiera cuanto antes.

La congelación de células y su almacenamiento para posteriores estudios, se realizó a partir de cultivo en fase exponencial que fue centrifugado a 1200 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 700 µL de medio suplementado con 200 µL de suero bovino fetal y 100 µL de DMSO. Después de una breve incubación en hielo, se dejó a -20°C durante una o dos horas. Una vez transcurrido ese tiempo se mantuvo a -80°C durante 24 horas y finalmente se almacenó definitivamente en nitrógeno líquido.

## 9.2. WESTERN BLOT

Para la realización de estudios de expresión de las diferentes proteínas relacionadas con el desarrollo de carcinoma endometrial, se recurrió al uso de la técnica Western blot por inmunodetección específica con anticuerpos, valorando la expresión de proteínas: PTEN, subunidad catalítica  $\alpha$  de PI3K (110 $\alpha$ ), HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en 38 extractos proteicos tumorales y de 4 líneas celulares de carcinoma endometrial.

### 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 contenía: 5 mL de solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (30%) (BioRad), 2,5 mL de 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,45 mL de ddH<sub>2</sub>O y 50  $\mu$ L de SDS al 20%. Para la polimerización de los geles, se añadieron 50  $\mu$ L de AMPS al 10% y 5  $\mu$ L de TEMED (Serva) por cada 10 mL de gel. El gel empaquetador se preparó al 4% y contenía: 1,33 mL de la solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida (30%), 2,5 mL de 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 6,15 mL de ddH<sub>2</sub>O y 125  $\mu$ L de SDS al 20%. Para la polimerización de los geles se añadieron 50  $\mu$ L de AMPS al 10% y 10  $\mu$ L de TEMED por cada 10 mL de gel.

### Preparación de los extractos proteicos

Los extractos proteicos utilizados para el análisis se obtuvieron de 38 pacientes y a 4 líneas celulares de carcinoma endometrial. Una vez cuantificados, se prepararon muestras de 100  $\mu$ g de proteína a las que se añadió  $\frac{1}{4}$  de volumen de tampón Laemmli 4<sub>x</sub> (40% glicerol; 200 mM Tris-HCl (pH 6.8); 10% SDS; 4%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,04% azul de bromofenol). Cada muestra fue desnaturalizada durante 2 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 y media a 150V (tiempo estimado en el cual el frente de electroforesis alcanza el final del gel) y a temperatura 4°C. El tampón de electroforesis en el que se mantuvo siempre sumergido el gel 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 Plus (Fermentas), donde los tamaños que muestra en kDa son: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 y 10.

### Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la electrotransferencia de proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa Hybond-P™ de 0,45  $\mu$ m (GE Healthcare), usando el sistema de transferencia semiseca de Bio-Rad con un tampón 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 temperatura ambiente durante 50 minutos y un voltaje constante de 15V.

### 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 ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O 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 (Bio-Rad)) antes de saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas con una solución de bloqueo preparada con TBS-T y 5% de leche en polvo descremada. El bloqueo de las membranas se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas como mínimo y en agitación suave. A continuación, se procedió a lavar el exceso de solución de bloqueo con tres lavados sucesivos de 7 a 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). 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 7 a 10 minutos cada una y en agitación suave. Es en este momento, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario preparado en TBS-T con 2,5% de BSA 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 7 a 10 minutos cada uno con TBS-T. La relación de anticuerpos y condiciones utilizados para este análisis de expresión se muestra en la tabla 20.

**Tabla 20, Relación de anticuerpos utilizados para los estudios de expresión proteica, donde se indica el origen, la dilución a la que fueron usados y el fabricante.**

Tipo Ac	Anticuerpo	Origen	Dilución	Fabricante
Primarios	Anti-PTEN	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotech
	Anti-PI3K subunidad $\alpha$	Rabbit	1:1000	Abcam
	Anti-HDAC1	Rabbit	1:2000	Abcam
	Anti-HDAC2	Rabbit	1:2000	Abcam
	Anti-HDAC3	Rabbit	1:2000	Abcam
Secundarios	Anti- $\beta$ -Actina	Mouse	1:10000	Sigma-Aldrich
	Anti-Mouse	Sheep	1:5000, 1:10000	Sigma-Aldrich
	Anti-Rabbit	Goat	1:10000, 1:12000	Chemicon International

La detección de la señal se llevó a cabo mediante el método quimioluminiscente Immobilon™ Western (Millipore). 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 autoradiográfica de alta sensibilidad Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) 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 autoradiográfica 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- $\beta$ -Actina que reconoce específicamente esta proteína endógena ubicua en el tejido y así se asegura la presencia y cuantificación exacta de las proteínas en la muestra (tabla 20). Esta detección se llevó sobre estas mismas membranas, tras la rehidratación y posterior inmunodetección específica con el método descrito anteriormente.

## 10. MÉTODOS INFORMÁTICOS

### 10.1. PROGRAMAS PARA EL ESTUDIOS *IN SÍLICO* DE MUTACIONES NO DESCRITAS

El estudio del comportamiento teórico de mutaciones “missense” en los diferentes genes no descritas previamente se llevó a cabo mediante el empleo de seis programas informáticos: PolyPhen, SNPS3D, Pmut, SIFT y Panther. PolyPhen, además, se empleó para deducir el grado de conservación de los aminoácidos. 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. Asimismo, se empleó el programa bioinformático microRNA para predecir el anillamiento de microRNAs o RNAs de interferencia en los cambios encontrados, y el programa ESEfinder para predecir de forma teórica el efecto de las mutaciones sobre el procesamiento del mRNA por unión de proteínas a su secuencia.

● **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<sup>207,208</sup>. 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 (valores del perfil) son ratios 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.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: 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.

● **SNPS3D** (<http://www.snps3d.org/>)

Este programa basa su predicción en la hipótesis de que muchos SNPs patogénicos afectan a la función de la proteína disminuyendo la estabilidad de esta. Emplea el software SVM (*Support Vector Machine*) para encontrar el patrón de diferenciación entre los SNPs asociados a enfermedad y los neutrales. La tasa de falsos positivos y negativos es de 15% y 26%, respectivamente<sup>209</sup>.

También emplea un segundo modelo que se basa en el análisis de la homología de secuencia en familias de proteínas relacionadas con proteínas humanas. El nivel de conservación de una posición y la probabilidad de observar una variación en una familia hace posible distinguir entre mutaciones patogénicas y neutrales, con una tasa de falsos positivos y negativos del 10 y 20%, respectivamente<sup>210</sup>.

Un resultado positivo para el valor de SVM indica que se trata de una variante clasificada como neutral, mientras que un valor negativo la identifica como un cambio patogénico. Cuanto mayor es el valor, más probable es la clasificación. La precisión es significativamente mayor cuando los valores son mayores de 0,5 o menores de -0,5. Para las variantes que afectan más a la función de la proteína que a la estabilidad, el modelo de estabilidad es positivo y el modelo del perfil debe ser negativo. La precisión es significativamente mayor cuando los dos métodos coinciden<sup>211</sup>.

● **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 credibilidad<sup>212</sup>. 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%.

● **SIFT** (Sorting Intolerant from Tolerant) (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>)

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. 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 aminoácido<sup>213</sup>.

Esta premisa se realiza calculando 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.

● **Panther** (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<sup>214,215</sup>.

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

● **PSIPRED** (Protein Secondary Structure Prediction) ([http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/web\\_servers/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/web_servers/))

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 dada<sup>216</sup>.

● **MicroRNA** (<http://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 patológico<sup>217</sup>.

● **ESEfinder** (<http://rulai.cshl.edu/cgibin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>)

Para saber si las variantes en la secuencia afectan a los sitios consenso de unión de las proteínas SR (Proteínas ricas en residuos de serina y treonina) y se altera la unión de éstas en los sitios ESE (“exon splicing enhancers” o sitios exónicos de potenciación del procesamiento) utilizamos el programa de predicción ESEfinder<sup>218,219</sup>. 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. A

nivel general, se consideran significativos los cambios exónicos que hacen que desaparezca algún sitio ESE.

## 10.2. BASES DE DATOS

Las mutaciones identificadas en este trabajo fueron buscadas en diversas bases de datos pertenecientes a instituciones científicas, así como en publicaciones previas<sup>129,220</sup>. De esa manera se recabó información sobre su existencia, frecuencia de aparición, patogenicidad, etc.

- **PubMed** “U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health”.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://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.

- **HGMD®** “The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetic in Cardiff”.  
[www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php](http://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.

- **COSMIC** “Catalogue of Somatic Mutations in Cancer”.  
[www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://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.

- **Agencia Internacional de Investigación del Cáncer** “IARC TP53 database”.  
[ww-p53.iarc.fr](http://ww-p53.iarc.fr)

Esta base de datos es desarrollada y mantenida por la IARC 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.

- **“The p53 Web Site”**. [p53.free.fr](http://p53.free.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.

- **“Mismatch Repair Gene Variant Database”**. [www.med.mun.ca/mmrvariants/default.aspx](http://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.

- **LOVD-INSIGHT** “Leiden Open Variation Database”. [www.insight-group.org/mutations](http://www.insight-group.org/mutations)

Esta base de datos creada por la Sociedad Interancional 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, que en el caso de este trabajo corresponden con los genes hMLH1 y hMSH2.

# ***Resultados***

# ANÁLISIS DE GENES IMPLICADOS EN CARCINOMA ENDOMETRIAL

## 1. ANÁLISIS DE GENES SUPRESORES DE TUMORES

### 1.1. PTEN

El estudio del gen PTEN en carcinoma endometrial incluyó el análisis mutacional de los nueve exones y los extremos intrónicos flanqueantes, el estudio de pertenencia alélica en los casos donde se encontraron múltiples mutaciones, y el estudio de pérdida de heterocigosidad en casos con mutaciones homocigotas. Además, se realizaron estudios de expresión de la proteína PTEN en extractos proteicos tumorales y en líneas celulares de carcinoma endometrial.

#### 1.1.1. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN PTEN

El estudio del gen PTEN en 42 tumores endometriales mostró 23 mutaciones en 24 casos (57,1%) y 2 polimorfismos. 24 de estas variantes se encontraron en la región codificante y sólo una de ellas se localizó en una región intrónica. 19 mutaciones se hallaron en tumores de tipo endometriode, y cuatro en tumores de tipología mixta y sarcomas. Asimismo, en cinco tumores se observó más de una mutación en el gen PTEN. En las tablas 23 y 24 se muestra la relación de polimorfismos y mutaciones encontradas en este gen.

Tabla 23, Polimorfismos encontrados en el gen PTEN.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
9	Int 5	IVS5-12insT	-	-	Descrita	No patogénica
31	5	c.455A>G	p.L152L	Fosfatasa	No descrita	Desconocida

Como se muestra en la tabla 23, hemos encontrado un polimorfismo en el intrón 5 descrito con anterioridad<sup>220</sup>; y una variante silenciosa localizada en la región codificante, que describimos por primera vez en este trabajo. En este último caso, dado que no se traduce en una modificación de la proteína, realizamos estudios *in silico* con el fin de determinar si la mutación altera secuencias de procesamiento de mRNA o sitios de unión de miRNA. Los resultados de estos estudios descartaron que dicho cambio produjera alteraciones en esos procesos (datos no mostrados). Aún así, son necesarios estudios poblacionales y funcionales para corroborar un posible efecto patogénico.

Tabla 24, Mutaciones encontradas en el gen PTEN, (H) muestra las alteraciones encontradas en homocigosis.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
3, 27	5	c.405_406insA	p.C136fsX1	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
3	8	c.956_959delCTTT	p.T319fsX24	C2	Descrita	Patogénica
4	7	c.641_662del	p.Q214_K221del	C2	No descrita	Desconocida
5	5	c.283C>A	p.P95T	Fosfatasa	No descrita	Desconocida
5	5	c.328C>T	p.Q110X	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
5	5	c.376G>A	p.A126T	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
6	6	c.515_517delGC	p.R172fsX5	C2	No descrita	Patogénica
7	5	c.388_389delinsT	p.R130fsX16	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
8, 22	5	c.389G>C	p.R130P	Fosfatasa	Descrita	Patogénica

11, 13	7	c.757_759delAT	p.I253fsX2	C2	Descrita	Patogénica
11	8	c.959T>C	p.L320S	C2	No descrita	Desconocida
13	5	c.395G>A	p.G132D	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
14, 19, 24, 38	5	c.388C>G	p.R130G	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
15, 23	5	c.395G>C	p.G132A	Fosfatasa	No descrita	Desconocida
18	7	c.743C>G	p.P248R	C2	No descrita	Desconocida
18	7	c.752G>T	p.G251V	C2	Descrita	Patogénica
23	6	c.493G>A	p.G165R	C2	Descrita	Patogénica
28	6	c.513G>C (H)	p.Q171H	C2	Descrita	Patogénica
32	8	c.900_902insTC	p.D300fsX6	C2	No descrita	Patogénica
36	7	c.697C>T (H)	p.R233X	C2	Descrita	Patogénica
37	6	c.530_536delATTAT	p.Y176fsX2	C2	Descrita	Patogénica
39	7	c.742_743insA	p.P248fsX5	C2	Descrita	Patogénica
40	7	c.766G>T	p.E256X	C2	Descrita	Patogénica

El estudio del gen PTEN en sangre periférica de los pacientes 4, 22, 24 y 38 (los únicos de los que dispusimos de este material) mostró que le gen PTEN se encontraba germinal, lo que nos permitió confirmar la naturaleza somática de las mutaciones que presentan los tumores.

Las mutaciones descritas por primera vez en este trabajo (casos 4, 5, 6, 11, 13, 15, 23, 18 y 32 (tabla 24)), corresponden a cambios de tipo “missense”, “nonsense”, deleciones e inserciones con cambio de fase de lectura, y deleciones en fase de lectura de traducción. En el caso de las deleciones e inserciones con cambio de fase de lectura, consideramos que las mutaciones eran patogénicas por generar proteínas truncadas.

Por otro lado, las mutaciones del gen PTEN de tipo “missense” encontradas por primera vez en este trabajo (p.P95T, p.G132A, p.P248R y p.L320S), fueron estudiadas mediante simulación *in silico* con ayuda de programas bioinformáticos de predicción de cambios aminoacídicos.

Como se observa en la tabla 25, nuestro análisis predice que la variante L320S se comporta como patogénica, mientras que los demás cambios muestran discrepancias en los resultados. Los cálculos efectuados para las variantes P95T y G132A predicen un comportamiento patogénico en cuatro de las cinco simulaciones. La variante P248R, es considerada como una variante patogénica por dos de los programas usados, mientras que en los tres programas restantes dicho cambio es considerado neutral.

**Tabla 25, Comportamiento teórico de las mutaciones de cambio de aminoácido en el gen PTEN, no descritas anteriormente. Los valores aparecen en PSIC (PolyPhen), SMV (SNPs3D), NN (PMut) y SubPSEC (Panther). P=patogénico, N=neutro.**

Mutación	PolyPhen	Valor	SNPs3D	Valor	PMut	Valor	SIFT	Valor	Panther	Valor
P95T	P	2,131	N	0,22	P	0,56	P	0,01	P	-3,4
G132A	P	2,171	P	-1,39	N	0,30	P	0,01	P	-4,5
P248R	P	2,169	N	0,41	P	0,92	N	0,07	N	-2,5
L320S	P	1,885	P	-1,09	P	0,70	P	0,01	P	-3,4

Este análisis fue completado con un estudio *in silico* para determinar el nivel de conservación evolutiva del aminoácido mutado mediante el programa PolyPhen. Como se observa en la figura 28, las mutaciones P95T, G132A, P248R y L320S se localizan en regiones altamente conservadas a lo largo de la evolución, siendo mayor la preservación de los aminoácidos P95, G132 y L320, que P248.

A)

P95T

QUERY:	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
phosphatase and tensin homolog (mutated in multip...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to MMAC1 [Pan troglodytes]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PTEN [Takifugu rubripes]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
phosphatase and tensin homolog (mutated in m...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to MMAC1 [Gallus gallus]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
phosphatase and tensin-like protein B long splice...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
unnamed protein product [Mus musculus]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
Chain A, Crystal Structure Of The Plen Tumor Suppressor	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin-li...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin ho...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
Plan CG5671-PB, isoform B [Drosophila melanogas...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
GA19047-PA [Drosophila pseudoobscura] hg154...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to protein tyrosine phosph...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
ENSANGP00000025971 [Anopheles gambiae str. PEST...	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PTEN transcript variant 3 [Aedes aegypti]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA
PTEN transcript variant 1 [Aedes aegypti]	...LCAERHYDTARFNCRVAQYFFEDHN	P	QLELRKFFCEDLDQWLSEDDNHVA

B)

G132A

QUERY:	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
phosphatase and tensin homolog (mutated in multip...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to MMAC1 [Pan troglodytes]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PTEN [Takifugu rubripes]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
phosphatase and tensin homolog (mutated in m...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to MMAC1 [Gallus gallus]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
phosphatase and tensin-like protein B long splice...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
unnamed protein product [Mus musculus]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
Chain A, Crystal Structure Of The Plen Tumor Suppressor	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin-li...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin ho...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
Plan CG5671-PB, isoform B [Drosophila melanogas...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
GA19047-PA [Drosophila pseudoobscura] hg154...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to protein tyrosine phosph...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
ENSANGP00000025971 [Anopheles gambiae str. PEST...	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PTEN transcript variant 3 [Aedes aegypti]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE
PTEN transcript variant 1 [Aedes aegypti]	...DLDQWLSSEDDNHVAATHCRAGGRGT	G	HCICAYLLHGRGFLRQAEALDFYGE

C)

P248R

QUERY:	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
phosphatase and tensin homolog (mutated in multip...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to MMAC1 [Pan troglodytes]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PTEN [Takifugu rubripes]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
phosphatase and tensin homolog (mutated in m...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to MMAC1 [Gallus gallus]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
phosphatase and tensin-like protein B long splice...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
unnamed protein product [Mus musculus]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
Chain A, Crystal Structure Of The Plen Tumor Suppressor	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin-li...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin ho...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
Plan CG5671-PB, isoform B [Drosophila melanogas...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
GA19047-PA [Drosophila pseudoobscura] hg154...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to protein tyrosine phosph...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
ENSANGP00000025971 [Anopheles gambiae str. PEST...	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PTEN transcript variant 3 [Aedes aegypti]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF
PTEN transcript variant 1 [Aedes aegypti]	...RIYSSNSPTREDFHYFFEPQPI	P	CGDLEVEFFHQNNMLKDDNHMF

D)

L320S

QUERY:	...LCDQEIISICSTERADNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
phosphatase and tensin homolog (mutated in multip...	...LCDQEIISICSTERADNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to MMAC1 [Pan troglodytes]	...LCDQEIISICSTERADNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PTEN [Takifugu rubripes]	...VNNADQQQVSECEGSEDFYLLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...VNNADQQQVSECEGSEDFYLLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
phosphatase and tensin homolog (mutated in m...	...LV-RDLGIGTLERGENDRDLILT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to phosphatase and tensin...	...VNNADQQQVSECEGSEDFYLLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to MMAC1 [Gallus gallus]	...LADQELDGFSTERSDNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...VNNADQQQVSECEGSEDFYLLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
phosphatase and tensin-like protein B long splice...	...LV-RDLGIGTLERGENDRDLILT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-...	...LVEQELDGIYSTERSDNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
unnamed protein product [Mus musculus]	...LCDQEIISICSTERADNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
Chain A, Crystal Structure Of The Plen Tumor Suppressor	...VNNADQQQVSECEGSEDFYLLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...LADQELDGFSTERSDNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to PTEN [Strongylocentrot...	...SSDNS--SHGSEDDNDEADCTVLL	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL
PREDICTED: similar to protein tyrosine phosph...	...SSSPTSTVSCPSPDNDREYLVLT	L	TNDLDRANDEANFYSPNFVVEL

Figura 28, Alineamiento de secuencias de la proteína PTEN en diferentes especies empleando el programa PolyPhen para los aminoácidos A) P95, B) G132, C) P248 y D) L320.

La mutación p.Q214\_K221del localizada en el exón 6 del gen PTEN, y que aparece en el caso 4, descrita por primera vez en este trabajo, produce la delección en fase de lectura de 7 aminoácidos en el

dominio C2 de la proteína. Esta mutación fue estudiada mediante el programa de predicción de estructuras secundarias de proteínas PSIPRED para determinar los posibles efectos sobre la estructura y plegamiento (figura 29).

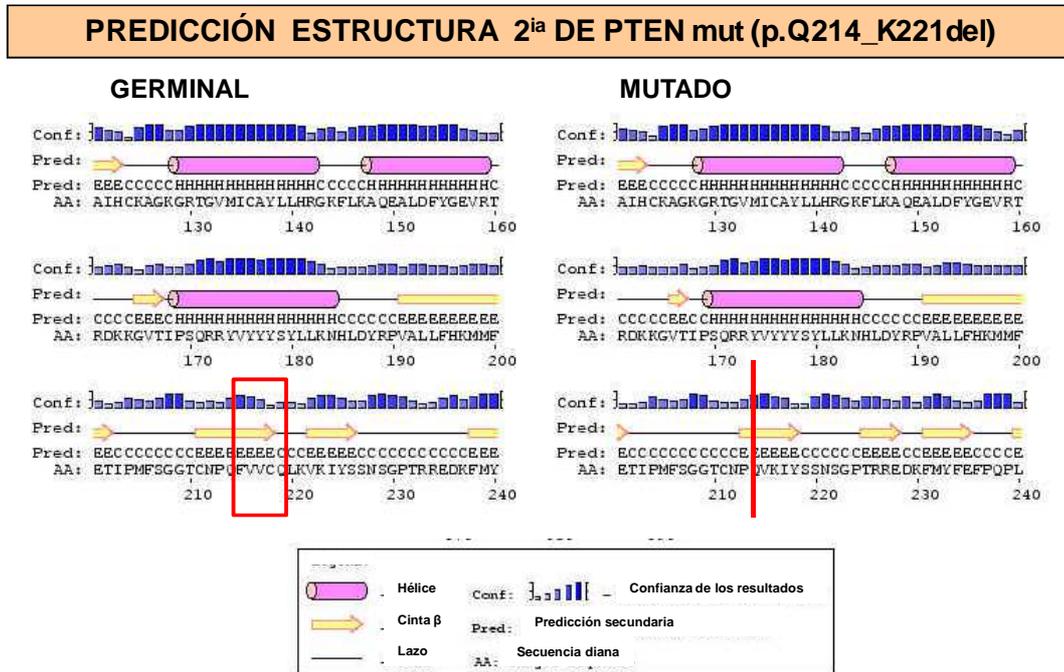


Figura 29, Estructura secundaria de las proteínas PTEN germinal y PTEN mutada (p.Q214\_K221del) desde el aminoácido 120 al 240, generadas por el programa PSIPRED donde se señalan las zonas delecionadas (caja y línea roja).

La proteína generada por la deleción genómica Q214\_K221del pierde un fragmento de una cinta β (figura 29) de una región que contiene hasta 6 cintas β, que forman una estructura de mayor complejidad en forma de lámina β<sup>34</sup>.

El estudio *in silico* de la conservación evolutiva de la región delecionada realizado mediante el programa PolyPhen determinó que los aminoácidos que forman dicha región en el dominio C2, mantienen un alto grado de de conservación a lo largo de la evolución, siendo el aminoácido C218 el que menor grado de preservación muestra (figura 30).

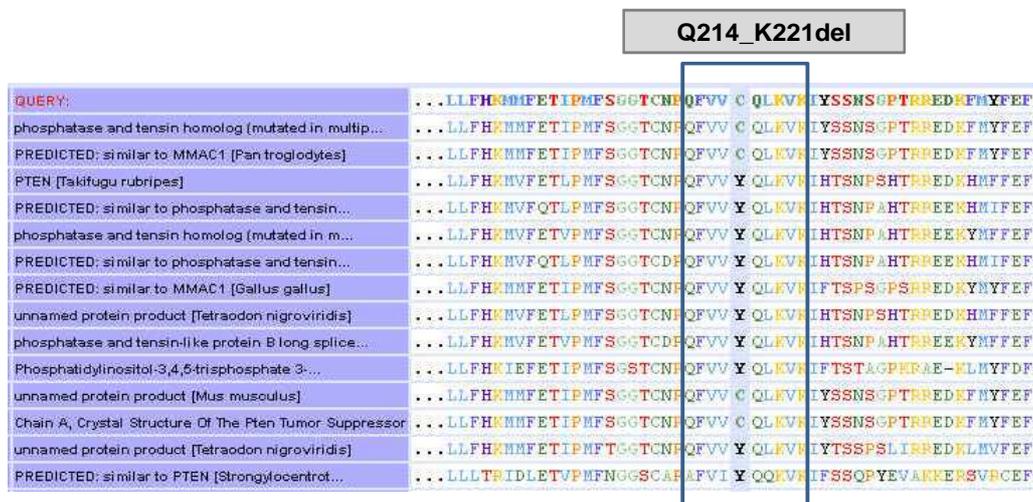


Figura 30, Alineamiento de secuencias de la proteína PTEN en diferentes especies empleando el programa PolyPhen para la conservación de la región Q214\_K221 señalada con una caja azul.

### 1.1.2. ESTUDIO DE PERTENENCIA ALÉLICA DE MUTACIONES EN EL GEN PTEN EN CASOS CON MÚLTIPLES MUTACIONES

El estudio de pertenencia alélica de mutaciones en el gen PTEN, se realizó en los casos 5 y 18, en los que se encontraron varias mutaciones en los exones 5 y 7 respectivamente. Para ello procedimos a clonar estos exones del gen PTEN en el vector pGEM®-T easy (Promega) y a su posterior secuenciación. Como se observa en la tabla 26, en los casos 5 y 18 se observaron dos mutaciones en el mismo alelo.

En los casos 3, 11, 13 y 23, que también mostraban más de una mutación en el gen PTEN, pero localizadas en diferentes exones, no se pudo realizar el estudio dado que la presencia del pseudogen NR\_023917 interfiere en el estudio del RNA al presentar una homología del 98% en el transcrito del gen PTEN<sup>221</sup>.

Tabla 26, Pertenencia alélica de las mutaciones encontradas en el gen PTEN en los casos 5 y 18.

Caso	Alelo	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
5	1	c.283A	p.95T	Fosfatasa	No descrita	Desconocida
		c.328T	p.110X		Descrita	Patogénica
	2	c.376A	p.126T	Fosfatasa	Descrita	Patogénica
18	1	c.743G	p.248R	C2	No descrita	Desconocida
		c.752T	p.251V		Descrita	Patogénica
	2	Germinal	Germinal	-	-	Normal

### 1.1.3. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) DEL GEN PTEN EN CASOS CON MUTACIONES HOMOCIGOTAS

Las muestras tumorales 28 y 36 mostraron mutaciones homocigotas en el gen PTEN. Esta homocigosis puede ser consecuencia de la pérdida de uno de los alelos del gen en las células tumorales<sup>19</sup>, por lo que se procedió a estudiar un polimorfismo intrónico del gen PTEN (IVS4+109ins5). Como se observa en la figura 31, ambos tumores eran heterocigotos para este polimorfismo en el tumor, lo que confirma la presencia de dos alelos del gen y la naturaleza homocigota de las mutaciones.

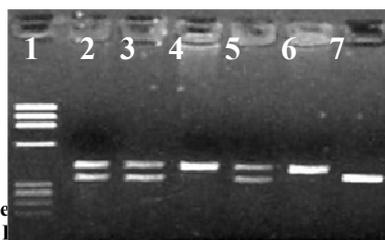


Figura 31, Resultado de la electroforesis de restricción de ADN con la enzima de restricción AflIII del fragmento de PCR que contiene el polimorfismo IVS4+109ins5. En el pocillo 1 se muestra el marcador de peso molecular; los pocillos 2 y 3 corresponden a las muestras 28 y 36 donde se aprecia su homocigosis; los pocillos 4, 5, 6 y 7 son controles en los que se observan las combinaciones posibles de alelos siendo 4 y 6 homocigotos sin inserción, 5 heterocigoto y 7 homocigoto con inserción.

### 1.1.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTEN

El análisis de expresión de la proteína PTEN mediante Western blot se realizó en 38 muestras de tejido tumoral de pacientes de carcinoma endometrial y en los extractos proteicos de 4 líneas celulares de carcinoma endometrial.

El estudio de las líneas celulares de carcinoma endometrial mostró una expresión homogénea de proteína PTEN en las líneas celulares HEC1B, KLE y SKUT1, observando una falta de expresión en la

línea AN3CA, que es portadora de la mutación c.389\_390delG, p.R130fsX3 en homocigosis<sup>222</sup> (figura 32).

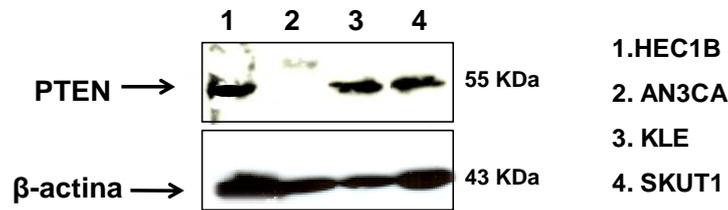


Figura 32, Western blot con inmunodetección de la proteína PTEN en cuatro líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, AN3CA, KLE, SKUT1). La detección de proteína β-actina corresponde al control de carga.

El análisis de expresión de la proteína PTEN en 38 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 33, tabla 27).

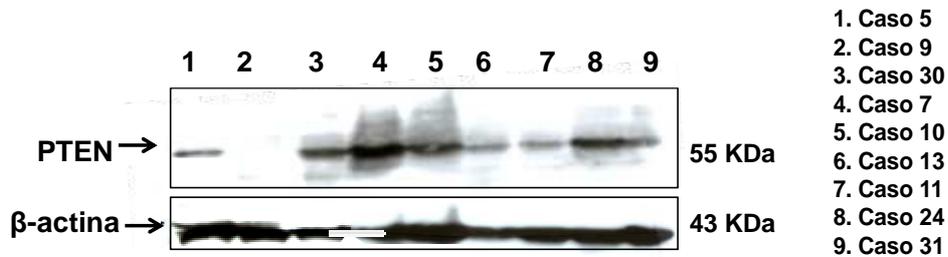


Figura 33, Western blot con inmunodetección de la proteína PTEN en nueve muestras de carcinoma endometrial. La detección de proteína β-actina corresponde al control de carga.

Cabe destacar que los casos 25 y 42, que no son portadores de mutaciones en el gen, presentaban una disminución de expresión de proteína PTEN, sugiriendo que debe de existir otro mecanismo de inactivación monoalélica, como pérdida de heterocigidad o inhibición de la expresión por hipermetilación del promotor del gen (tabla 27).

Tabla 27, Resultados del análisis de expresión de la proteína PTEN en los extractos proteicos tumorales de carcinoma endometrial. (H) muestra las alteraciones homocigotas.

Caso	Expresión normal	Expresión disminuida	Falta de expresión	Alteración en PTEN
1	+			Geminal
2	+			Geminal
5		+		p.P95T, p.Q110X, p.A126T
6		+		p.R172fsX5

8	+			p.R130P
9			+	IVS5-12insT
10	+			Germinal
11		+		p.I253fsX2, p.L320S
12	+			Germinal
13		+		p.G132D, p.I253fsX2
15	+			p.G132A
16	+			Germinal
17	+			Germinal
18	+			p.P248R, p.G251V
19	+			p.R130G
20	+			Germinal
21	+			Germinal
22	+			p.R130P
23	+			p.G132A, p.G165R
24	+			p.R130G
25		+		Germinal
26	+			Germinal
27		+		p.C136fsX42
28	+			p.Q171H (H)
29	+			Germinal
30	+			Germinal
31	+			p.L152L
32		+		p.D300fsX6
33	+			Germinal
34	+			Germinal
35	+			Germinal
36			+	p.R233X (H)
37		+		p.Y176fsX2
38	+			p.R130G
39		+		p.P248fsX4
40		+		p.E256X
41	+			Germinal
42		+		Germinal

Los tumores 9 y 36 mostraron una ausencia total de proteína (figura 33, tabla 27). En el caso del tumor 9, se encontró un polimorfismo del gen PTEN en heterocigosis en el intrón 5 (IVS5-12insT), por lo que se puede descartar una pérdida alélica, (tabla 24), siendo la causa más probable de la pérdida de expresión, la hipermetilación del promotor del gen PTEN de ambos alelos. En la muestra 36, la falta de expresión puede ser explicada como consecuencia de la aparición de una mutación de parada de la traducción en homocigosis (c.697C>T, p.R233X).

## 1.2. TP53

El estudio del gen de p53 comprendió el análisis mutacional de los exones de 4 a 10 y las regiones intrónicas flanqueantes en 42 muestras de DNA procedente de tejido tumoral. Asimismo, se procedió al estudio de pérdida de heterociguidad en las muestras en que se encontraron variantes en homocigosis.

### 1.2.1. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN TP53

El análisis del gen TP53 en 42 casos de cáncer de endometrio mostró 9 mutaciones, de las cuales 7 corresponden a cambios de tipo “missense” y dos a inserciones con cambio de fase de lectura y aparición de un codón de parada prematuro; además, fueron identificados seis polimorfismos (tablas 28 y 29). Todos estos cambios correspondieron a variantes descritas con anterioridad.

Tabla 28, Polimorfismos encontrados en el gen TP53, (H) muestra las mutaciones encontradas en homocigosis.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Función
4, 5, 21(H)	6	c.639A>T	p.R213R	Unión a DNA	No patogénica
3, 8(H), 13, 20, 24, 29, 31, 35, 36, 37, 40	4	c.215G>C	p.R72P	SH3	No patogénica
8, 13, 16, 20, 23(H), 28(H), 32, 36, 37, 38, 40, 42	Int 3	ins16 bp	-	-	No patogénica
10	6	c.665C>T	p.P222L	Unión a DNA	No patogénica
10	8	c.916C>T	p.R306R	Unión a DNA/ Tetramerización	No patogénica
30, 36	4	c.108G>A	p.P36P	Transactivación	No patogénica

Tabla 29, Mutaciones encontradas en el gen TP53, (H) muestra las mutaciones encontradas en homocigosis.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Función
1	6	c.638G>A	p.R213Q	Unión a DNA	Patogénica
10	4	c.328C>T	p.R110C	Unión a DNA	Patogénica
12	7	c.722C>T (H)	p.S241F (H)	Unión a DNA	Patogénica
17	5	c.527_528insC	p.C176fsX180	Unión a DNA	Patogénica
21	8	c.818G>A (H)	p.R273H (H)	Unión a DNA	Patogénica
27, 30	7	c.744G>A	p.R248Q	Unión a DNA	Patogénica
28	5	c.458_459insG	p.P153fsX179	Unión a DNA	Patogénica
28	8	c.832C>T	p.P278S	Unión a DNA	Patogénica
33	8	c.821T>C	p.V274A	Unión a DNA	Patogénica

En los casos 1, 4 y 17, en los que dispusimos de sangre periférica, comprobamos la naturaleza somática de las alteraciones encontradas. En los casos 16, 24, 38 y 42 se encontraron los polimorfismos del codón 72 y del intrón 3 de TP53 en heterocigosis, tanto en tumor como en sangre periférica.

Tres de los polimorfismos encontrados, eran cambios silenciosos sin efecto en la traducción (c.108G>A, c.639A>T y c.916C>T). La mutación c.665C>T se describe como una variante sin función patogénica ya que no modifica la actividad de la proteína, y los cambios c.215G>C y la inserción de 16 bp 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 aumentan la susceptibilidad de desarrollo del cáncer respectivamente<sup>223</sup> (tabla 28).

Los tipos tumorales que mostraban alteraciones en el gen TP53 correspondían a tumores de tipo no endometriode (3 mutaciones en 6 tumores), tumores mixtos o sarcoma (4 mutaciones de 8 tumores) y, en sólo dos casos a tumores de tipo endometriode.

En estos resultados cabe destacar la presencia de dos mutaciones patogénicas en el gen TP53 en el caso 28 (tabla 29), presumiblemente localizadas en dos alelos distintos. Este caso resulta poco frecuente ya que las proteínas mutantes de p53 actúan como dominantes negativas, secuestrando la proteína generada a partir del alelo germinal e imposibilitando su función<sup>136,150</sup>.

### 1.2.2. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE HETOCIGOSIDAD (LOH) DEL GEN TP53

Las muestras tumorales 12 y 21, que mostraron mutaciones homocigotas en el gen TP53, no presentaban ninguno de los polimorfismos frecuentes del gen en heterocigosis en el tumor o en sangre periférica, por lo que no podemos descartar una pérdida de heterocigosis del locus de TP53<sup>19</sup>. Por ello, el estudio de pérdida de heterocigosis fue realizado mediante PCR a tiempo real cuantitativa comparativa, utilizando la amplificación del exón 7 del gen TP53 y una amplificación control localizada en el cromosoma 12. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 34, donde se observa la gráfica de cuantificación relativa (RQ) frente a las muestras analizadas. Como se muestra en esta figura, los DNA tumorales de los casos 12 y 21 no presentaron pérdidas, confirmando la presencia de los dos alelos en las muestras de estudio y determinando que las de mutaciones encontradas afectan a ambos alelos.

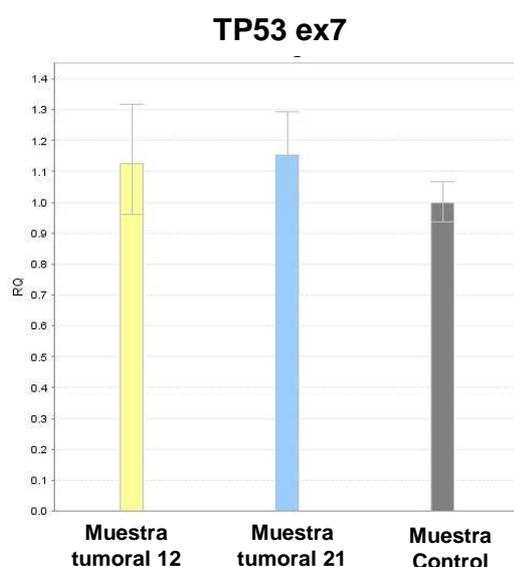


Figura 34, Gráfica donde se muestra en el eje de abscisas las muestras analizadas mediante PCR cuantitativa relativa y en el eje de ordenadas la cuantificación relativa (RQ) del exón 7 del gen TP53 comparando con una amplificación control del cromosoma 12. También se muestran las barras de desviación estándar.

### 1.3. CDH1

El análisis mutacional del gen CDH1, que codifica la proteína E-Cadherina, comprendió el estudio de los 16 exones de su secuencia y los extremos intrónicos flanqueantes, y fue realizado en 42 muestras de DNA tumoral de carcinoma endometrial.

Este estudio reveló la presencia de cuatro variantes en tres de los tumores analizados. De estas alteraciones, dos de ellas (casos 19 y 23) corresponden a polimorfismos silenciosos sin repercusión sobre la traducción (tabla 30). Las dos mutaciones restantes correspondían a alteraciones que afectan a la secuencia del precursor proteico de E-Cadherina, y se describen por primera vez en este trabajo (tabla 31).

Tabla 30, Polimorfismos encontrados en el gen CDH1.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
19	7	c.933C>G	p.L311L	Extracelular	Descrita	No patogénica
23	12	c.1896C>T	p.H632H	Extracelular	Descrita	No patogénica

Tabla 31, Mutaciones encontradas en el gen CDH1.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
19	3	c.253G>A	p.V85I	Precursor	No descrita	Desconocida
30	3	c.269G>A	p.R90Q	Precursor	No descrita	Desconocida

Las mutaciones descritas por primera vez en este trabajo se encontraron en un tumor de tipo endometriode de grado bajo (caso 19) y un carcinoma seroso (caso 30). El estudio mediante simulación *in silico* con ayuda de los programas bioinformáticos de predicción de cambios aminoacídicos mostró que las variantes V85I y R90Q no alteran la función de la proteína E-Cadherina (tabla 32). No obstante, en dos de los programas no se pudo realizar el cálculo por ser escaso el alineamiento con proteínas homólogas.

Tabla 32, Comportamiento teórico de las mutaciones de cambio de sentido del aminoácido en el gen CDH1, no descritas anteriormente. Los valores aparecen en PSIC (PolyPhen) y NN (PMut). P=patogénico, N=neutro.

Mutación	PolyPhen	Valor	SNPs3D	PMut	Valor	SIFT	Valor	Panther
V85I	N	0,261	No alineamiento	N	0,05	N	0,24	No alineamiento
R90Q	N	0,485	No alineamiento	P	0,58	N	0,21	No alineamiento

Este análisis fue completado con el estudio *in silico* del nivel de conservación evolutiva de los aminoácidos mutados en las diferentes especies mediante el programa PolyPhen. Como se observa en la figura 35, estos codones no son estables e incluso en alguna de las especies aparecen los aminoácidos mutados, lo que refuerza la hipótesis de que estas mutaciones no son relevantes.

A)

V85I

```

QUERY: ... CTGRQRTAIFSLDTTFKAVCTDGVITVRRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYANF
uvomeronin ... CTGRQRTAIF--LTFIPKVVCTDGVITVRRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYANF
E-cadherin ... CTGRPRTAIFYSDDSRFQVCTDGVITVRRPLQLHPPESTFHVHAWDSSYHRL
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)... ... CAGLPRPTVYVSDDTTFKAVCTDGVITVRRPVLHHPPELSFLVHAWDSTHRL
PREDICTED: similar to Epithelial-cadherin precu... ... CTGLPRTAIFYSDDTTFKAVCTDGVITVRRPLQLHPPEISFLVHAWDSSYHRL
cadherin 1 [Rattus norvegicus] >gi|13431333|spl... ... CTGRPRTAIFYSDDSRFQVCTDGVITVRRHLRHELETSFLVHAWDSSYHRL
cadherin 1 [Mus musculus] >gi|818011|emb|CAA432... ... CTGRPRTAIFYSDDSRFQVATDGTITVRRHLRHELETSFLVHAWDSSYHRL
PREDICTED: similar to uvomeronin [Monodelphi... ... CSGRKLNIFYSEDSRFVTPGDFVIRRRPLQLHNLETSFTIQSDVATGKRF
hypothetical protein LOC415950 [Gallus gallu... ... CSGRPMVAVYVPTDTFQVNDGQVSTRRPLTLYGRHSFTIYAQDARGRKH
cadherin - African clawed frog >gi|468817|emb|CAA552... ... CTRRPHGLYDVGDSRFVLPDGTIVRRHVHLHSEDTFTFTSTWDARGIEH
EP-cadherin [Xenopus laevis] ... CTRRKHGLYDVGDSRFVLPDGTIVRRHVHLHR-DTRFTSTWDARGIEH
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial), [sof... ... CTGRQRTAIFYSLDTTFKAVCTDGVITVRRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYANF
Epithelial-cadherin precursor (E-cadherin)... ... CEGPVVITQFASSDPNFELHEDGTVVIRNPARHEDNPRHFWLAVETWGHVY
cadherin 3, type 1, P-cadherin (lacental), [sofo... ... CDG-OEPALEFSTDDNFTVNGETVRRASLKEKNP-----
cadherin 1, epithelial [Danio rerio] >gi|140106... ... CDGRITLTFQSIDHFEINTDGTIVRRQVTLHEGHVFSVHAWDSSYHRL
PREDICTED: cadherin 2, type 1 [Pan troglodytes] ... CNGRRKVVQYESSSEADFVDEDEGHVYARRSFFLSSEHANFLIYAQDMTQEKU
PREDICTED: similar to cadherin 2, type 1 pre... ... CNGRRKVVQYESSSEADFVDEDEGHVYARRSFFLAMEHANFLIYAQDMETQKH
Neural-cadherin 2 precursor (N-cadherin 2)... ... CGADRRHYETSNTDFRIDGDIIVASFTFDISPEQAEFLVYAQDEDTHEL
cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal) [Ga... ... CAGNNOVAYEITNSLDFVRLDGTIVYRQVQASRQLLLHVYAWDPTQLGR
PREDICTED: similar to cadherin 2, type 1 prepro... ... CNGRRKVVQYESSSEADFVDEDEGHVYARRSFFLSSEHANFLIYAQDMTQEKU
PREDICTED: similar to Cadherin-2 precursor [L... ... CNGRRKVVQYESSSEADFVDEDEGHVYARRSFFLSSEHANFLIYAQDMTQEKU
    
```

B)

R90Q

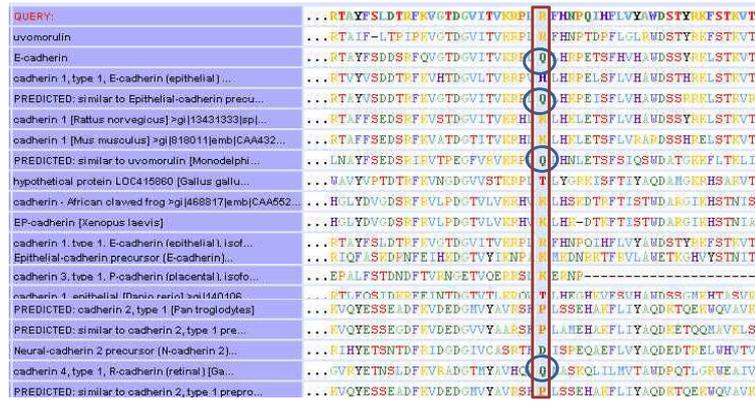


Figura 35, Alineamiento de secuencias de la proteína E-Cadherina en diferentes especies empleando el programa PolyPhen de los aminoácidos A) V85I y B) R90Q. El círculo azul señala la variante encontrada.

### 1.4. CDKN2A

Hemos estudiado los dos exones del gen CDKN2A y los extremos intrónicos flanqueantes. Este análisis se llevó a cabo en las 42 muestras de DNA tumoral de carcinoma endometrial. Los resultados muestran la presencia de un polimorfismo descrito previamente en el exón 2, que fue identificado en dos casos (tabla 33), y una mutación de significado desconocido, descrita con anterioridad por otro grupo<sup>224</sup>, que se encontró en un carcinoma mixto que comparte diferenciación endometrioide y de células claras (tabla 34).

Tabla 33, Polimorfismo encontrado en el gen CDKN2A.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
1, 5	2	c.445G>A	p.A148T	Descrita	No patogénica

Tabla 34, Mutaciones encontradas en el gen CDKN2A.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
10	2	c.217G>A	p.A73T	Descrita	Desconocida

En el caso de la mutación de significado desconocido, se procedió a completar su estudio mediante simulación *in silico* con ayuda de los programas bioinformáticos de predicción de cambios aminoacídicos. Los resultados de este estudio mostraron discrepancia sobre la posible patogenicidad de la variante A73T. Únicamente el programa bioinformático SNPs3D predijo un efecto patogénico para la mutación (tabla 35).

Tabla 35, Comportamiento teórico de la mutación de cambio de aminoácido en el gen CDKN2A, no descrita anteriormente. Los valores aparecen en PSIC (PolyPhen) y NN (PMut). P=patogénico, N=neutro.

Mutación	PolyPhen	Valor	SNPs3D	Valor	PMut	Valor	SIFT	Valor	Panther	Valor
A73T	N	0,205	P	-0,37	N	0,03	N	0,07	N	-2,105

Este análisis fue completado con el estudio *in silico* del nivel de conservación evolutiva del aminoácido mutado en las diferentes especies mediante el programa PolyPhen. Como se observa en la figura 36, la posición 73 de la proteína p16, no está conservada a lo largo de la evolución, estando presente el aminoácido treonina en una especie diferente a la humana.

QUERY:	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
PREDICTED: similar to Cyclin-dependent kinas...	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin dependant kinase inhibitor [Sus. scrofa]	...PIQVMHHC	S	T	V	A	E	L	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
PREDICTED: similar to Chain B, Mechanism Of B1...	...AIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
Chain A, Tumor Suppressor P15(Ink4b) Structure. By Dom...	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B [synthetic o...	...AIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B [Bos ta...	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B [Sus. scrof...	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
p15INK4b cyclin-dependent kinase inhibitor [Meso...	...PIQVMHHC	S	T	V	A	E	L	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	N	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin-dependent kinase inhibitor 2 [Me...	...PIQVMHHC	N	T	Q	V	A	E	L	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	S	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	E	T	L	A	L	H				
Cdkn2b protein [Rattus norvegicus]	...PIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
PREDICTED: cyclin-dependent kinase inhibitor...	...AIQVMHHC	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	E	P	H	A	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform...	...PIQVMHHC	N	V	H	A	E	L	L	L	L	N	Y	G	A	D	S	N	E	L	P	T	T	S	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
cyclin dependent kinase inhibitor 2A [Rattus no...	...PIQVMHHC	N	V	H	A	E	L	L	L	L	S	Y	G	A	D	S	N	E	L	P	T	T	S	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H				
p16/CDKN2A/MTS1 [Felis catus]	...---V	M	H	H	C	S	A	F	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H
PREDICTED: similar to Cyclin-dependent kinase 4...	...---	M	H	C	S	T	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	A	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	V	V	L	H		
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform...	...AIQVMHHC	N	V	L	A	A	I	L	L	L	Q	Y	G	A	E	P	H	A	L	P	T	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	M	L	L	H			
PREDICTED: similar to p15INK4b cyclin-depend...	...PIQVMHHC	N	V	G	V	A	E	L	L	L	H	G	A	D	P	N	E	L	P	T	T	L	T	R	P	V	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	L	L	H					
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A [melanoma, ...	...PIQVMHLC	S	P	F	V	A	E	L	L	L	Q	R	G	A	D	P	N	E	L	P	P	T	G	R	P	A	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	A	A	L	H				
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...ALQVMHHC	S	T	S	V	A	Q	V	L	L	D	H	A	D	P	N	E	L	P	S	T	G	A	R	P	L	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	V	R	L	L	V				
MGC154405 protein [Xenopus laevis]	...PIQVMHHC	S	P	H	A	E	L	L	L	L	D	Y	G	A	D	P	N	E	L	P	S	T	G	C	P	T	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	L	L	V	L					
p13CDKN2X [Xiphophorus helleri]	...AIQVMHHC	S	S	E	V	A	E	L	L	L	T	R	G	A	D	P	N	E	L	P	S	T	G	A	T	P	L	H	D	A	A	R	E	G	F	L	D	T	V	Q	L	L				

Figura 36, Alineamiento de secuencia de la proteína p16 en diferentes especies empleando el programa PolyPhen para el aminoácido A73T. El círculo azul señala el cambio de la variante encontrada.

## 2. ANÁLISIS DE ONCOGENES

### 2.1. PI3K

En este trabajo hemos estudiado los exones 7, 9 y 20 del gen PIK3CA, que codifica la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la proteína PI3K, donde se acumulan las mutaciones patogénicas descritas hasta la fecha y que se relacionan con un aumento de la actividad de la proteína, así como los extremos intrónicos flanqueantes de dichos exones. Además, se realizó el estudio de expresión de esta subunidad en muestras proteicas y en líneas celulares de carcinoma endometrial.

#### 2.1.1. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN PIK3CA

El análisis del gen PIK3CA en 42 muestras de DNA tumoral de carcinoma endometrial mostró 7 mutaciones en 8 de los casos (19%), 7 tumores endometrioides y uno mixto (tabla 36). Cinco de estas alteraciones aparecieron en tumores que también presentaban mutaciones patogénicas en el gen PTEN (tabla 24).

La mayoría de las mutaciones encontradas en este trabajo en el gen PIK3CA corresponden a cambios “missense” que producen un aumento en la actividad de la proteína y que se localizan en la región del dominio quinasa (exón 20). Dos de las alteraciones encontradas (casos 4 y 10) generan proteínas truncadas que, en el primer caso, no produce un cambio en la fase de lectura y, en el segundo caso, codifica un codón de parada prematuro, que genera una proteína truncada que carece de su dominio quinasa. En este caso queda comprometida la actividad enzimática de la proteína.

La disponibilidad de sangre periférica del caso 4 permitió comprobar la naturaleza somática de la mutación.

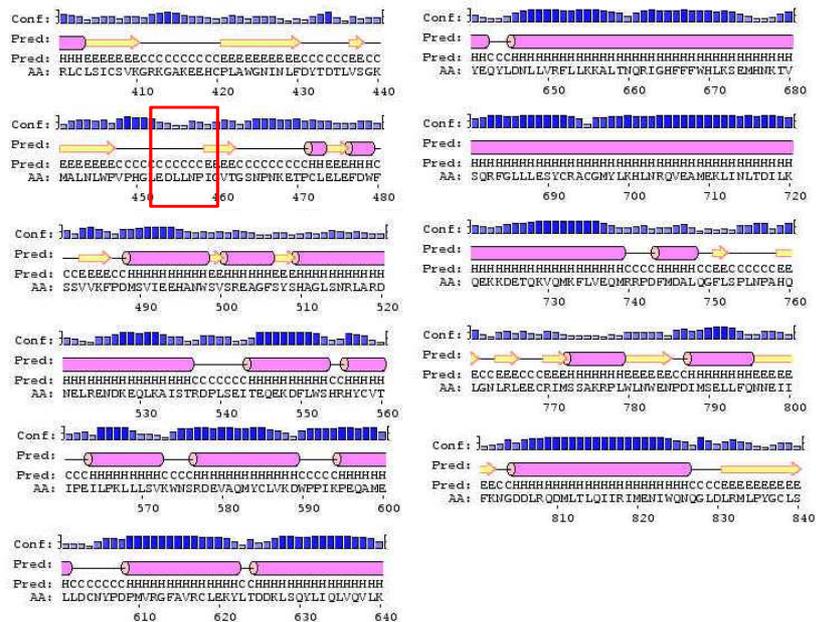
Tabla 36, Mutaciones encontradas en el gen PIK3CA.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Dominio afectado	Descrita en Bibliografía	Función
4	7	c.1353_1379del	p.G451_G460del	C2	No descrita	Desconocida
9	20	c.3061T>C	p.Y1021H	Kinasa	Descrita	Patogénica
10	20	c.2974C>T	p.R992X	Kinasa	No descrita	Desconocida
11	20	c.3127A>G	p.M1043V	Kinasa	Descrita	Patogénica
13	20	c.3132T>G	p.N1044K	Kinasa	Descrita	Patogénica
23, 32	20	c.3140A>G	p.H1047R	Kinasa	Descrita	Patogénica
41	9	c.1635G>T	p.E545D	Hélice	Descrita	Patogénica

La mutación p.G451\_G460del en el exón 7 de PIK3CA identificada en la muestra 4 y descrita por primera vez en este trabajo, produce una delección de 9 aminoácidos en fase de lectura que afecta al dominio C2 de la proteína. Esta mutación fue estudiada mediante el programa de predicción de estructuras secundarias de proteínas PSIPRED para determinar los posibles efectos sobre la estructura y pliegamiento de la proteína (figura 37).

### PREDICCIÓN ESTRUCTURA 2<sup>ia</sup> PIK3CA mut (p.G451\_G460del)

#### GERMINAL





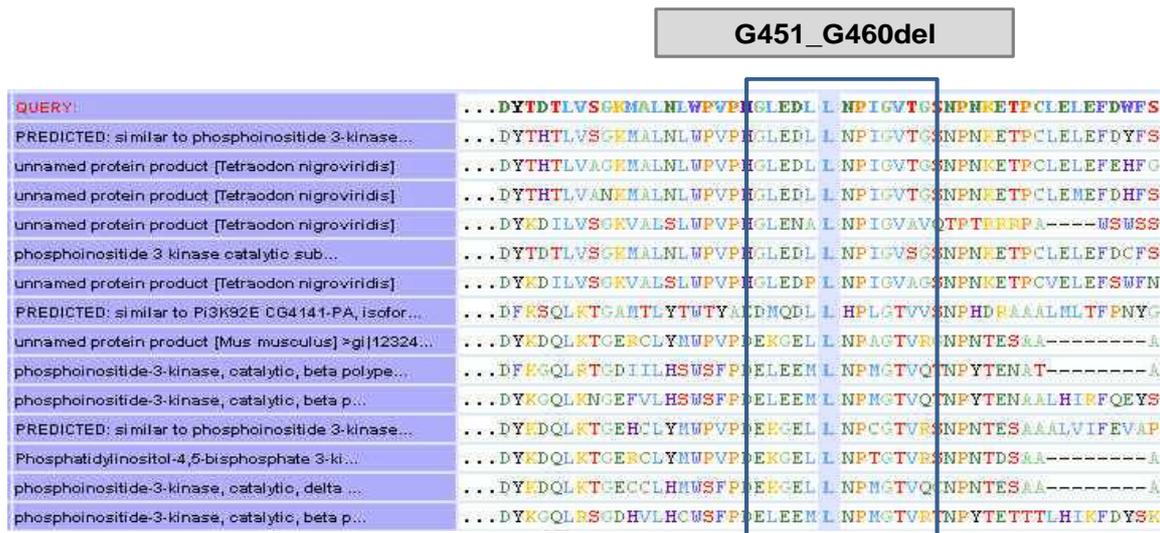


Figura 38, Alineamiento de secuencias de la proteína PIK3CA en diferentes especies empleando el programa PolyPhen para la región G451\_G460 señalada con una caja azul.

## 2.1.2. ANALISIS DE EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD p110 $\alpha$ DE PI3K

El análisis de expresión de la proteína p110 $\alpha$  (subunidad catalítica de PI3K) mediante Western blot se realizó en 38 muestras de tejido tumoral de carcinoma endometrial y en cuatro extractos proteicos procedentes de líneas celulares de carcinoma endometrial.

El análisis de las líneas celulares de carcinoma endometrial mostró una expresión homogénea de proteína p110 $\alpha$  en los cuatro tipos estudiados (figura 39). La línea celular HEC1B presenta una mutación puntual en el gen PIK3CA en el exón 20 (c.3145G>C, p.G1049R) que no afecta a la expresión<sup>228</sup>.

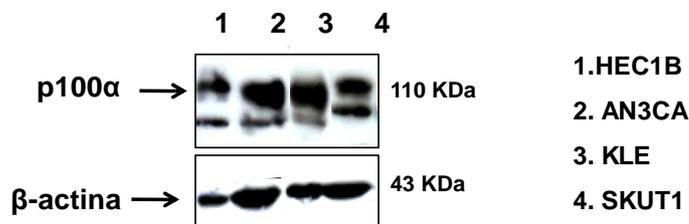


Figura 39, Western blot con inmunodetección de la proteína p110 $\alpha$  en líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, KLE, AN3CA, SKUT1). La detección de proteína  $\beta$ -actina corresponde al control de carga.

El análisis de expresión de la proteína p110 $\alpha$  (PIK3CA) en los extractos proteicos de 38 muestras de carcinoma endometrial, cuantificados y normalizados, puso de manifiesto una inmunodetección homogénea de proteína p110 $\alpha$  en las muestras analizadas independientemente de la presencia de mutaciones en el gen PIK3CA. Sin embargo, el caso 10, tumor con una mutación “nonsense” que produce una proteína truncada en el dominio kinasa de la proteína, muestra falta de expresión a pesar de que dicha mutación afecta a un único alelo (figura 40, tabla 37).



Figura 40, Western blot con la inmunodetección de la proteína p110α en 9 muestras de carcinoma endometrial. La detección de la proteína β-actina corresponde al control de carga.

Tabla 37, Resultados del análisis de expresión de la subunidad p110α de PI3K en tejido tumoral de carcinoma endometrial.

Caso	Expresión Normal	Falta de expresión	Alteración en PIK3CA
1	+		Germinal
2	+		Germinal
5	+		Germinal
6	+		Germinal
8	+		Germinal
9	+		p.Y1021H
10		+	p.R992X
11	+		p.M1043V
12	+		Germinal
13	+		p.N1044K
15	+		Germinal
16	+		Germinal
17	+		Germinal
18	+		Germinal
19	+		Germinal
20	+		Germinal
21	+		Germinal
22	+		Germinal
23	+		p.H1047R
24	+		Germinal
25	+		Germinal
26	+		Germinal
27	+		Germinal
28	+		Germinal
29	+		Germinal
30	+		Germinal
31	+		Germinal
32	+		p.H1047R
33	+		Germinal
34	+		Germinal
35	+		Germinal

36	+		Germinal
37	+		Germinal
38	+		Germinal
39	+		Germinal
40	+		Germinal
41	+		p.E545D
42	+		Germinal

## 2.2. KRAS Y BRAF

En este trabajo hemos estudiado los exones 2 y 3 del gen KRAS y los exones 11 y 15 del gen BRAF en 42 muestras de tejido tumoral de carcinoma endometrial.

El estudio mutacional de los exones 2 y 3 del gen de KRAS en las 42 muestras tumorales de carcinoma endometrial mostró cuatro tumores portadores de mutación en el codón 12, dos en el codón 13 y ninguno en el codón 61 (tabla 38). En los casos 24 y 35, al disponer de muestra procedente de sangre periférica, se pudo comprobar la naturaleza somática de las alteraciones encontradas.

Tabla 38, Mutaciones encontradas en el gen KRAS.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína
16, 29, 39	2	c.35G>T	p.G12V
35	2	c.35G>A	p.G12D
24, 36	2	c.38G>A	p.G13D

Todas las muestras tumorales con alteraciones en el gen KRAS fueron clasificadas como de tipo endometriode, excepto la muestra 24, que corresponde a un tumor mixto con variantes de tipo endometriode y no endometriode.

El estudio mutacional del gen BRAF mostró una única alteración en el intrón 15 no descrita hasta la fecha (tabla 39). Esta mutación fue considerada como no patogénica al no producir ningún cambio en la secuencia proteica y no encontrarse en los extremos flanqueantes próximos al exón. Asimismo, la mutación V600E, que es la que mayor número de veces ha sido encontrada en tumores, no ha aparecido en ninguna de las muestras estudiadas.

Tabla 39, Polimorfismo encontradas en el gen BRAF.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
15	Int 15	c.1860+17delT	-	No descrita	No patogénica

## 2.3. CTNNB1

El análisis del exón 3 del gen CTNNB1, que codifica la proteína  $\beta$ -catenina, se realizó en las 42 muestras tumorales de carcinoma endometrial. Nuestro estudio mostró 5 mutaciones puntuales de tipo “missense” en 8 casos (19%), todas ellas descritas con anterioridad en trabajos previos<sup>120</sup> (tabla 40). Estos cambios han sido considerados patogénicos porque modifican los residuos de serina 33, 37 y treonina 41 del dominio regulador o los residuos adyacentes como son los aminoácidos de las posiciones 32 y 34<sup>15</sup>, todos ellos sitios consenso para el marcaje que realiza GSK-3 $\beta$  para la degradación de la proteína<sup>116</sup>. En el

caso 42, al disponer de muestra procedente de sangre periférica, se pudo comprobar la naturaleza somática de la alteración encontrada.

Tabla 40, Mutaciones encontradas en el exón 3 del gen CTNNB1.

Caso	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía
5	c.94G>A	p.D32N	Descrita
11, 32	c.111C>T	p.S37F	Descrita
13, 25	c.122A>G	p.T41A	Descrita
23, 36	c.101G>A	p.G34R	Descrita
42	c.98C>G	p.S33C	Descrita

Las mutaciones encontradas en este trabajo en el dominio regulador del gen CTNNB1 corresponden en su mayoría a tumores de tipo endometriode (7 casos), excepto una que se encontró en un tumor carcinosarcoma.

## ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN REPARADORA DEL DNA EN CARCINOMA ENDOMETRIAL

### 1. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

El análisis de las secuencias microsatélites BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250, BAT40, PAX6 y MYCL1 se realizó en 11 casos de carcinoma endometrial en los que se pudo obtener tanto tejido tumoral como sangre periférica. Este estudio mostró inestabilidad en 7 de los casos analizados (63,6%) que presentaron entre 3 y 4 marcadores alterados (tabla 41).

Cuatro de las muestras inestables correspondían a tumores de tipo histológico endometriode, mientras que el resto corresponde a tumores de naturaleza mixta y serosa. En cuatro de los casos que mostraron inestabilidad, se identificaron alteraciones en el gen PTEN, llamando la atención que, en 3 de ellas, se observó el cambio del aminoácido R130 localizado en el dominio fosfatasa de la proteína. Asimismo, dos muestras (casos 1 y 4, tabla 41) presentaron mutaciones patogénicas en el gen TP53, mientras que la muestra 26, no ha mostrado ningún tipo de alteración en los genes estudiados en este trabajo.

Tabla 41, Resultados de MSI en carcinoma endometrial. (I)=marcador inestable. (E)=marcador estable.

Caso	BAT25	BAT26	D2S123	D5S346	D17S250	BAT40	PAX6	MYCL1	Total marcadores inestables
1	I	E	E	I	E	I	E	E	3
2	E	E	E	E	E	E	E	E	0
4	E	E	I	I	I	E	E	I	4
16	E	E	E	E	E	E	E	E	0
17	E	E	I	E	E	E	E	I	3
18	E	E	E	E	E	E	E	E	0
22	I	I	E	E	I	E	I	E	4
24	I	E	I	I	E	E	E	E	3
26	E	E	E	I	I	E	E	I	3
38	E	E	E	E	I	I	I	E	3
42	E	E	E	E	E	E	E	E	0

## 2. ANÁLISIS DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA MAQUINARIA DE MMR

El estudio de los patrones de hipermetilación de los promotores de los genes relacionados con la maquinaria de MMR, hMLH1, hMSH2 y hMSH6, se realizó en 42 casos de carcinoma endometrial mediante MS-MLPA. Este estudio se completó con el análisis mutacional de las regiones codificantes de los genes, hMLH1 y hMSH2 y con el estudio de grandes deleciones mediante MLPA, y posteriormente, PCR a tiempo real cuantitativa comparativa para la confirmación de los resultados obtenidos.

### 2.1. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES hMLH1, hMSH2 y hMSH6

El estudio del estado de la metilación de la región promotora de los genes relacionados con la maquinaria de MMR (hMLH1, hMSH2 y hMSH6) mostró unos resultados que se exponen en la tabla 42. **Tabla 42, Resultados de MS-MLPA de carcinoma endometrial. (-)= no metilación. (+)=hipermetilación moderada. (++)=hipermetilación alta.**

Caso	hMLH1		hMSH2		hMSH6	
	Mediana	Estado metilación	Mediana	Estado metilación	Mediana	Estado metilación
1	0,0012	-	0,0015	-	0,0019	-
2	0,001	-	0,002	-	0,0018	-
3	0,611	+	0,002	-	0,010	-
4	0,010	-	0,005	-	0,050	-
5	0,500	+	1,001	++	0,0019	-
6	0,965	++	0,940	++	1,590	++
7	0,690	+	0,950	++	1,330	++
8	1,410	++	1,001	++	1,010	++
9	0,983	++	0,145	-	0,260	-
10	0,005	-	0,0012	-	0,002	-
11	0,0016	-	0,235	-	0,011	-
12	0,031	-	0,025	-	0,090	-
13	0,890	++	0,385	+	0,062	-
14	1,130	++	1,002	++	3,380	++
15	0,150	-	0,140	-	0,030	-
16	0,004	-	0,109	-	0,0018	-
17	0,050	-	0,260	-	0,0019	-
18	0,030	-	0,015	-	0,630	+
19	0,041	-	0,0013	-	0,070	-
20	0,060	-	0,060	-	0,060	-
21	0,060	-	0,015	-	0,0019	-
22	0,620	+	0,0011	-	0,090	-
23	0,022	-	0,030	-	0,027	-
24	0,005	-	0,005	-	0,030	-
25	0,255	-	0,200	-	0,400	+
26	0,430	+	0,540	+	0,560	+
27	0,010	-	0,015	-	0,030	-
28	0,250	-	0,115	-	0,020	-
29	0,015	-	0,020	-	0,101	-
30	0,0012	-	0,0015	-	0,020	-
31	0,130	-	0,125	-	0,210	-

32	0,210	-	0,170	-	0,360	+
33	0,325	+	0,230	-	0,320	+
34	0,105	-	0,015	-	0,020	-
35	0,460	+	0,420	+	0,440	-
36	0,345	+	0,240	-	0,010	+
37	0,020	-	0,011	-	0,040	-
38	0,715	+	0,023	-	0,0010	-
39	1,015	++	0,010	-	0,040	-
40	0,015	-	0,015	-	0,010	-
41	0,020	-	0,0010	-	0,040	-
42	0,670	+	0,510	+	1,140	++

Nuestros resultados muestran que 16 casos presentaban hipermetilación del promotor de hMLH1 (38,1%), 9 casos hipermetilación del promotor de hMSH2 (21,4%) y 11 casos hipermetilación del promotor de hMSH6 (26,2%).

Los casos 3, 18, 22, 26, 38 y 42, que presentaban patrones de hipermetilación en las regiones promotoras de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6, mantenían una disposición germinal en las muestras DNA procedentes de sangre periférica.

De todas las muestras analizadas, 20 casos presentaron ausencia de hipermetilación en las regiones promotoras estudiadas, siete casos presentaron hipermetilación de los promotores de hMLH1, hMSH2 y hMSH6 (casos 6, 7, 8, 14, 26, 35 y 42), seis casos mostraron hipermetilación de hMLH1 (casos 3, 9, 22, 36, 38 y 39), tres casos mostraron hipermetilación de la región promotora del gen hMSH6 (casos 18, 25 y 32), dos casos presentaron hipermetilación de hMLH1 y hMSH2 (casos 5 y 13), y un caso mostró hipermetilación en las regiones promotoras de hMLH1 y hMSH6 (caso 33).

## 2.2. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN hMLH1

El análisis mutacional de los 19 exones y las regiones intrónicas flanqueantes del gen hMLH1 mostró dos mutaciones de carácter patogénico descritas con anterioridad (casos 9 y 31) y una variante polimorfa (tablas 43 y 44). Las mutaciones patogénicas consistieron en un cambio “missense” y en una mutación en una de las bases flanqueantes del intrón 3, que altera el procesamiento del RNA.

Tabla 43, Polimorfismo encontrado en el gen hMLH1.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
7, 26	17	c.1959G>T	p.L654L	Descrita	No patogénica

Tabla 44, Mutaciones encontradas en el gen hMLH1.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
9	16	c.1852 1853AA>GC	p.K618A	Descrita	Patogénica
31	Int. 3	c.306+5G>A	“splicing”	Descrita	Patogénica

## 2.3. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN hMSH2

El análisis de los 16 exones y las regiones intrónicas flanqueantes del gen hMSH2 mostró una mutación tipo “missense” no descrita hasta el momento, y dos variantes polimórficas intrónicas (tablas 45 y 46).

Tabla 45, Polimorfismos encontradas en el gen hMSH2.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
25	Int 12	c.2006-6T>C	-	Descrita	No patogénica
14	Int 1	c.211+9C>G	-	Descrita	Desconocida

Tabla 46, Mutación encontrada en el gen hMSH2.

Caso	Exón	Mutación cDNA	Mutación proteína	Descrita en Bibliografía	Función
10	3	c.460G>A	p.A154R	No descrita	Desconocida

La mutación “missense” descrita por primera vez en este trabajo (c.460G>A) fue estudiada mediante simulación *in silico* con ayuda de los programas bioinformáticos de predicción de cambios de aminoácidos (tabla 47). Dos de estos programas predijeron que el cambio resulta patogénico (PMut y SIFT), mientras que los restantes (PolyPhen y SNPs3D) catalogan el cambio como neutro. El programa Panther no pudo realizar la simulación al no disponer de un alineamiento con una cantidad suficiente de proteínas homólogas.

Tabla 47, Comportamiento teórico de la mutación de cambio de sentido del aminoácido en el gen hMSH2, no descrita anteriormente. Los valores aparecen en PSIC (PolyPhen), SMV (SNPs3D) y NN (PMut). P=patogénico, N=neutro.

Mutación	PolyPhen	Valor	SNPs3D	Valor	PMut	Valor	SIFT	Valor	Panther
A154R	N	0,16	N	2,74	P	0,51	P	0,01	No alineamiento

Este análisis fue completado con el estudio *in silico* del nivel de conservación evolutiva del aminoácido mutado en las diferentes especies mediante el programa PolyPhen. Como se observa en la figura 41, aunque hay discordancia entre especies para el aminoácido A154 habiendo gran variabilidad en esa posición, al aminoácido Arginina no aparece en esa posición.



Figura 41, Alineamiento de secuencias de la proteína hMSH2 en diferentes especies empleando el programa PolyPhen para el aminoácido A154.

## 2.4. ANÁLISIS DE GRANDES ALTERACIONES DE LOS GENES hMLH1 Y hMSH2.

Los genes hMLH1 y hMSH2 son proclives a presentar deleciones y reordenamientos de secuencia que pueden llevar a la desestabilización del sistema de reparación MMR<sup>155</sup>. En este trabajo, procedimos a la búsqueda de este tipo de alteraciones en 42 muestras de carcinoma endometrial mediante ensayos de MLPA (figura 42).

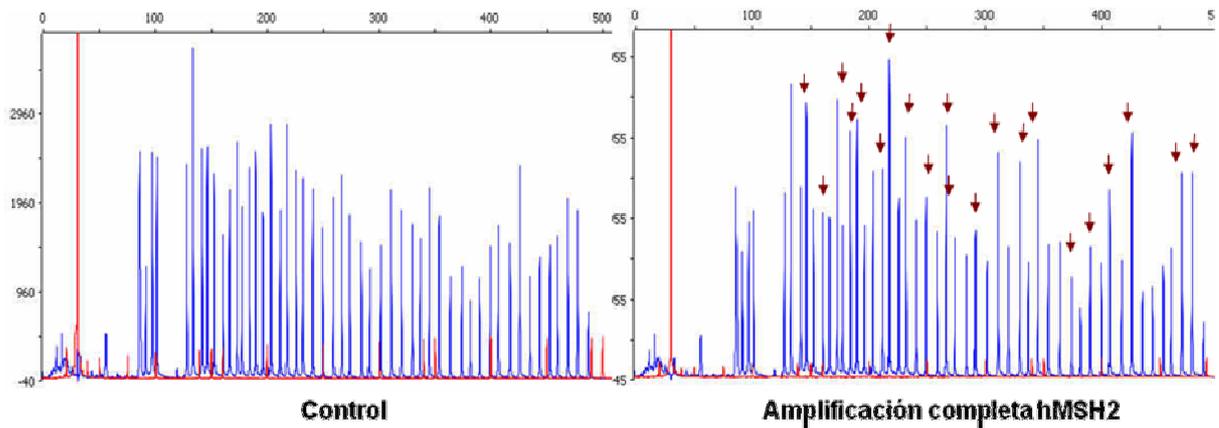


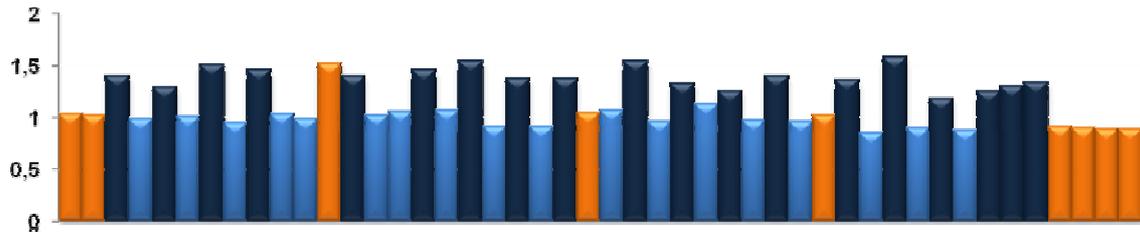
Figura 42, Electroferogramas de las reacciones de MLPA de los genes hMLH1 y hMSH2 de un control y de uno de los casos con una amplificación del gen hMSH2.

Los resultados de los ensayos de MLPA mostraron cuatro casos (9, 15, 17 y 25) con amplificaciones o deleciones en los genes hMLH1 o hMSH2. Los casos 9 y 17 presentan una amplificación y una deleción del gen hMLH1 respectivamente; y los casos 15 y 25 presentaron amplificación del gen hMSH2 completo y de la región que comprende los exones 8, 9 y 10 del gen hMSH2 respectivamente (tabla 48 y figuras 43a y 43b).

Tabla 48, Alteraciones cromosómicas encontradas en los genes hMLH1 y hMSH2 en carcinoma endometrial.

Caso	Gen	Alteración	Exones
9	hMLH1	Amplificación	Gen completo
15	hMSH2	Amplificación	8, 9 y 10
17	hMLH1	Deleción	Gen completo
25	hMSH2	Amplificación	Gen completo

### MUESTRA TUMORAL 9



### MUESTRA TUMORAL 15

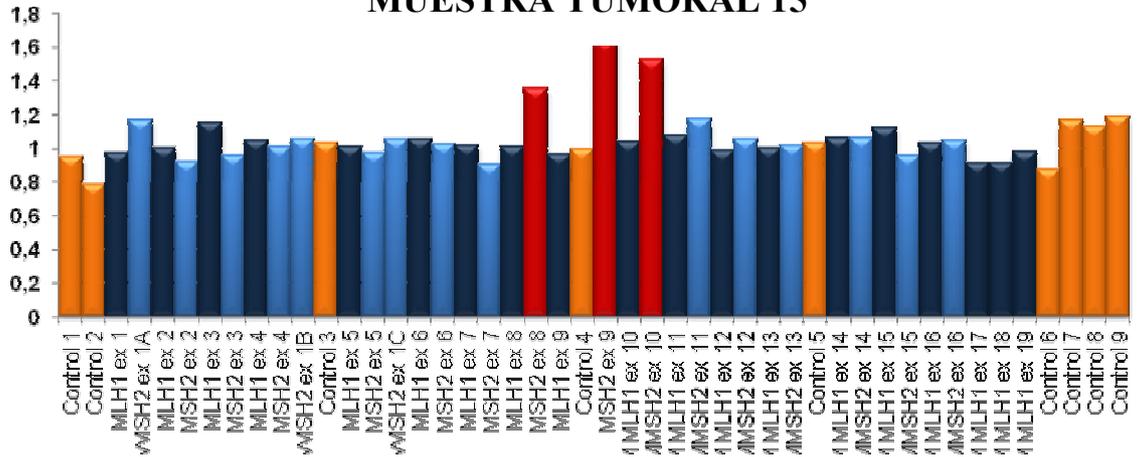
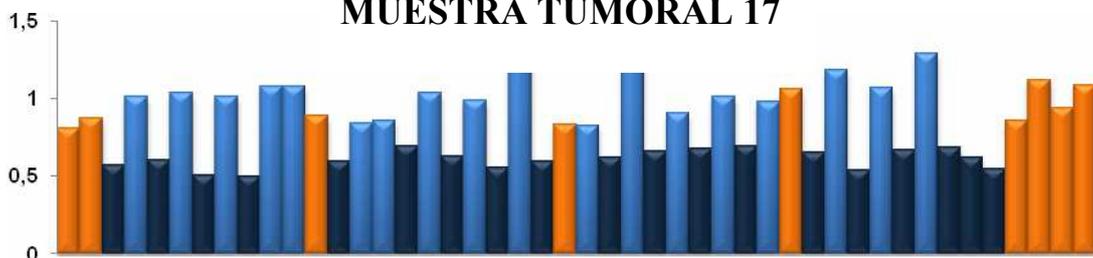


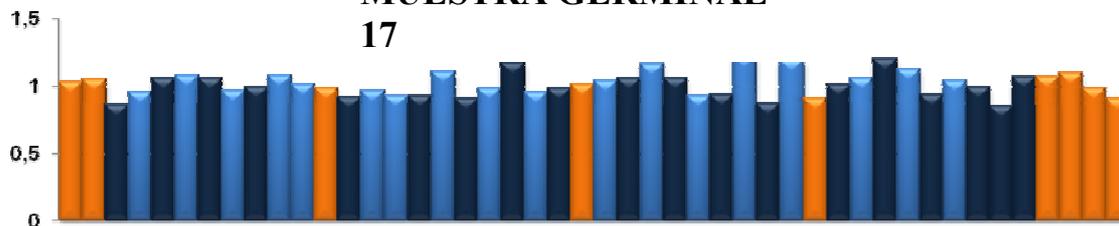
Figura 43a, Gráficas con los resultados de las normalizaciones de los electroferogramas de los casos 9, y 15. Las barras naranjas corresponden a los valores de los controles, las barras azul oscuro con los valores del gen hMLH1, las barras azul claro con los valores del gen hMSH2 y las barras rojas con los valores de la amplificación de los exones 8, 9 y 10 del gen hMSH2. Los valores de las normalizaciones se encuentran en el apartado anexos de este trabajo (tablas 58 y 59).

### MUESTRA TUMORAL 17



### MUESTRA GERMINAL

17



### MUESTRA TUMORAL

25

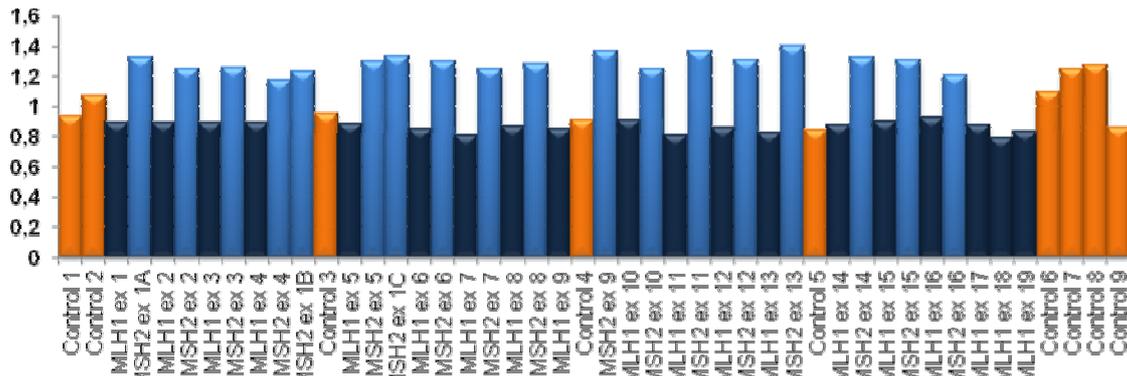
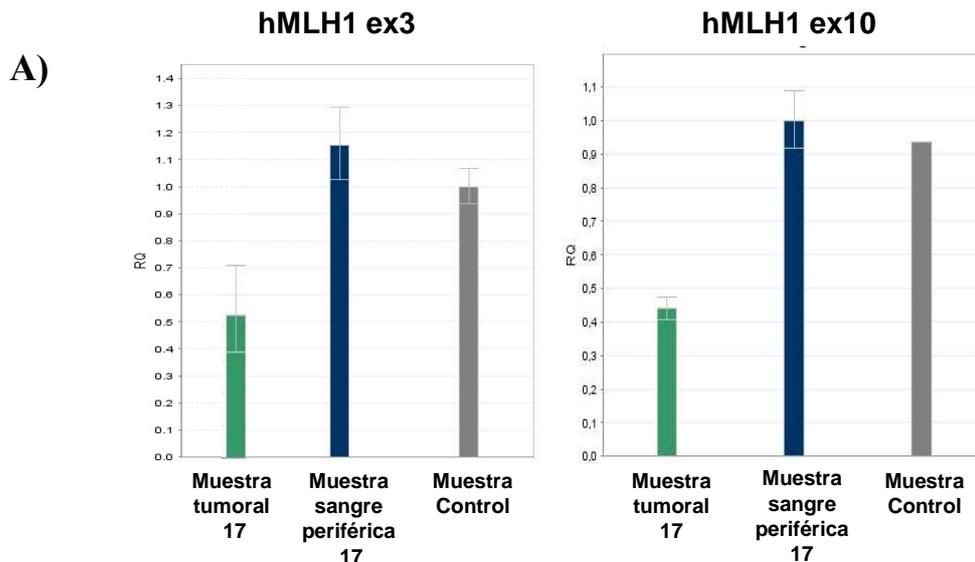


Figura 43b. Gráficas con los resultados de las normalizaciones de los electroferogramas de los casos 9, 15, 17 y 25. Las barras naranjas corresponden a los valores de los controles, las barras azul oscuro con los valores del gen hMLH1 y las barras azul claro con los valores del gen hMSH2. Los valores de las correcciones se encuentran en el apartado anexo de este trabajo (tablas 60, 61 y 62).

De estos resultados cabe destacar el caso 9, que además de la amplificación del gen hMLH1, muestra una amplificación del control 3 del kit comercial de MLPA (barra naranja) que corresponde a una región del cromosoma 3 (3p22) que es el mismo donde se localiza el gen hMLH1, lo que sugiere una amplificación del cromosoma completo (figura 43). Este caso, además, presenta una mutación patogénica en el gen hMLH1 (c.1852\_1853AA>GC).

En el caso 17 se pudo realizar el ensayo de MLPA en muestra tumoral y en muestra procedente de sangre periférica, observando que la delección del gen hMLH1 se detecta únicamente en el tumor (figura 43). El estudio de inestabilidad de microsatélites de esta muestra mostró los marcadores D2S123, PAX6 y MYCL1 como inestables (tabla 41).

Para confirmar estos hallazgos, se realizó una PCR a tiempo real cuantitativa comparativa de los exones 3 y 10 del gen hMLH1, 8 y 11 del gen hMSH2, y una amplificación control del cromosoma 12. Los resultados de estos ensayos confirmaron las alteraciones encontradas en los genes hMLH1 y hMSH2 por MLPA. En la figura 44 se muestran ejemplos de las gráficas de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa (RQ) correspondientes al caso 17 (delección de hMLH1) y al caso 15 (amplificación de los exones 8, 9 y 10 de hMSH2).



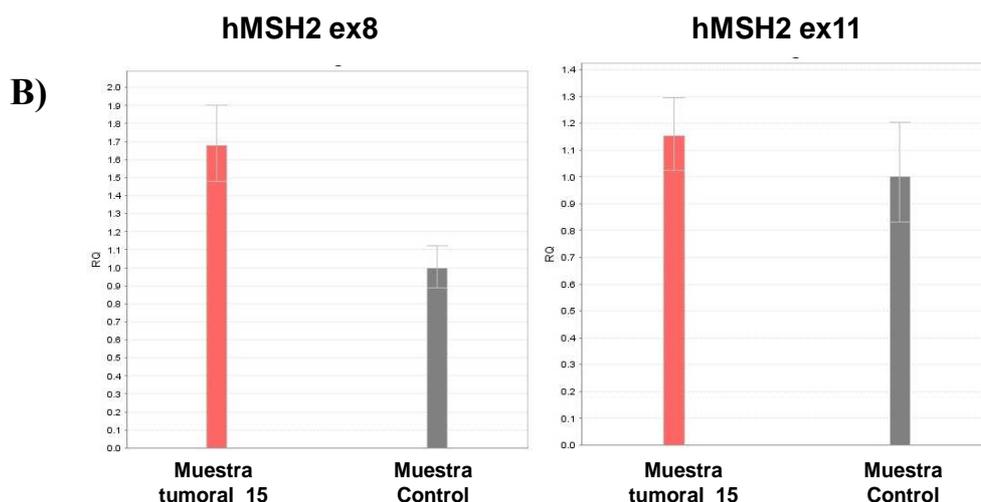


Figura 44, Gráficas donde se muestra en el eje de abscisas las muestras analizadas mediante PCR cuantitativa relativa y en el eje de ordenadas la cuantificación relativa (RQ) de los exones 3 y 10 del gen hMLH1 (A); y 8 y 11 de hMSH2 (B). Los valores de  $RQ=1\pm 0,2$  corresponden al control empleado 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  $RQ=1,5\pm 0,2$  corresponden a muestras con ganancia genética. También se muestran las barras de desviación estándar en cada caso.

Los resultados obtenidos en los ensayos de MLPA y PCR a tiempo real cuantitativa relativa en el caso 9 fueron además confirmados por estudios de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) que mostraron una trisomía completa del cromosoma 3, donde se localiza el gen hMLH1.

## ANÁLISIS DE LAS DEACETILASAS DE HISTONAS EN CARCINOMA ENDOMETRIAL

### 1. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL EXÓN 1 DEL GEN HDAC 2

El análisis del exón 1 del gen HDAC2 fue realizado en 42 muestras tumorales de carcinoma endometrial y reveló la presencia de mutaciones en la región microsatélite A<sub>9</sub> en 6 de estos casos (14,3%) (tabla 49)<sup>191</sup>.

Tabla 49, Mutaciones encontradas en el exón 1 del gen HDAC2.

Caso	Mutación cDNA	Mutación proteína
9, 22, 24, 31, 39, 40	c.24_25delA	p.K9fsX22
9	c.24_26delAA	p.K9fsX10

El estudio de muestras de sangre periférica de los casos 22 y 24, confirmó la naturaleza somática de las mutaciones. Además, estas dos muestras presentaron inestabilidad de microsatélites en 3 y 4 marcadores respectivamente (tabla 41), aunque no presentaron ningún tipo de alteración en los genes relacionados con los mecanismos de reparación estudiados. El caso 9 presenta inactivación bialélica del gen HDAC2.

Las muestras 9 y 31 presentaron, además de estas alteraciones en el exón 1 del gen HDAC2, alteraciones patogénicas en el gen hMLH1 (tablas 44 y 48).

## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HDAC1, HDAC2 Y HDAC3

El análisis de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 mediante Western blot se realizó en 38 muestras de carcinoma endometrial y en los extractos proteicos de 4 líneas celulares de carcinoma endometrial.

El análisis de este estudio en líneas celulares de carcinoma endometrial mostró una expresión homogénea de las tres proteínas (HDAC1, HDAC2 y HDAC3) en las cuatro líneas estudiadas (figura 45). Las líneas celulares AN3CA y SKUT1 presentan la mutación en la región microsatélite A<sub>9</sub> del gen HDAC2 en heterocigosis<sup>191</sup>.

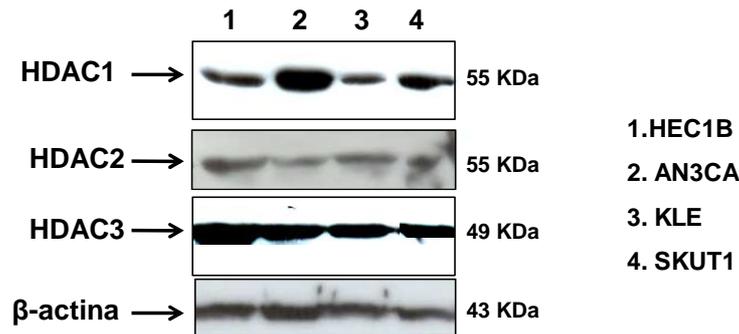


Figura 45, Western blot con inmunodetección de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en líneas celulares de carcinoma endometrial (HEC1B, KLE, AN3CA, SKUT1). La detección de proteína β-actina corresponde al control de carga.

El análisis de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en 38 extractos proteicos de carcinoma endometrial, cuantificados y normalizados, mostró una expresión desigual de las tres proteínas (figura 46, tabla 50). De todas las muestras analizadas, 23 casos presentaron expresión normal o sobreexpresión de las tres HDAC, cinco de estas muestras presentaron ausencia de la expresión de HDAC1 y HDAC3 (casos 12, 13, 15, 20 y 26), tres casos mostraron ausencia de expresión en HDAC2 y HDAC3 (casos 9, 18 y 31), dos casos presentaron ausencia de expresión de proteínas HDAC1 y HDAC2 (casos 32 y 41), uno de los casos mostró ausencia de expresión de proteína HDAC1 (caso 38), un caso presentó ausencia de expresión de HDAC2 (caso 39) y tres casos mostraron una ausencia de expresión de las tres proteínas (casos 2, 19 y 35).

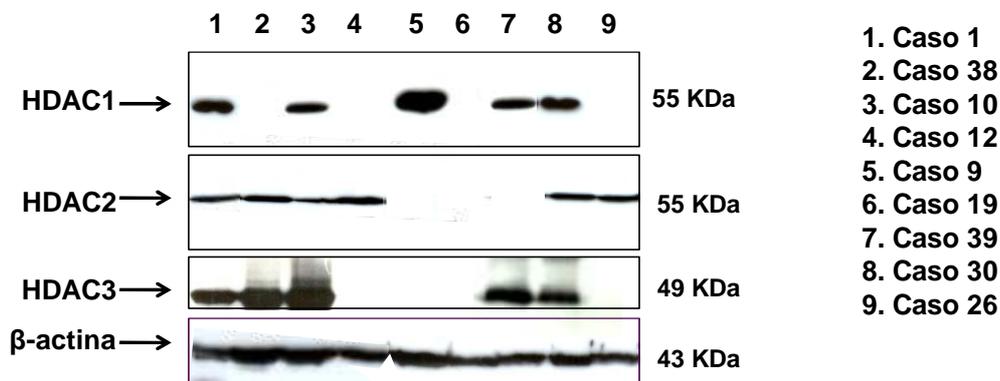


Figura 46, Western blot con inmunodetección de la proteína HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en 9 muestras de carcinoma endometrial. La detección de la proteína β-actina corresponde al control de carga.

Tabla 50, Resultados del análisis de expresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en tejido tumoral de carcinoma endometrial.

Caso	HDAC1		HDAC2			HDAC3	
	E. normal o sobreexpresión	No expresión	E. normal o sobreexpresión	No expresión	Alteración en HDCA2	E. normal o sobreexpresión	No expresión
1	+		+		Germinal	+	
2		+		+	Germinal		+
5	+		+		Germinal	+	
6	+		+		Germinal	+	
8	+		+		Germinal	+	
9	+			+	p.K9fsX22, p.K9fs10		+
10	+		+		Germinal	+	
11	+		+		Germinal	+	
12		+	+		Germinal		+
13		+	+		Germinal		+
15		+	+		Germinal		+
16	+		+		Germinal	+	
17	+		+		Germinal	+	
18	+			+	Germinal		+
19		+		+	Germinal		+
20		+	+		Germinal		+
21	+		+		Germinal	+	
22	+		+		p.K9fsX22	+	
23	+		+		Germinal	+	
24	+		+		p.K9fsX22	+	
25	+		+		Germinal	+	
26		+	+		Germinal		+
27	+		+		Germinal	+	
28	+		+		Germinal	+	
29	+		+		Germinal	+	
30	+		+		Germinal	+	
31	+			+	p.K9fsX22		+
32		+		+	Germinal	+	
33	+		+		Germinal	+	
34	+		+		Germinal	+	
35		+		+	Germinal		+
36	+		+		Germinal	+	
37	+		+		Germinal	+	
38		+	+		Germinal	+	
39	+			+	p.K9fsX22	+	
40	+		+		p.K9fsX22	+	
41		+		+	Germinal	+	
42	+		+		Germinal	+	

Nuestros resultados muestran como la presencia de mutación truncante en uno de los alelos no es suficiente como para anular la expresión del gen HDAC2, mientras que la mutación en los dos alelos se acompaña de silenciamiento del gen.



## ***Discusión***

Los carcinomas endometriales son los tumores ginecológicos más frecuentes en mujeres de países desarrollados. Aparecen mayoritariamente de forma esporádica, siendo la causa de su desarrollo desconocida a pesar de que se conocen ciertos factores de riesgo que propician su aparición<sup>2</sup>.

Los estudios realizados en los últimos años sobre la carcinogénesis endometrial han integrado las características clínico-patológicas y las alteraciones moleculares presentes en los diferentes tipos de tumores. Basado en esto, se han dividido los tumores de endometrio en dos grupos: tipo I o endometriode y tipo II o no endometriode<sup>3</sup>. Los tumores mulerianos mixtos son otro tipo de tumores de endometrio considerados de tipo II por su agresividad aunque su componente carcinomatoso suele ser endometriode<sup>225</sup>.

Los tumores tipo I representan la mayoría de los casos esporádicos (70-80%), aparecen a edades tempranas en mujeres pre y postmenopáusicas, cursan con pronóstico favorable y suelen ser tumores de grado bajo con alta expresión estrogénica<sup>1,18,131</sup>. Estos tumores se originan a partir de una lesión precursora denominada hiperplasia atípica, que va acumulando alteraciones que conducen a las células a la aparición del tumor<sup>8,41</sup>. Actualmente se postulan dos tipos principales de alteraciones moleculares en el desarrollo de los carcinomas endometriales de tipo I: inestabilidad de microsatélites (MSI), y mutaciones somáticas en los genes PTEN, KRAS y CTNNB1<sup>5,6,9,11,12,14,15</sup>.

El grupo de los tumores de tipo II incluye los tumores serosos y los de células claras; aparecen con menor frecuencia que los de tipo I y se desarrollan principalmente en mujeres postmenopausadas. Son tumores de grado alto, sin estimulación estrogénica y significativamente más agresivos que los de tipo I<sup>1,18,44</sup>. Como lesión precursora, se observan pólipos o lesiones precancerosas que producen atrofia del endometrio y en las que se acaba desarrollando el tumor<sup>8</sup>. Las alteraciones moleculares en este tipo de tumores aparecen predominantemente en los genes de p53, CDH1, p16 y en forma de pérdidas de heterocigosidad (LOH)<sup>12,17,19,20,34,128</sup>.

Trabajos previos realizados por diferentes grupos de investigación han permitido establecer la incidencia de las alteraciones moleculares presentes en los tumores endometriales tipo I<sup>4,5,6,8,9,10,11,14,15</sup> y tipo II<sup>17,19,20,21,22</sup> (tabla 51), pudiéndose observar la implicación de diferentes mecanismos moleculares en la transformación de células sanas a tumor endometrial de uno y otro tipo<sup>1,12,18,34,41,131,132</sup>.

**Tabla 51, Alteraciones moleculares en los carcinomas endometriales tipo I y tipo II de acuerdo con los estudios publicados hasta el momento.**

Alteración	Tipo I	Tipo II
MSI	20-40%	0-5%
PTEN	35-50%	10%
PIK3CA	36%	5%
TP53	10-20%	90%
KRAS	15-30%	0-5%
CTNNB1	20-40%	0-5%
CDH1	10-20%	80-90%
CDKN2A	10%	40%

Esta aproximación constituye una manera útil de categorizar los tumores endometriales, aunque existen tumores que no puedan ser catalogados en uno u otro grupo debido al solapamiento de características de ambos tipos, lo que lleva a plantearse que una clasificación rígida como la propuesta anteriormente sea correcta y la existencia real de un modelo de progresión tumoral definido por las alteraciones específicas en las células tumorales<sup>23,24</sup>.

Los carcinosarcomas son tumores muy heterogéneos, que aparecen con una incidencia baja (1-2% de todos los tumores endometriales). Estos tumores están formados por una mezcla de células malignas compuesta por una parte epitelial, que suele corresponder a carcinoma endometriode, y una parte estromal<sup>28</sup>. Aunque el componente epitelial está formado, en la mayoría de los casos, por carcinoma de tipo endometriode y comparte características moleculares con este tipo de tumores, se diferencia de ellos, en que su mayoría son de alto grado, tiene un peor pronóstico y mayor propensión a la metástasis<sup>40</sup>. A

nivel molecular, presentan alteraciones a nivel de los cromosomas 8 y 20, además de en los genes de p53 y KRAS<sup>225</sup>.

En este trabajo hemos estudiado 28 carcinomas endometrioides (66,7% del total de casos incluidos en nuestro estudio), 6 carcinomas serosos y de células claras (14,3%), 2 carcinomas mixtos (4,8%), 5 carcinosarcomas y 1 carcinoma del estroma (14,3%). En las tablas 52a y 52b resumimos las alteraciones moleculares que fueron encontradas en cada uno de los casos).

Tabla 52a, Relación de mutaciones encontradas en los genes de estudio en carcinoma endometrial. (C)=caso, (G)=gen, (P)=proteína, (H)=alteración homocigota.

C	Gen	Tipo	PTEN		TP53		CDH1		CDKN2A		PIK3CA		KRAS		BRAF		CTNNB1	
			G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P		
19		Tipo I	388C>G	R130G			253G>A	V85I										
20		Tipo II																
21		Tipo II			818G>A (H)	R273H (H)												
22		Tipo I	389G>C	R130P														
23		Tipo I	395G>C	G132A														
			493G>A	G165R														
24		Mixto	388C>G	R130G														
9		Tipo I	389G>C	R130P							3061T>C	Y1021H						
10		Mixto			328C>T	R110C		217G>A	A73T		2974C>T	R992X						
11		Tipo I	757_759delAT	I253fsX2							3127A>G	M1043V					111C>T	S37F
			959T>C	L320S														
12		Sarcoma			722C>T (H)	S241F(H)												
13		Tipo I	395G>A	G132D														
			757_759delAT	I253fsX2									3132T>G	N1044K				122A>G
14		Tipo I	388C>G	R130G														
15		Tipo I	395G>C	G132A														
16		Tipo I																
17		Sarcoma			527_528insC	C176fsX180								12G>T	G12V			
18		Tipo I	743C>G	P248R														
			752G>T	G251V														

Tabla 52b, Relación de mutaciones encontradas en los genes de estudio en carcinoma endometrial. (C)=caso, (G)=gen, (P)=proteína, (H)=alteración homocigota.

25	Sarcoma															122A>G	T41A
26	Tipo II																
27	Tipo I	405_406insA	C136fsX1	744G>A	R248Q												
28	Sarcoma	513G>C (H)	Q171H (H)	458_459insG	P153fsX179												
				832C>T	P278S												
29	Tipo I																
30	Tipo II			744G>A	R248Q	271G>A	R90Q										
31	Tipo II																
32	Tipo I	900_902insTC	D300fsX6							3140A>G	H1047R					111C>T	S37F
33	Tipo II			821T>C	V274A												
34	Tipo I																
35	Tipo I																
36	Tipo I	697C>T (H)	R233X (H)														
37	Tipo I	530_536delATTAT	Y176fsX2														
38	Tipo I	388C>G	R130G														
39	Tipo I	742_743insA	P248fsX5														
40	Sarcoma	766G>T	E256X														
41	Tipo I																
42	Tipo I									1635G>T	E545D					98C>G	S33C

## 1. ESTUDIO DEL GEN PTEN

El gen PTEN es el que se ha encontrado mutado con mayor frecuencia en los tumores endometriales. Además de las mutaciones somáticas identificadas en su secuencia codificante, existen otros mecanismos de inactivación del gen PTEN como son pérdidas de heterocigosidad (LOH)<sup>19,226</sup> y la hipermetilación de su región promotora<sup>76,77,78</sup>.

La búsqueda de mutaciones somáticas en el gen PTEN en 42 casos de tumores de endometrio mostró que más de la mitad de los casos incluidos en nuestro trabajo (57,1%) eran portadores de mutaciones en este gen (tabla 24). Las mutaciones se encontraron exclusivamente en tumores con componente de tipo I (endometrioides, mixto y carcinosarcomas) y en el sarcoma del estroma, no detectándose en los tumores serosos y de células claras. Si se tiene en cuenta únicamente los 28 casos de carcinoma endometriode, la incidencia de mutación en el gen PTEN asciende a un 67,8% de los casos, porcentaje similar al descrito previamente en la literatura, que llega a alcanzar hasta el 80% en algunas series<sup>8,9,18,24,67,68,131,132</sup>.

Todas las mutaciones encontradas en el gen PTEN se han localizado entre los exones 5 a 8, que son los que codifican los dominios fosfatasa y C2. El dominio fosfatasa es responsable de la defosforilación de PIP3 y PIP2, con la consiguiente atenuación de la señal intracelular de PI3K<sup>50,74</sup>; mientras que el dominio C2 interviene en la unión a otras proteínas y a la membrana plasmática para ejercer más eficientemente esta función fosfatasa<sup>52</sup>. En trabajos previos también se ha descrito esta acumulación de alteraciones en esta localización, siendo las mutaciones encontradas fuera de estas dos regiones muy poco frecuentes y asociadas con un mejor pronóstico de la enfermedad<sup>67,74</sup>.

En este trabajo, hemos caracterizado 8 mutaciones nuevas en el gen PTEN: c.283C>A, c.395G>C, c.455A>G, c.515\_517delGC, c.641\_662del, c.743C>G, c.757\_759delAT, c.959T>C y c.900\_902insTC (tabla 24). Tres de estas variantes (c.515\_517delGC, c.757\_759delAT y c.900\_902insTC) corresponden a mutaciones de cambio de fase de lectura (“frameshift”) que se consideraron patogénicas ya que generan una parada prematura de la traducción y una proteína truncada carente de función.

La mutación c.641\_662del produce una pérdida de 7 aminoácidos en el dominio C2 de la proteína pero mantiene la fase de lectura. El estudio de la secuencia de la región delecionada puso de manifiesto un alto grado de conservación evolutiva, lo que refuerza la hipótesis de que esta región es relevante para el correcto funcionamiento de la proteína (figura 30). El análisis de esta mutación mediante programas informáticos de predicción teórica mostró que la secuencia delecionada no contiene secuencias diana de proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA (proteínas SR) y tampoco contiene secuencias de anillamiento para miRNAs que pudieran regular la expresión del gen. Sin embargo, la alteración provoca la pérdida de una cinta  $\beta$ <sup>54</sup> que está implicada en la formación y el mantenimiento de una estructura de mayor complejidad necesaria para la unión a membranas y otras proteínas con este dominio<sup>52,53</sup>. Además, esta deleción se localiza en una región proclive a la aparición de alteraciones, sobre todo en el aminoácido Q214<sup>220</sup>.

Las mutaciones c.283C>A, c.395G>C, c.743C>G y c.959T>C, que producen cambios de aminoácido (“missense”), se describen por primera vez en este trabajo. Los estudios bioinformáticos mostraron un alto grado de conservación a lo largo de la evolución de los aminoácidos germinales y en tres de los cuatro casos (c.283C>A, c.395G>C y c.959T>C) los programas sugerían un efecto patogénico. No obstante, los estudios informáticos de predicción teórica mostraron que dichos cambios no contienen secuencias diana de proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA, ni contienen secuencias de anillamiento para miRNAs (datos no mostrados). En el caso de la mutación c.395G>C, p.G132A, localizada en el dominio fosfatasa de la proteína y que encontramos en dos de los casos estudiados, se localizan en el mismo codón que otras mutaciones descritas anteriormente como patogénicas: c.395G>A, p.G132D y c.395G>T, G132V<sup>220</sup>, que se han encontrado en carcinomas endometriales con una frecuencia alta. En nuestro estudio hemos encontrado también un caso portador de la mutación c.395G>A (caso 13, tabla 24). Este hecho refuerza el carácter patogénico de la nueva mutación, probablemente al modificar la función fosfatasa de la proteína<sup>7</sup>.

El estudio bioinformático de la mutación c.743C>G, p.P248R resultó contradictorio, ya que varios de los programas utilizados predecían un efecto neutro (tabla 25) a pesar que el grado de conservación evolutiva de este codón era muy alto (figura 28). Esta variante se encontró en la muestra 18, que también

contenia la mutación c.752G>T, p.G251V que ha sido considerada patogénica en otros estudios<sup>220</sup>. Con el fin de determinar si las mutaciones se localizaban en el mismo alelo, procedimos a clonar los fragmentos amplificados por PCR, confirmando que ambas mutaciones se localizan en el mismo alelo (figura 47), lo que refuerza la hipótesis de la mutación c.743C>G, p.P248R tiene un efecto neutro. No obstante, son necesarios estudios poblacionales y funcionales para corroborarlo.

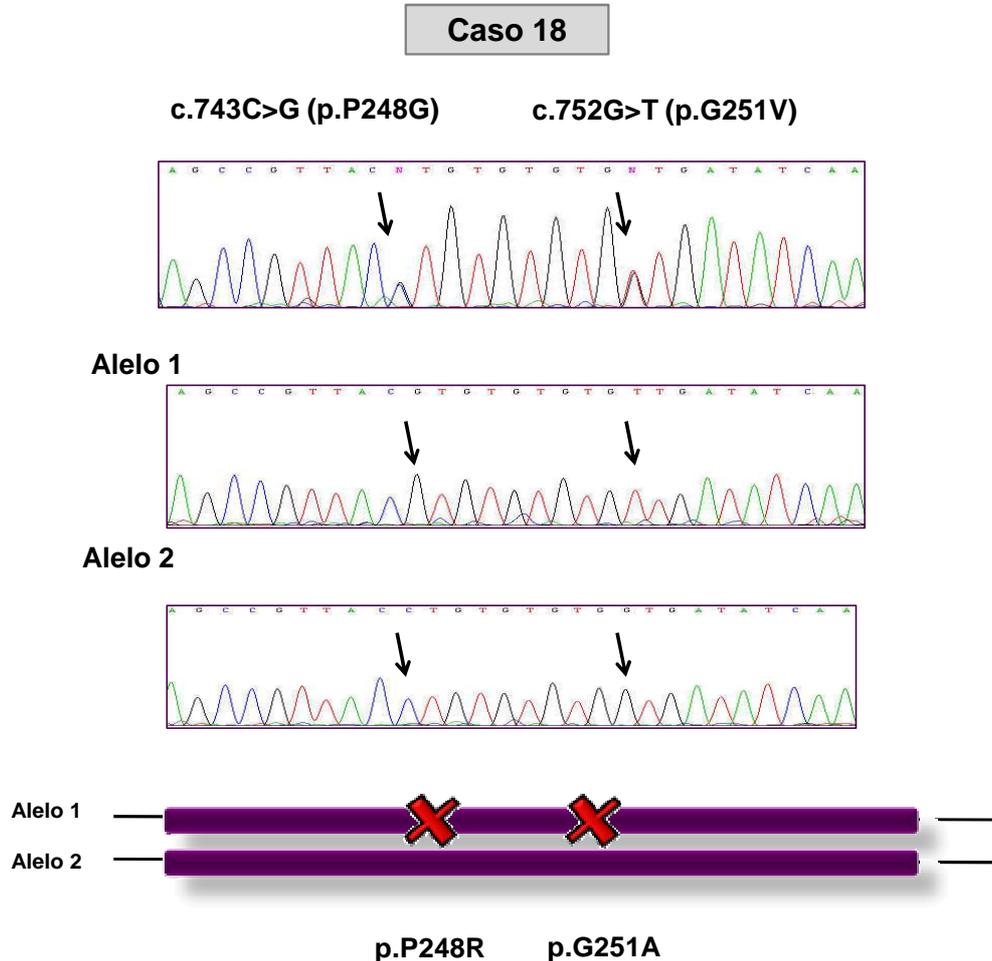


Figura 47, Secuencia del exón 7 del gen PTEN del caso 18 con las mutaciones encontradas (c.743C>G y c.752G>T) y secuencias de los clones con cada alelo. Se adjunta un diagrama con la localización de dichos cambios.

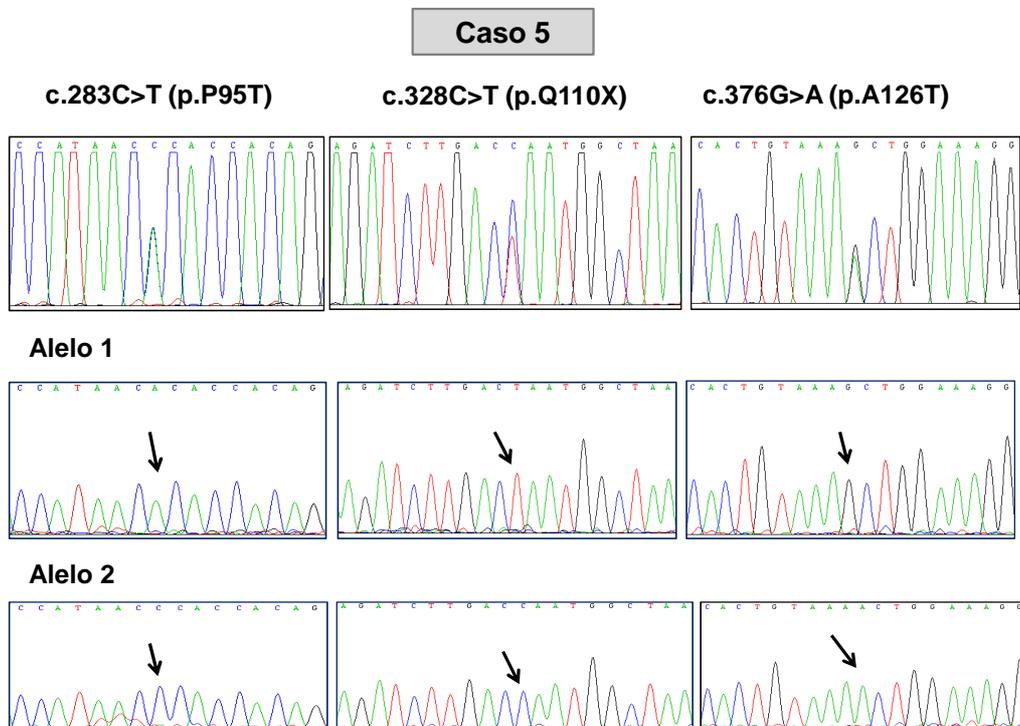
La mutación c.455A>G encontrada en el caso 31 y descrita por primera vez en este trabajo, produce un cambio silencioso, p.L152L, en el dominio fosfatasa. El estudio bioinformático descartó que la mutación modifique secuencias implicadas en el proceso de maduración de RNA, así como que sea un lugar de unión de miRNAs. Por ello, la variante p.L152L fue considerada no patogénica, aunque son necesarios estudios poblacionales para confirmar la naturaleza polimorfa de este cambio.

Dado que el gen PTEN es un gen supresor de tumores, es necesaria la inactivación del segundo alelo<sup>49</sup> para justificar su implicación en la tumorigénesis. En este sentido, la inactivación del alelo contralateral puede ser consecuencia de mutaciones patogénicas o de otro tipo de eventos genéticos como pérdidas de heterocigosidad (LOH)<sup>19,226</sup> o procesos de silenciamiento epigenético<sup>77,78,79</sup>. La ausencia de muestras de sangre periférica de algunas de las pacientes incluidas en el estudio nos ha impedido determinar el porcentaje de casos en los que la mutación de un alelo se acompaña de pérdida de heterocigosidad. No obstante, en los tumores de los casos 28 y 36, en los que no dispusimos de muestra procedente de sangre periférica, pudimos confirmar la existencia de los dos alelos dado que mantenían la heterocigosidad en el polimorfismo IVS4+109ins5 del gen PTEN en la pieza tumoral (figura 31). Ante la existencia de una mutación en homocigosis y la ausencia de LOH, podemos deducir que, o existe una microdeleción en la región afectada por las mutaciones en los casos 28 y 36, o nos encontramos ante una

mutación en homocigosis; en este último caso, cabe la posibilidad de que las dos mutaciones sean adquiridas o que una de ellas se haya heredado en línea germinal. La ausencia de sangre periférica de estas pacientes no nos permitió validar esta hipótesis.

El estudio mediante Western blot del caso 9 mostró la ausencia de expresión de la proteína PTEN. Dado que no hemos encontrado mutaciones patogénicas truncantes en este caso y que hemos confirmado la presencia de los dos alelos en el locus 10q23 por la presencia de la variante IVS5-12insT en heterocigosis, la ausencia de expresión debe explicarse como consecuencia de la inactivación epigenética de los dos alelos, siendo necesario el análisis de estado de metilación de la región promotora del gen para confirmar esta hipótesis.

El caso 5 es un caso peculiar en el que hemos caracterizado tres mutaciones en el exón 5 del gen PTEN. La clonación de los fragmentos de PCR y su consiguiente secuenciación reveló que las mutaciones c.328C>T p.Q110X, ya descrita con anterioridad<sup>220</sup>, y la mutación c.283C>A p.P95T descrita por primera vez en este trabajo, se encuentran en el mismo alelo, mientras que la mutación c.376G>A, p.A126T, también previamente descrita, se encuentra en el alelo contrario (figura 48). Dado que la mutación c.328C>T p.Q110X, es una mutación sin sentido (“nonsense”) que genera una proteína truncada<sup>220</sup>, debemos considerar a la mutación c.283C>A p.P95T como una mutación de significado desconocido. No obstante, el estudio *in silico* de esta mutación con programas de predicción, mostró que cuatro de las cinco simulaciones, consideraban la mutación patogénica. Además, esta mutación está localizada en una secuencia muy conservada de la proteína que corresponde al dominio fosfatasa, donde se ha descrito previamente otra mutación patogénica p.P95L<sup>220</sup>. El exón 5 es el más mutado en nuestra serie y su relevancia radica en que codifica parte del dominio fosfatasa de la proteína PTEN. El cambio prolina por treonina supone la pérdida de un iminoácido que confiere cierta rigidez a la estructura proteica por un aminoácido hidrofílico. La existencia de tres mutaciones patogénicas podría explicarse por una mayor inestabilidad del tumor. En nuestro estudio, no hemos encontrado mutaciones en los genes hMLH1 y hMSH2 pero si una hipermetilación de las regiones promotoras de estos genes (tabla 42), no pudiendo realizar el estudio de inestabilidad genómica por no disponer de muestra procedente de sangre periférica de la paciente. Por otro lado, cabe la posibilidad de que la paciente sea portadora de una mutación germinal sobre la que se añaden dos mutaciones durante el proceso de desarrollo del tumor.



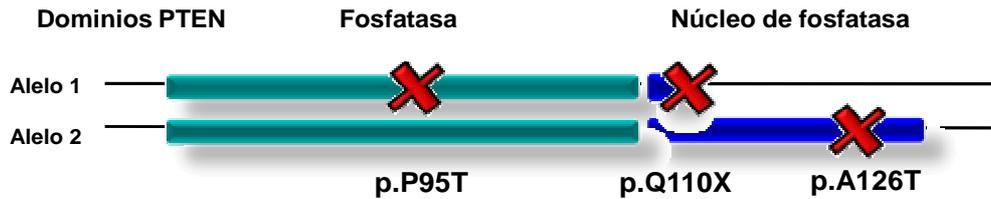


Figura 48, Secuencia del exón 5 del gen PTEN del caso 5 con las mutaciones encontradas (c.283C>T, c.328C>T y c.376G>A) y secuencias de los clones con cada alelo. Se adjunta un diagrama con la repercusión de dichos cambios en la proteína.

En los casos 3, 11, 13 y 23 (tabla 24), también hemos encontrado dos mutaciones heterocigotas en el gen PTEN. En estos casos no pudimos comprobar experimentalmente la localización de las mutaciones en los diferentes alelos al estar situadas en diferentes exones y no disponer de RNA que nos permitiese analizar el cDNA, pero lo más probable es que se localicen en los diferentes alelos y expliquen la inactivación del gen.

En nuestro trabajo hemos incluido 6 sarcomas de útero: 5 carcinosarcomas y 1 sarcoma del estroma. Los carcinosarcomas son los sarcomas más frecuentes y sus características epidemiológicas y moleculares hacen que su comportamiento sea más parecido a los carcinomas endometrioides de alto grado que a los sarcomas en sí<sup>40</sup>. La mitad de los sarcomas uterinos estudiados presentaron alteraciones en el gen PTEN; este porcentaje es superior a otras series publicadas hasta el momento en las que se encuentran mutaciones patogénicas en el gen PTEN en un 8 a 18% de los casos<sup>227</sup>.

El estudio de expresión de la proteína PTEN en tejido tumoral mediante Western blot mostró que su expresión se correlaciona con el tipo de mutaciones encontradas. Así, los casos sin mutaciones en el gen PTEN o con mutaciones “missense” mantenían una expresión normal, mientras que en los casos donde fueron identificadas una o varias mutaciones de cambio de fase de lectura “frameshift” con aparición de un codón de parada de la traducción prematuro, los niveles de expresión estaban disminuidos (tabla 27). Sin embargo, los casos 25 y 42, que no presentaban mutaciones en el gen PTEN, mostraron una disminución de la expresión de la proteína, lo que sugiere la existencia de otro mecanismo de inactivación del gen, como pudiera ser la hipermetilación del promotor o una pérdida de heterocigosidad del locus. Estos casos deben de ser analizados con cuidado dado que los anticuerpos comerciales disponibles no muestran asociación significativa entre la expresión de la proteína y las alteraciones en el gen PTEN<sup>132,228</sup>.

## 2. ESTUDIO DEL GEN PIK3CA

PI3K es una proteína que participa en la fosforilación de segundos mensajeros formados desde la membrana plasmática, constituyendo, junto con PTEN, un mecanismo de activación/modulación de la ruta de Akt que está implicada en los procesos tumorigénicos de la célula<sup>9</sup>. En el gen que codifica la subunidad catalítica p110α de PI3K (PIK3CA) se han descrito alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo del carcinoma endometrial<sup>230</sup>.

El estudio del gen PIK3CA en 42 tumores de endometrio nos ha permitido caracterizar ocho casos (19%) que presentaban mutaciones en el gen. No obstante, si tenemos en cuenta solamente los tumores endometrioides de esta serie, el porcentaje de casos con mutaciones en este gen asciende al 25%, similar al publicado en otras series<sup>87,231</sup>.

En seis casos las mutaciones se localizaron en el exón 20, que codifica el dominio kinasa, y en dos casos, en los exones 7 y 9, donde residen los dominios C2 y hélice respectivamente. Se ha descrito que, a diferencia del cáncer de colon, donde predominan las mutaciones en el exón 9, en el cáncer de endometrio son más frecuentes las mutaciones en el exón 20 del gen PIK3CA<sup>232</sup>, confirmando nuestro estudio esta observación. Las mutaciones en este dominio se han asociado con un aumento de la actividad catalítica fosforilativa de la proteína PI3K, lo que produciría una activación de la vía de Akt y, con ello, de todos los procesos de diferenciación y crecimiento celular, apoptosis, etc, implicados en el desarrollo tumoral<sup>230</sup>. Las mutaciones en el exón 20 se han relacionado con tumores de mayor agresividad que las

del exón 9<sup>233</sup>, y las del exón 7 no se han estudiado hasta el momento en tumores de endometrio<sup>132,233,234</sup>, por lo que nuestra observación de la existencia de una mutación en esta región sugiere la necesidad de analizar también este exón en este tipo de tumores.

La mayoría de las mutaciones en el gen PIK3CA se agrupan en tres posiciones: E452, E545 del dominio hélice, y H1047 en el dominio kinasa<sup>85,86</sup>. En nuestra serie hemos encontrado dos casos con la mutación H1047R y otro con la mutación E545D, no encontrando mutaciones recurrentes aunque sí una agrupación entre los nucleótidos c.2974 y c.3140 (tabla 36).

Las mutaciones del gen PIK3CA en los tumores endometriales se han asociado con mutaciones concomitantes en el gen PTEN en casi la mitad de los casos (46%)<sup>231,235</sup>. Nosotros hemos encontrado mutaciones en los genes PTEN y PIK3CA en cinco casos (casos 4, 11, 13, 23 y 32), mientras que tres casos (casos 9, 10 y 41) eran portadores de mutaciones en PIK3CA pero no de PTEN (tablas 52a y 52b). Cabe destacar el caso 4, donde convergen mutaciones en los genes PTEN y PIK3CA que producen deleciones en fase de 7 y 9 aminoácidos respectivamente, sugiriendo que el mecanismo causante de estas mutaciones pudiera ser el mismo. Dado que hemos encontrado 24 casos portadores de mutaciones en el gen PTEN, menos de la cuarta parte de los casos con mutaciones en este gen (20,8%) son portadores de mutaciones en el gen PIK3CA. Sin embargo, esta incidencia se sitúa por encima de lo reflejado por otros grupos<sup>231,235</sup>.

Las mutaciones inactivantes del gen PTEN y las activadoras del gen PIK3CA son redundantes ya que ambas activan la vía de Akt<sup>230</sup>. Se ha intentado explicar la presencia simultánea de mutaciones en estos genes en los tumores de endometrio, postulándose dos posibles hipótesis<sup>235</sup>: a) se necesita más de una señal activadora de la vía Akt para que se produzca el desarrollo del tumor, b) PTEN y PIK3CA, además de la regulación de la vía de Akt, tendrían otras funciones; así, recientemente se ha demostrado que PTEN puede interactuar con p53 y modular su función de manera independiente a su actividad fosfatasa<sup>236</sup>.

Se ha sugerido que las mutaciones de PIK3CA aparecen en un estadio posterior del desarrollo tumoral que las de PTEN y estarían asociadas con una mayor capacidad de invasión y, por tanto, con una mayor malignidad, planteando que ambas mutaciones se deben considerar como dos eventos independientes en la tumorigénesis endometrial<sup>235</sup>. Nuestros resultados muestran que cuatro de los cinco tumores portadores de mutaciones en los genes PTEN y PIK3CA corresponden a carcinomas de bajo grado, mientras que únicamente uno de ellos es de grado alto y con mayor potencial maligno, lo que no apoyaría este supuesto.

Cinco de las mutaciones del gen PIK3CA descritas en nuestro trabajo han sido previamente caracterizadas en otros estudios. En dos casos hemos encontrado mutaciones que producen una proteína truncada a nivel del dominio C2 (caso 4: p.G451\_G460del) y a nivel del dominio kinasa (caso 10: p.R992X). La mutación identificada en el gen PIK3CA en el caso 4, produce una proteína truncada 9 aminoácidos en su dominio C2, dominio que forma láminas  $\beta$  en la superficie proteica y cuya función consiste en la unión a otras proteínas y a la membrana plasmática<sup>89</sup>. Esta mutación fue estudiada en profundidad con un programa de predicción de la estructura secundaria, observándose que da lugar a un cambio por acortamiento de la estructura proteica y por modificación del plegamiento adyacente (figura 37). El análisis del nivel de conservación evolutivo de esta mutación puso de manifiesto que los codones L456, N457 y P458 están altamente conservados (figura 38), lo que refuerza el posible carácter patogénico de la misma. El estudio *in silico* de la secuencia delecionada reveló que no es diana de las proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA (proteínas SR); ni de miRNAs, por lo que el efecto patogénico de esta alteración posiblemente esté mediado por el cambio estructural que modifique las interacciones de la proteína con otras moléculas<sup>85</sup>.

En el caso 10 hemos encontrado una mutación que genera un codón de parada (“nonsense”), que se traduciría en una proteína carente casi por completo del dominio kinasa (tabla 36), comprometiendo la actividad de la proteína oncogénica PI3K (figura 49). Si bien es cierto que la mayoría de las mutaciones encontradas en este gen son de tipo “missense”, excepcionalmente han sido descritos tres casos de deleciones, dos inserciones y una deleción compleja en fase en la secuencia del gen, aunque en alguno de estos casos, el resultado es una proteína no truncada<sup>89,235</sup>. El estudio de expresión proteica de este caso mediante Western blot mostró una ausencia total de proteína PIK3CA (figura 40, tabla 37) a pesar de que el alelo contralateral no mostraba ninguna otra alteración. La ausencia de expresión proteica podría ser consecuencia de la inactivación o silenciamiento del alelo germinal por otro mecanismo no conocido<sup>237</sup>.

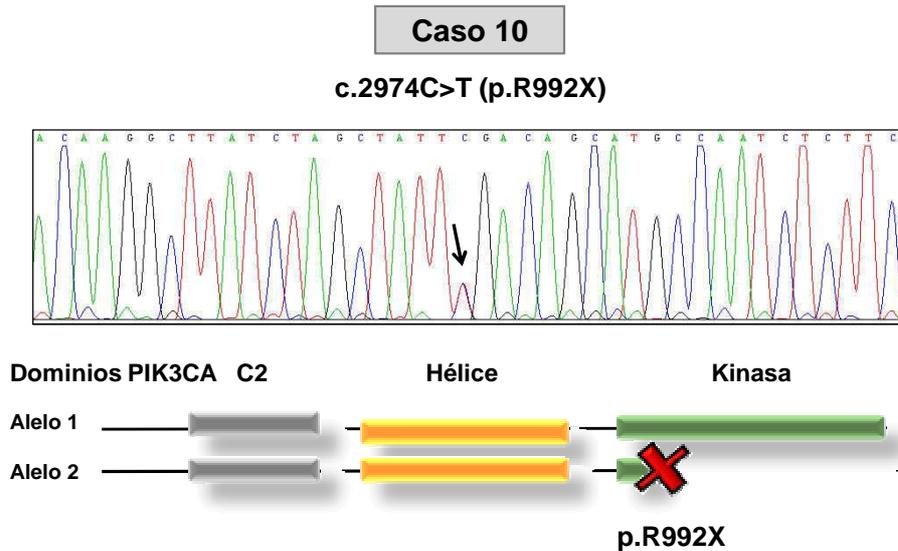


Figura 49, Secuencia de la mutación encontradas en el caso 10 (c.2974C>T) en el gen PIK3CA. Diagrama con la repercusión del cambio en la proteína.

El estudio del caso 9 mediante CGH (estudio realizado en colaboración con el grupo del laboratorio 12 del Centro de Investigación del Cáncer-Salamanca), mostró la presencia de una trisomía del cromosoma 3. Este tumor presenta una mutación puntual patogénica en el dominio kinasa de la proteína (p.Y1021H) que, junto con la amplificación, constituyen dos eventos de activación de la función catalítica de PI3K. Esta asociación es muy poco frecuente y trabajos previos apuntan a que alteraciones puntuales y amplificaciones en el gen son excluyentes<sup>238</sup>.

Curiosamente, aunque el caso 9 no presenta mutaciones en el gen PTEN, no hemos encontrado expresión de esta proteína mediante Western blot (figura 33, tabla 27). La causa más plausible de la falta de expresión de la proteína PTEN es el silenciamiento por hipermetilación del promotor de ambos alelos del gen. Este evento, aún sin confirmar, se sumaría al incremento de expresión de Akt secundario a la amplificación en el gen PIK3CA y a la mutación puntual en el dominio kinasa de este.

### 3. ESTUDIO DE LOS GENES KRAS Y BRAF

Se han descrito mutaciones en el gen KRAS en carcinomas endometriales de tipo I. Las mutaciones activadoras en este gen se asocian tanto con la ruta de señalización intracelular de las MAP Kinasas<sup>104</sup> como de Akt<sup>229</sup>. Las alteraciones activadoras más frecuentes se localizan en los codones 12, 13 y 61; estas mutaciones producen un aumento de la capacidad intercambiadora de nucleótidos de guanina de la proteína, manteniendo a la proteína en un estado de activación permanente que aumenta la señalización intracelular<sup>102</sup>.

El estudio de 42 tumores de endometrio nos ha permitido identificar 6 casos (14,3%) portadores de mutaciones en los codones 12 y 13, pero ninguna en el codón 61, hecho que concuerda con los estudios realizados por otros grupos<sup>11,12,239</sup>. Todas las mutaciones estaban presentes en tumores de naturaleza endometriode y en un tumor mixto. No hemos encontrado ninguna mutación en los tumores de tipo II. Si se toma únicamente como referencia los tumores de tipo I, la incidencia de aparición de mutaciones en KRAS asciende al 17,9% similar a la incidencia descrita por otros grupos<sup>103,107</sup>.

Al igual que actualmente se plantea que el mecanismo de PTEN y PI3K pueda estar relacionado en la patogénesis molecular del carcinoma endometrial<sup>235,231</sup>, también se ha intentado relacionar las alteraciones aparecidas en KRAS, con las identificadas en estos dos genes. Aunque hay cierta controversia en los resultados<sup>240</sup>, parece que podría existir una convergencia entre las alteraciones ocurridas en PTEN y KRAS<sup>132,239</sup>, y un efecto excluyente con las de PIK3CA<sup>240</sup>. En nuestro trabajo

hemos observado que el 50% de los casos portadores de mutaciones en el gen KRAS presentan también mutaciones en el gen PTEN, mientras que no existe ningún caso con mutaciones en los genes KRAS y PIK3CA (tablas 52a y 52b), lo cual concuerda con resultados previos en otros trabajos<sup>241</sup>. Esta observación refuerza la hipótesis de que las mutaciones en los genes PTEN y KRAS son eventos iniciales en el desarrollo del cáncer de endometrio mientras que las mutaciones en el gen PIK3CA ocurren en estadios más tardíos<sup>231</sup>.

Por otro lado, las alteraciones encontradas en KRAS podrían contribuir al efecto patogénico de las inactivaciones monoalélicas de PTEN, al igual que en su día se propuso este hecho para PIK3CA<sup>231</sup>. Si analizamos exclusivamente los tumores tipo I (endometrioides), que son los tumores donde aparecen con mayor frecuencia alteraciones tanto en PTEN, PIK3CA y KRAS<sup>9,11,87,88</sup>, el 85,7% de los casos muestran mutación en alguno de estos genes, lo que supone casi el total de los tumores de endometrio tipo I.

En nuestro trabajo también hemos incluido el estudio del gen BRAF, que codifica una serina/treonina kinasa. Esta actúa inmediatamente después de KRAS en la ruta de activación de las MAP Kinasas, y tiene una importancia considerable en los procesos de desarrollo tumoral<sup>108</sup>, encontrándose mutado en varios tipos de tumores como son los melanomas<sup>109</sup>, cáncer tiroideo<sup>242</sup>, y cáncer de colon<sup>243</sup>. Se ha sugerido que las mutaciones entre los genes KRAS y BRAF son excluyentes<sup>113</sup>, por lo que hipotetizamos que los tumores con mutaciones en PTEN y sin mutaciones en KRAS podrían presentar mutaciones en este locus. El estudio de los exones 11 y 15 del gen BRAF, en los que han sido descritas la mayoría de las mutaciones en este gen y que, además, contiene la variante p.V600E que se ha asociado con el desarrollo de algunos tumores<sup>111</sup>, no mostró ninguna mutación patogénica, por lo que debemos concluir que mutaciones en el gen BRAF no participan en el desarrollo de los tumores de endometrio incluidos en nuestro trabajo. El caso 15 mostró una alteración en el intrón 15 del gen BRAF, no descrita con anterioridad, posiblemente de carácter no patogénico ya que se localiza fuera de las secuencias consenso de procesamiento de RNA (tabla 39).

## 4. ESTUDIO DEL GEN CTNNB1

La proteína  $\beta$ -catenina es uno de los componentes de las unidades de mantenimiento de la arquitectura celular a través de las interacciones cadherina-catenina<sup>114</sup> y un importante intermediario en la vía de señalización intracelular de Wnt<sup>115</sup>. Las mutaciones patogénicas en el exón 3 del gen CTNNB1 producen una estabilización de la proteína que evita su degradación<sup>117</sup> y promueve su acumulación en el núcleo donde ejerce un papel activador de la transcripción muy importante, favoreciendo los procesos relacionados con la tumorigénesis endometrial<sup>122</sup>.

El análisis del exón 3 del gen CTNNB1 en 42 tumores de endometrio nos permitió identificar en ocho casos (19%) seis mutaciones, todas ellas ya descritas en anteriores trabajos y caracterizadas como patogénicas. Al igual que las alteraciones en los genes PTEN, PIK3CA y KRAS, las mutaciones estaban presentes en carcinomas de tipo I y en un carcinosarcoma con diferenciación endometriode. Los tumores que exhiben estas alteraciones en el gen CTNNB1 fueron de grado bajo y buen pronóstico.

La relación que guardan las alteraciones encontradas en el gen CTNNB1 con otros eventos patogénicos de los carcinomas tipo I ha suscitado cierta controversia. Trabajos previos sugieren que las alteraciones en los genes PTEN y KRAS son excluyentes con las del gen CTNNB1<sup>16,41,123</sup>, aunque trabajos más recientes no han podido confirmarlo<sup>240,244</sup>. En nuestro estudio, sólo hemos encontrado un caso con mutaciones en los genes KRAS y CTNNB1 (caso 36, tabla 53). Sin embargo, la posible relación excluyente entre las mutaciones de los genes PTEN y CTNNB1 no está definida. El 75% de las alteraciones encontradas en el gen CTNNB1 aparecen conjuntamente con alteraciones en PTEN (tabla 53), porcentaje superior a lo publicado hasta el momento por otros grupos<sup>1,41,240,244</sup>.

Como también se observa en la tabla 53, la mitad de los casos con mutaciones en el gen CTNNB1 presentaban mutaciones en el gen PIK3CA (50%), valor significativamente alto y no estudiado en trabajos anteriores. Además, estos casos también presentaban mutaciones en el gen PTEN.

**Tabla 53, Alteraciones en el gen CTNNB1, donde se muestra si en los mismos casos de carcinoma endometrial aparecen también alteraciones en los genes PTEN, PIK3CA y KRAS. (H) muestra las alteraciones encontradas en homocigosis.**

Caso	$\beta$ -catenina	PTEN	PIK3CA	KRAS
5	D32N	P95T ; Q110X; A126T	No	No
9	Amplificación	No expresión	Amp/Y1021H	No
11	S37F	I253fsX2; L320S	M1043V	No
13	T41A	G132D; I253fsX2	N1044K	No
23	G34R	G132A; G165R	H1047R	No
25	T41A	No	No	No
36	G34E	R233X (H)	No	G13D
37	S37F	D300fsX6	H1047R	No
42	S33C	No	No	No

## 5. ESTUDIO DEL GEN TP53

La proteína p53 participa en procesos importantes para el mantenimiento de la integridad celular como la regulación del ciclo celular, la reparación de DNA o la apoptosis<sup>133,143</sup>.

En nuestro trabajo hemos encontrado 9 mutaciones patogénicas en el gen TP53 en 10 tumores tipo I, tipo II y carcinosarcomas. La incidencia de estas alteraciones en los tumores de tipo I ha sido de 7,1%, todos ellos de grado alto (grado 2 y 3), lo cual coincide con lo referido en trabajos previos<sup>12</sup>; en los tumores de tipo II y en los carcinosarcomas, la incidencia ha sido de un 50%, inferior a lo publicado previamente en otros trabajos<sup>17,132,225</sup>.

Aunque p53 es una proteína supresora de tumores, no es necesaria en su caso una inactivación bialélica para producir el efecto patogénico ya que estas mutaciones actúan como dominantes negativas e inactivan el producto del alelo germinal cuando se agrupan en forma de tetrámero<sup>136,150</sup>. Aún así, en los carcinomas endometriales han sido descritas, además de mutaciones inactivantes, pérdidas de heterocigosidad en el locus de TP53<sup>17,19</sup>. En nuestro trabajo hemos encontrado dos pacientes (casos 12 y 21) que presentaban mutaciones en homocigosis, lo que sugería una inactivación bialélica del gen, bien por mutación o por una pérdida de heterocigosidad encubierta. Ante la ausencia de sangre periférica, decidimos cuantificar la región del gen de p53 en estos dos casos para dilucidar la causa. Los estudios de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa mostraron ausencia de pérdida de material genético, por lo que debemos concluir que existían dos alelos con la misma mutación. Del mismo modo, el caso 28 mostró dos mutaciones inactivantes de p53 (c.458\_459insG, c.832C>T).

Se ha descrito que las mutaciones en los genes PTEN y TP53 suelen ser excluyentes<sup>239</sup> mientras que pueden coexistir mutaciones en los genes TP53 y PIK3CA<sup>245</sup>. En nuestro trabajo hemos encontrado dos casos con mutaciones puntuales en los genes PTEN y TP53, un carcinoma endometriode y un carcinosarcoma, ambos de grado alto (casos 27 y 28) (tabla 52b), mientras que un único caso, un tumor mixto (caso 10, tabla 52a), mostraba mutaciones en los genes TP53 y PIK3CA. Estos resultados sugieren que ambas asociaciones son poco frecuentes aunque no excluyentes.

## 6. ESTUDIO DEL GEN CDH1

El gen de la E-Cadherina (CDH1) codifica una proteína de adhesión celular que se expresa en células epiteliales y participa en el mantenimiento de la polaridad celular y la arquitectura tisular<sup>124</sup>. Las mutaciones en este gen supresor de tumores se han asociado con invasión tumoral y metástasis<sup>125</sup>, confiriendo a los tumores peor pronóstico.

El estudio de este gen se ha abordado por otros grupos principalmente por análisis inmunohistoquímico, observándose una disminución de la expresión en el 80-90% de los tumores endometriales tipo II y el 10-20% de los tumores tipo I<sup>34,131</sup>. En nuestro trabajo hemos encontrado dos casos (casos 19 y 30) que eran portadores de mutaciones puntuales en el gen CDH1 (4,7%). La discrepancia entre el pequeño porcentaje de tumores portadores de mutaciones en este gen y el elevado número de tumores con disminución de la expresión descritos por otros grupos sugiere que los mecanismos patogénicos más relevantes de inactivación de la E-Cadherina en tumores de endometrio corresponden a pérdidas alélicas y fenómenos de hipermetilación del promotor del gen<sup>22</sup>.

En los casos 19 y 30 hemos identificado dos mutaciones de tipo “missense” (de cambio de sentido) no descritas hasta el momento y localizadas en la secuencia que codifica el precursor proteico de E-Cadherina (tabla 31). En esta región se han descrito sobre todo mutaciones de parada de la traducción (“nonsense”) y deleciones/inserciones tuncantes (“framshift”), siendo menos frecuentes las mutaciones “missense” patogénicas<sup>246</sup>. El hecho de que esta región no forme parte de la proteína madura y, por consiguiente, no interfiera en la funcionalidad de la proteína, sugiere que estas mutaciones pueden no ser relevantes. Sin embargo, estas mutaciones podrían interferir en el procesamiento post-traducciona de este pro-péptido, haciendo que se forme una proteína aberrante y no funcional<sup>278</sup>.

El estudio bioinformático de estas variantes predijo que ambos cambios son neutrales (tabla 32), pero este tipo de programas no están desarrollados para el análisis de regiones precursoras. Igualmente, estas regiones no suelen estar conservadas a lo largo de la evolución pues suelen aparecer en especies ya evolucionadas<sup>248</sup>.

Las alteraciones patogénicas en el gen CDH1 se han descrito principalmente en carcinomas endometriales no endometrioides (serosos y de células claras) y suelen conferir peor pronóstico<sup>21,126,127,129</sup>. En este trabajo, la mutación “missense” p.V85I se localizó en un tumor de tipo histológico endometrioide y de bajo grado (caso 19) que presentaba también una mutación patogénica en el gen PTEN. El caso 30, portador de la mutación p.R90Q, corresponde a un tumor seroso que porta otra alteración patogénica en p53. Estos resultados sugieren que, además de poco frecuentes, las mutaciones puntuales en el gen CDH1 podrían aparecer tanto en tumores de tipo I como de tipo II, aunque son necesarios estudios posteriores para corroborarlo.

## 7. ESTUDIO DEL GEN CDKN2A

La proteína p16 inhibe específicamente el complejo CDK-ciclina D, un importante regulador del ciclo celular. Las alteraciones en esta proteína desregulan el proceso de división celular y ciclo celular, y están implicadas en el desarrollo del cáncer de endometrio<sup>141</sup>. Se ha descrito una disminución de expresión de esta proteína en tumores<sup>249</sup>.

El análisis del gen CDKN2A, que codifica la proteína p16, en 42 tumores de endometrio mostró una mutación de significado desconocido en el exón 2 (c.217G>A) cuyo posible efecto patogénico todavía no ha sido comprobado. Esta mutación aparece en un tumor de tipología mixta (caso 10, tabla 52a), donde convergen elementos tumorales de tipo I (endometrioide de alto grado) y de tipo II (células claras). El estudio bioinformático de esta mutación mostró un efecto neutral para el cambio A73T (tabla 35). Además, el estudio interespecies mostró un bajo grado de conservación, encontrándose el aminoácido mutado, presente en alguna de las especies analizadas (figura 36), por lo que podemos concluir que se trata de una mutación no patogénica.

Nuestros resultados confirman la ausencia de mutaciones puntuales en el gen CDKN2A en tumores de endometrio. Dado que no hemos realizado el estudio inmunohistoquímico de expresión proteica en nuestras muestras, no podemos analizar la frecuencia de alteraciones de esta proteína en tumores endometriales.

## 8. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN REPARADORA DEL DNA EN CARCINOMA ENDOMETRIAL

La inestabilidad de microsatélites (MSI) constituye un indicador de la existencia de fallos en los mecanismos de reparación del DNA, principalmente en los sistemas encargados de la reparación de los emparejamientos erróneos o “mismatch repair system”<sup>155</sup>. Los tumores que presentan MSI son proclives a acumular mutaciones que desestabilizan o inactivan genes relacionados con el crecimiento y la supervivencia celular, y de esta manera, conducen a la célula al desarrollo del tumor por diferentes mecanismos<sup>162</sup>.

La inestabilidad de microsatélites es una característica asociada a los tumores endometriales de tipo I que se presenta en etapas tempranas del desarrollo tumoral, apareciendo con una incidencia elevada en las lesiones hiperplásicas atípicas<sup>5,6</sup>. Esta particularidad sugiere que algunas de las mutaciones que aparecen en estos tumores, como las ocurridas en los genes PTEN y KRAS<sup>250,251</sup>, podrían ser consecuencia de fallos en la reparación de DNA.

Nosotros hemos podido estudiar la inestabilidad de microsatélites en 11 casos, observando que en 7 de ellos (63,6%) existía MSI, incidencia que se encuentra ligeramente por encima de lo descrito en anteriores trabajos<sup>4,5,6</sup>. El estudio de 8 secuencias marcadoras reveló que la mayoría de los tumores con MSI eran moderadamente inestables (M-MSI), presentando 3 y 4 marcadores afectados, característica común de los tumores endometriales esporádicos<sup>155</sup>. De los siete casos con MSI, cuatro tumores eran de tipo endometriode, uno era un tumor seroso (tipo II), uno era un tumor de tipo mixto y el último un carcinosarcoma.

La inestabilidad de microsatélites puede asociarse a carcinomas de endometrio esporádicos o estar incluida dentro de un síndrome más complejo como es el síndrome de Lynch<sup>47</sup>. En los casos del síndrome de Lynch suele ser inestable el marcador BAT26, hasta el punto de que algunos autores sugieren que el estudio de este marcador sería suficiente para demostrar la inestabilidad en estos casos<sup>252</sup>. Como mostramos en la tabla 41, sólo uno de los tumores de endometrio estudiados por nosotros presenta inestabilidad en BAT26, lo que sugiere que los tumores de endometrio incluidos en nuestro trabajo son esporádicos y no forman parte de un síndrome de Lynch.

Los casos donde fueron identificados los fenómenos de MSI, mostraron también mutaciones patogénicas en los genes PTEN, PIK3CA, KRAS y TP53 aunque ninguno de los casos presentó mutaciones en todos los genes (tabla 54). La coexistencia de MSI y mutaciones en otros genes ya ha sido referido en anteriores trabajos<sup>1,18</sup>. Se ha postulado que el gen PTEN es una de las dianas de las deficiencias en la reparación del DNA (fenotipo mutador), lo que explicaría la elevada incidencia de mutaciones en este gen en tumores endometrioides<sup>250</sup>. Sin embargo, también se ha propuesto que la presencia de MSI y la inactivación de PTEN, de aparición temprana en el desarrollo de los carcinomas endometriales, son eventos simultáneos durante el proceso de diferenciación a carcinoma endometriode<sup>244</sup>. Dado que de 7 casos con inestabilidad de microsatélites, sólo hemos encontrado mutación somática en el gen PTEN en cuatro casos, nuestros resultados sugieren que las mutaciones en el gen PTEN serían independientes de la MSI.

**Tabla 54, Relación de alteraciones genéticas en los casos de carcinoma endometrial con MSI.**

Caso	Tipo	PTEN	PIK3CA	KRAS	TP53
1	I	-	-	-	R213Q
4	I	Q214_K221del	G451_G460del	-	-
17	Sarcoma	-	-	-	C176fsX180
22	I	R130P	-	-	-
24	I y II	R130G	-	Codón 13	-
26	II	-	-	-	-
38	I	R130G	-	-	-

No obstante, la aparición en tres casos con MSI de mutaciones patogénicas que afectan al codón 130 de PTEN, nos permite especular con que ese codón podría ser una posición proclive a los errores de replicación del DNA, aunque estudios previos han podido corroborar esta falta de asociación<sup>250</sup>.

Dado que la inestabilidad de microsatélites se asocia con pérdida de la función de alguno de los genes reparadores de emparejamientos erróneos de DNA durante la replicación, decidimos determinar la organización de los genes hMLH1 y hMSH2, que son los que se encuentran mutados con mayor frecuencia en casos de síndrome de Lynch. Nuestro estudio mostró dos casos (casos 9 y 31) portadores de mutaciones patogénicas en el gen hMLH1<sup>253,254</sup> y un caso (caso 10) con una mutación de significado desconocido en el gen hMSH2. En ninguno de estos casos pudimos realizar el estudio de MSI al no disponer de material procedente de tejido no tumoral. El caso 9 presentaba una mutación en PIK3CA, mientras que el caso 31 no presentaba mutaciones patogénicas en ninguno de los genes estudiados; el caso 10 presenta mutaciones en los genes TP53, CDKN2A y PIK3CA.

La mutación encontrada en hMSH2 corresponde a una mutación que describimos por primera vez en este trabajo. Los estudios bioinformáticos realizados sobre este cambio localizado en el dominio de unión a DNA (c.460G>A, p.A154R) muestran predicciones contradictorias, posiblemente debido al bajo grado de conservación que presenta el aminoácido sujeto a cambio. Sin embargo, dicho cambio no aparece como tolerado en ninguna de las especies estudiadas, con lo que no podemos descartar la posible patogenicidad del aminoácido arginina. Además, este análisis bioinformático predice también que este cambio no contiene secuencias diana de proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA (proteínas SR) y tampoco contiene secuencias de anillamiento para miRNAs que pudieran regular la expresión del gen.

En nuestro trabajo abordamos por primera vez el estudio de grandes reordenamientos cromosómicos en los loci hMLH1 y hMSH2 en casos de cáncer de endometrio esporádico. Como se observa en la tabla 48 hemos encontrado cuatro casos con reordenamientos (dos tumores tipo I y dos carcinosarcomas). El caso 9, portador de una mutación patogénica en hMLH1, también presentaba una amplificación del gen hMLH1 (tabla 48, figura 43a). El caso 17 es portador de una delección del gen hMLH1; este caso presentaba MSI (tabla 41) y una mutación patogénica en el gen TP53 (tabla 52a). El caso 15 presentaba una amplificación de los exones 8, 9 y 10 del gen hMSH2, que es la región implicada en la interacción con las proteínas hMSH3 y hMSH6<sup>255</sup>, y mutaciones en el gen PTEN; mientras que el caso 25 presentaba una amplificación completa del gen hMSH2 y una mutación en el gen CTNNB1. En estas alteraciones encontradas, predominan las amplificaciones sobre las delecciones, hecho menos frecuente que lo descrito en otras series de casos hereditarios<sup>256,257</sup>.

La naturaleza somática de estas alteraciones no pudo ser comprobada por falta de material germinal en todos los casos excepto en uno (caso 17) donde la delección del gen hMLH1 corresponde a una verdadera pérdida de heterocigosidad del locus.

En resumen, en nuestro estudio hemos caracterizado 6 casos de carcinoma endometrial esporádico que presentan mutaciones somáticas en los genes reparadores. La falta de DNA no tumoral nos impide caracterizar mejor estos casos. No obstante, la ausencia de antecedentes familiares de otros tumores incluidos en el síndrome de Lynch, nos inclina a pensar que estamos ante cánceres esporádicos y no ante síndrome de Lynch.

Hasta el momento la mayoría de los trabajos sobre genes reparadores en carcinoma endometrial esporádico han analizado la expresión proteica de estos genes mediante técnicas inmunohistoquímicas<sup>155,258</sup>, por lo que son poco los estudios que aportan datos sobre la presencia de mutaciones patogénicas en estos genes. Los casos en los que hemos encontrado mutaciones somáticas (mutaciones puntuales y grandes reordenamientos) en los genes hMLH1 y hMSH2 presentan una incidencia de mutación en los oncogenes y genes supresores de tumores incluidos en nuestro trabajo similar a la de los tumores que no son portadores de este tipo de mutaciones, por lo que podemos deducir que la inestabilidad debe de afectar a otros loci que no hemos estudiado.

Con el fin de completar el estudio de los genes reparadores, y dado que en los tumores esporádicos se ha descrito que su expresión puede estar disminuida por fenómenos de hipermetilación de sus regiones promotoras, analizamos los patrones de metilación de los promotores de los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6. Aunque la muestra de partida es bastante heterogénea en cuanto a tipo tumoral, estos resultados corroboran la importante implicación de la hipermetilación de la región promotora del gen hMLH1 en la carcinogénesis endometrial (38,1% de los casos), sobre todo de tipo endometriode<sup>162,259</sup>. Además, estos resultados sugieren que, a pesar de que hMSH6 tiene una importante implicación en la patogénesis tumoral de endometrio esporádica<sup>47,162,260</sup>, los fenómenos de hipermetilación están menos representados que en hMLH1 (26,2% de los casos) y de forma similar a la de hMSH2 (21,4% de los casos). Como mostramos en la tabla 42, la mayoría de los casos que presentan inestabilidad de microsatélites (casos 1, 4, 17 y 24) no presentaron metilación en las regiones promotoras de los genes reparadores, por lo que la inestabilidad debe de ser consecuencia de alteraciones en otros genes o de otros mecanismos de inactivación génica.

En nuestro trabajo hemos intentado relacionar las alteraciones en los genes pertenecientes al sistema MMR con el aumento de la tasa de aparición de mutaciones en otros genes de susceptibilidad al desarrollo del carcinoma endometrial, como son PTEN en los tumores de tipo I y TP53 en los tumores de tipo II. Esta relación mostró diferencias entre ambos genes a pesar que los casos con estas alteraciones

también suelen presentar MSI<sup>250,253,258</sup>. Mientras que los casos con mutaciones patogénicas en el gen PTEN muestran una alta coincidencia con los patrones de metilación de los genes hMLH1, sobre todo, y hMSH2 y hMSH6 (13 casos de 24); los casos con mutaciones patogénicas en el gen TP53 muestran ausencia de patrones de hipermetilación en genes reparadores, (un único caso de nueve, caso 33). Lo que confirma la presencia de una fuerte relación entre mutaciones en el gen PTEN y los patrones de hipermetilación del gen hMLH1. Llama la atención que los casos que presentaban una fuerte hipermetilación del promotor del gen en hMLH1 (casos 6, 8, 9, 13 14 y 39) presentaban mutaciones patogénicas en el gen PTEN excepto en un caso (caso 9) que no es portador de mutaciones en el gen pero si ha mostrado una ausencia de expresión de proteína.

## 9. IMPLICACIONES DE HDAC EN CARCINOMA ENDOMETRIAL

Las proteínas HDAC participan en el control de la expresión génica produciendo la desacetilación de histonas, lo que favorece el mantenimiento del DNA en un estado de mayor compactación que, de forma general, dificulta el acceso de los distintos factores de transcripción<sup>176</sup>. Además, interviene en el control de la expresión génica interaccionando con diferentes complejos que participan en la regulación de la transcripción, así como en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación, etc<sup>180,181,182,183</sup>. Se ha observado que estas proteínas presentan diferente expresión dependiendo del tejido y del tipo tumoral<sup>187,188,189</sup>. Así, en endometrio sano, la expresión de las HDAC de clase I oscila durante las diferentes fases del ciclo menstrual<sup>178</sup>.

Nosotros hemos estudiado mediante Western blot la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en 38 muestras de carcinoma endometrial observando expresión de las tres proteínas en la mitad de los tumores (54,8%), de los cuales 13 corresponden a carcinomas tipo I (46,4% de los casos), 3 a carcinomas tipo II (50% de los casos) y 7 a sarcomas y tumores mixtos (87,5% de los casos). En cinco casos hemos observado ausencia de expresión de las proteínas HDAC1 y HDAC3, acetilasas que han sido descritas asociadas con la regulación de la expresión de receptores hormonales<sup>178</sup>.

Estudios previos realizados en otros tumores han relacionado la ausencia de expresión de la proteína HDAC1 con un peor pronóstico del cáncer y una disminución de la supervivencia<sup>261</sup>. En nuestro trabajo, la falta de datos clínicos no nos ha permitido poder determinar este aspecto.

Además de estudiar la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, también hemos analizado la organización del exón 1 del gen HDAC2 en 42 tumores de endometrio, encontrando 6 casos que presentan mutaciones. El grupo de Esteller ha descrito una mutación en una secuencia de poliA (A<sub>9</sub>) localizada en este exón del gen HDAC2 que modifica la fase de lectura y produce una proteína truncada principalmente en tumores con inestabilidad de microsatélites<sup>191</sup>. Nosotros describimos por primera vez un caso en el que ambos alelos presentaban mutaciones en esta secuencia (caso 9, figura 50).

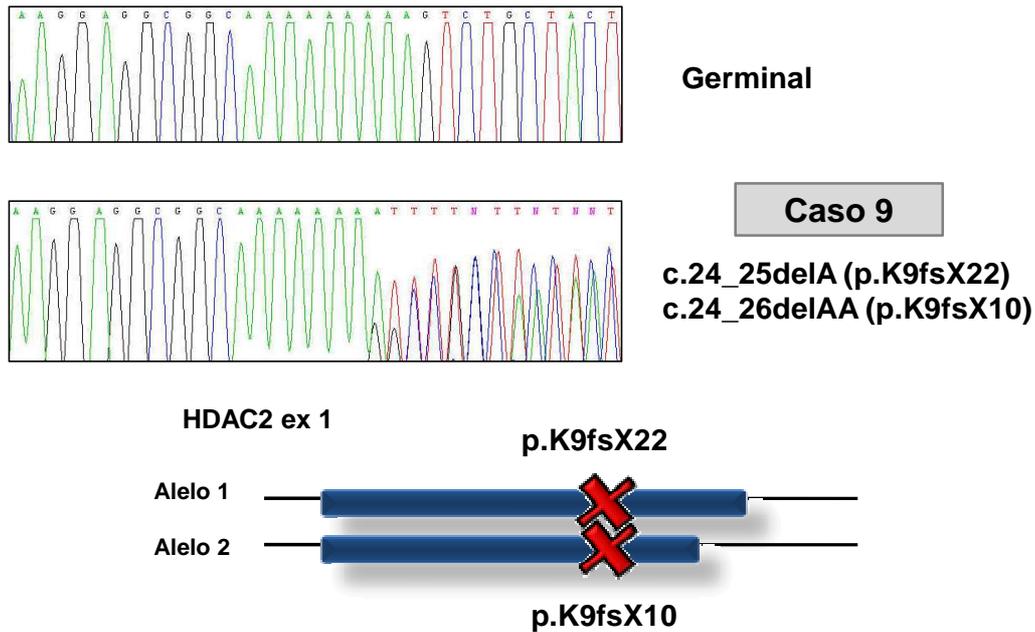


Figura 50, Secuencia del exón 1 del gen HDAC2 en el caso 9 (c.24\_25delA y c.24\_26delAA). Diagrama con la repercusión de los cambios en la proteína.

Los seis casos con mutaciones truncantes en el gen de HDAC2 eran portadores de alteraciones en los genes pertenecientes a los mecanismos de reparación de DNA (tabla 55), dos casos presentaban MSI, tres casos presentaban hipermetilación del promotor hMLH1 y dos casos más eran portadores de mutaciones patogénicas en el gen hMLH1, lo que confirma que las mutaciones en esta región del gen HDAC2 se asocian con alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA.

Tabla 55, MSI y alteraciones encontradas en los genes hMLH1 y hMSH2 relacionadas con los casos que presentan mutaciones en el gen HDAC2.

Caso	MSI	Metilación	hMLH1	hMSH2
9	¿?	hMLH1 (++)	c.1852_1853AA>GC/amplificación	-
22	+	hMLH1 (+)	-	-
24	+	-	-	-
31	¿?	-	c.306+5G>A (splicing)	-
39	¿?	hMLH1 (++)	-	-
40	¿?	-	-	-

Aunque estudios previos realizados en cáncer colorrectal sugerían que la presencia de la mutación truncante en el exón 1 de HDAC2 podría dar lugar a la pérdida de expresión de proteína<sup>191</sup>, nuestro trabajo muestra que las líneas celulares de carcinoma endometrial AN3CA (carcinoma endometrioide) y SKUT-1 (leiomioma), portadoras de esta mutación, no pierden la expresión de la proteína<sup>191</sup>. Nosotros hemos observado que en tres de los seis tumores con la mutación truncante en el gen HDAC2 se observa la pérdida de expresión de proteína y que no todos los casos con pérdidas de expresión de HDAC2 presentan mutaciones en esta región. La causa de la falta de expresión en estos casos, a pesar de la presencia de uno de los alelos germinales, podría estar determinada por algún efecto inactivante del gen no estudiado todavía como pérdidas alélicas o hipermetilación de su promotor.

En resumen, la formación de carcinoma de endometrio esporádico endometrioide surge por acumulación de alteraciones somáticas en diversos genes supresores de tumores y oncogenes, entre las que se encuentran mutaciones en el gen PTEN, que son las que aparecen con mayor frecuencia. Mutaciones en los genes PIK3CA, KRAS y CTNNB1, también contribuyen al desarrollo de tumores endometriales. Asimismo, se ha comprobado que hay una marcada relación entre las mutaciones en el gen PTEN y ciertas alteraciones en los mecanismos de reparación de DNA por el sistema MMR del DNA,

entre las que destaca la hipermetilación del promotor del gen hMLH1. Por otro lado, los carcinomas endometriales esporádicos no endometrioides no suelen mostrar mutaciones en los genes PTEN, PIK3CA, KRAS o CTNNB1 de forma frecuente, pero sí en el gen TP53. En estos tumores, las alteraciones del mecanismo MMR no son tan frecuentes, sugiriendo que las mutaciones en la proteína p53 no son consecuencia de defectos en la reparación de DNA. Los carcinosarcomas, a pesar de tener dos componentes tumorales, han demostrado una gran semejanza con los carcinomas de naturaleza endometriode. Esta semejanza se aprecia por las alteraciones moleculares que presentan ya que muchas de ellas coinciden con las aparecidas en estos tumores.

## ***ConclusiOnEs***

1. Los resultados presentados en este trabajo confirman la posibilidad de discriminar los carcinomas de endometrio en función de su perfil genético, encontrándose mutados los genes PTEN, PIK3CA, KRAS y CTNNB1 en los tumores endometriales de tipo I, TP53 en los de tipo II y PTEN y TP53 en los carcinosarcomas.
2. En este trabajo describimos nuevas mutaciones en los genes PTEN y PIK3CA, descartando la existencia de mutaciones recurrentes. La presencia de mutaciones en ambos genes en un mismo tumor, junto con la caracterización en un tumor con una mutación en la que se pierde la función de PIK3CA, sugiere que estos genes pueden actuar por vías diferentes en el desarrollo tumoral.
3. Las alteraciones en los genes implicados en la reparación de DNA son eventos frecuentes en los carcinomas de endometrio tipo I. La observación de que las mutaciones en el gen PTEN se asocian sobre todo con hipermetilación de los promotores y no con mutaciones en genes reparadores de DNA o inestabilidad de microsatélites, abre la posibilidad de que existan dos vías en el desarrollo tumoral relacionadas con la reparación del DNA: una en la que la hipermetilación de los promotores de genes reparadores favorecería las mutaciones secundarias en otros loci, principalmente en el gen PTEN, y una segunda en la que las alteraciones somáticas de los genes reparadores (mutaciones puntuales o grandes reordenamientos) se producirían de manera simultánea a las mutaciones en otros genes como el gen PTEN.
4. Las deacetilasas de histonas (HDAC1, HDAC2 y HDAC3) presentan una expresión variable en tumores de endometrio no encontrando relación ni con la presencia de mutaciones somáticas en oncogenes y genes supresores de tumores ni con alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA
5. Nuestros resultados confirman que la mutación truncante en la secuencia poliA del exón 1 del gen HDAC2 se asocian con alteraciones en el sistema de reparación del DNA.

1. The results presented in this study confirm that the genetic profile of endometrial carcinoma can differentiate between mutations in PTEN, PIK3CA, KRAS and CTNNB1 genes for type I tumors, TP53 gene for type II tumors and PTEN and TP53 for carcinosarcomas.
2. In this study, we have characterized novel mutations in PTEN and PIK3CA genes, rejecting the existence of recurrent mutations. The observation of mutations in both genes in the same tumors, as well as a truncating mutation in PIK3CA that implicate loss of protein function, suggest that these genes act by different pathways in tumor development.
3. Genetic alterations in DNA repair genes are associated with type I endometrial carcinoma. As we observed, PTEN mutations are related to promoter hypermethylation of DNA repair genes but not to mutations in these genes or microsatellite instability, so, it is probable that two pathways exist in tumor development: first, promoter hypermethylation of DNA repair genes increase secondary mutations in different loci, primarily in PTEN gene; and second, somatic mutations in DNA repair genes (punctual mutations or gross rearrangements) appear simultaneously with mutations in other genes such as PTEN.
4. Histone deacetylases (HDAC1, HDAC2 and HDAC3) display variable expression in endometrial tumors that are not related to somatic mutations in oncogenes, tumor suppressor genes or DNA repair gene alterations.
5. Our results confirm that the truncating mutation in A<sub>9</sub> sequence of exon 1 of HDAC2 gene is related to mismatch repair system abnormalities.

## ***Bibliografía***



1. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, González M, Demajo S, Colas E, Llauro M, Alazzouzi H, Planaguma J, Lohmann MA, Garcia J, Castellvi S, Cajal J, Gil-Moreno A, Xercavins J, Alameda F, Reventos J: Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. **J Steroid Biochem Mol Biol** 108: 221-229, 2008.
2. Gruber SB, Thompson WD: A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 5: 41-417, 1996.
3. Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 15: 10-17, 1983.
4. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J: Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. **Hum Pathol** 29:1160-64, 1998.
5. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tourgeman D, Zheng J, Shibata D: Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 86:1216-21, 1994.
6. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J: Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. **Cancer Res** 53: 5100-103, 1993.
7. Han SY, Kato H, Kato S, Suzuki T, Shibata H, Ishii S, Shiiba K, Matsuno S, Kanamaru R, Ishioka C: Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. **Cancer Res** 60: 3147-151, 2000.
8. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C: Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst** 92: 924-930, 2000.
9. Sansal I, Sellers WR: The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. **J Clin Oncol** 22: 2954-963, 2004.
10. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK: Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. **Cancer Res** 54: 1604-607, 1994.
11. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG, Garrett CT: K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. **Gynecol Oncol** 63: 238-246, 1996.
12. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L: The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetics pathways. **Cancer** 88: 814-824, 2000.
13. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kohler MF, Berchuck A: Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. **Cancer Res** 53:1906-10, 1993.
14. Kobayashi K, Sagae S, Nishioka Y, Tokino T, Kudo R: Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas. **Jpn J Cancer Res** 90: 55-59, 1999.
15. Machin P, Catusus L, Pons C, Munoz J, Matias-Guiu X, Prat J: CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. **Hum Pathol** 33: 206-212, 2002.
16. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M: Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. **Cancer Res** 59:3346-51, 1999.

17. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L: p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. **Am J Pathol** 150: 177-185, 1997.
18. Lax SF: Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. **Virchows Arch** 444: 213-223, 2004.
19. Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, Sorolla A, Llecha N, Matias-Guiu X: Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 27: 305-317, 2008.
20. Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Herrman K, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R: p16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 111: 365-371, 2008.
21. Yalta T, Atay L, Atalay F, Caidere M, Gonultas M, Ustin H: E-Cadherin expression in endometrial malignancies: comparison between endometrioid and non endometrioid carcinomas. **J Int Med Res** 37: 163-168, 2009.
22. Widschwendter A, Ivarsson L, Blassnig A, Müller HM, Fiegl H, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M: CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. **Int J Cancer** 109: 163-169, 2004.
23. Volgestein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alteration during colorectal-tumor development. **N Eng J Med** 319: 535-532, 1988.
24. Prat J: Pronostic parameters of endometrial carcinoma. **Hum Pathol** 35: 649-662, 2004.
25. Kohorn EI: The new FIGO 2000 staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic disease: description and critical assessment. **Int J Gynecol Cancer** 11: 73-77, 2001.
26. Silverberg SG: Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma. **Mod Pathol** 13: 309-327, 2000.
27. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, Advani H: The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. **Cancer** 68: 2293-302, 1991.
28. Brown L: Pathology of uterine malignancies. **Clin Oncol** 20: 433-447, 2008.
29. Tobon H, Watkins GJ: Secretory adenocarcinoma of the endometrium. **Int Gynecol Pathol** 4: 328-335, 1985.
30. Christopherson WM, Alberhasky RC, Connelly PJ. Carcinoma of the endometrium: I. A clinicopathologic study of clear-cell carcinoma and secretory carcinoma. **Cancer** 49: 1511-1523, 1985.
31. Haibach H, Oxenhandler RW, Luger AM. Ciliated adenocarcinoma of the endometrium. **Acta Obstet Gynecol Stan** 64: 457-462, 1985.
32. Melhem MF, Tobon H: Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinico-pathological review of 18 cases. **Int J Gynecol Pathol** 6: 347-355, 1987.
33. Qui W, Mittal K. Comparison of morphologic and immunohistochemical features of cervical microglandular hyperplasia with low-grade mucinous adenocarcinoma of the endometrium. **Int J Gynecol Pathol** 22: 261-265, 2003.

34. Fadare O, Zheng W: Insights into the endometrial serous carcinogenesis and progressions. **Int J Clin Exp Pathol** 2: 411-432, 2009.
35. Cameron RI, McCluggage WG: Extensive psammomatous calcification of the uterus and cervix associated with a uterine serous carcinoma. **J Clin Pathol** 57: 888-890, 2003.
36. Abeler VM, Kjørstad KE: Clear cell carcinoma of the endometrium: a histopathological and clinical study of 97 cases. **Gynecol Oncol** 40: 207-217, 1991.
37. Malpica A, Tornos C, Burke TW, Silva EG: Low-stage clear-cell carcinoma of the endometrium. **Am J Surg Pathol** 19: 769-774, 1995.
38. Goodman A, Zukerberg LR, Rice LW, Fuller AF, Young RH, Scully RE: Squamous cell carcinoma of the endometrium: a report of eight cases and a review of the literature. **Gynecol Oncol** 61: 54-60, 1996.
39. Huntsman DG, Clement PB, Gilks CB, Scully RE: Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases. **Am J Surg Pathol** 18: 364-375, 1994.
40. Seidman JD, Chauhan S. Evaluation of the relationship between adenosarcoma and carcinosarcoma and a hypothesis of the histogenesis of uterine sarcomas. **Int J Gynecol Pathol** 22: 75-82, 2003.
41. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Munoz J, Arguelles R, Machin P, Prat J: Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. **Hum Pathol** 32: 569-577, 2001.
42. Baak JP, Nauta JJ, Wisse-Brekelmans EC, Bezemer PD: Architectural and morphometrical features together are more important prognosticator in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone. **J Pathol** 154: 335-341, 1988.
43. Di Cristofano A, Ellenson LH: Endometrial carcinoma. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2: 57-85, 2007.
44. Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potishman N, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barret RJ, Wilbanks GD: Risk factors and hormone levels in patients with serous endometrioid uterine carcinomas. **Mod Pathol** 10: 963-968, 1997.
45. Vasen HF, Offerhaus GJ, den Hartog Jager FC, Menko FH, Nagengast FM, Griffioen G, van Hogezaand RB, Heintz AP: The tumor spectrum in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a study of 24 kindreds in the Netherlands. **Int J Cancer** 46: 31-4, 1990.
46. Peltomaki P, Aalonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science** 260: 810-812, 1993.
47. Garg K, Soslow RA: Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. **J Clin Pathol** 69: 679-684, 2009.

48. Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, Comeras I, La Jeunesse J, Nakagawa H, Westman JA, Prior TW, Clendenning M, Penzone P, Lombardi J, Dunn P, Cohn DE, Copeland L, Eaton L, Fowler J, Lewandowski G, Vaccarello L, Bell J, Reid G, de la Chapelle A: Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial carcinoma patients. **Cancer Res** 66: 7810-817, 2006.
49. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** 15: 356-362, 1997.
50. Myers MP, Pass I, Batty IH, van der KJ, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK: The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 13513-518, 1998.
51. Simpson L, Parsons R: PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res** 264: 29-41, 2001.
52. Das S, Dixon JE, Cho W: Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. **Proc Natl Acad Sci USA** 100: 7491-496, 2003.
53. McConnachie G, Pass I, Walker SM, Downes CP: Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. **Biochem J** 371: 947-955, 2003.
54. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di CA, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP: Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell** 99: 323-334, 1999.
55. Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE: Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. **Proc Natl Acad Sci USA** 97: 4233-238, 2000.
56. Wu Y, Dowbenko D, Spencer S, Laura R, Lee J, Gu Q, Lasky LA: Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. **J Biol Chem** 275: 21477-85, 2000.
57. Miller SJ, Lou DY, Seldin DC, Lane WS, Neel BG. Direct identification of PTEN phosphorylation sites. **FEBS Lett** 528: 145-153, 2002.
58. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK: P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 9052-9057, 1997.
59. Maehama T, Okahara F, Kanaho Y: The tumour suppressor PTEN: involvement of a tumour suppressor candidate protein in PTEN turnover. **Biochem Soc Trans** 32: 343-347, 2004.
60. Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR: Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. **J Biol Chem** 276: 48627-630, 2001.
61. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP: Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. **EMBO J** 22: 5501-510, 2003.

62. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, Fryns JP, Sijmons RH, Woods DG, Mariman EC, Padberg GW, Kremer H: Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. **Hum Mol Genet** 6: 1383-387, 1997.
63. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M, Dunn T, Feit H, Geraghty MT, Graham JM, Jr., Hodgson SV, Hunter A, Korf BR, Manchester D, Miesfeldt S, Murday VA, Nathanson KL, Parisi M, Pober B, Romano C, Eng C: PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. **Hum Mol Genet** 8: 1461-472, 1999.
64. Eng C: Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. **J Med Genet** 37: 828-830, 2000.
65. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner H: PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. **Cancer Res** 57:4187-190, 1997.
66. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR: Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. **Cancer Res** 59: 4291-296, 1999.
67. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. **Cancer Res** 57:4736-38, 1997.
68. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH: Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. **Cancer Res** 57: 3935-940, 1997.
69. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB: PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst** 93: 1246-256, 2001.
70. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von DA: PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. **Oncogene** 16: 2259-264, 1998.
71. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL: Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 5246-250, 1998.
72. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal PA: Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. **Cancer Res** 58: 2500-3, 1998.
73. Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK: The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. **Cancer Res** 58: 5002-8, 1998.
74. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Nakagawa S, Matsumoto K, Kawana K, Taketani Y: PTEN mutation located only outside exons 5, 6 and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. **Clin Cancer Res** 7: 2636-42, 2001.
75. Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet** 21: 163-167, 1999.
76. Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C: Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. **Am J Pathol** 157: 1123-128, 2000.

77. Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY: Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. **BMC Cancer** 6: 212, 2006.
78. Salvesen HB, McDoanld N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA, Das S: PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Int J Cancer** 91: 22-26, 2001.
79. Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Chan LKY, Heung MS, Chang CS, Cheung AYK, Chung TKH, Wong YF: Epigenetic and genetic alterations of PTEN in cervical neoplasm. **Gynecol Oncol** 93: 621-627, 2004.
80. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR: Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem Soc Trans** 34: 647-662, 2006.
81. Geering B, Cutillas PR, Nock G, Gharbi SI, Van haesbroeck B: Class IA phosphoinositide 3-kinase are obligate p85-p110 heterodimers. **Proc Natl Acad USA** 19: 7809-814, 2002.
82. Nakamura H, Dan S, Akashi T, Unno M, Yamori T: Absolute quantification of four isoforms of the class I phosphoinositide-3-kinase catalytic subunit by real time RT-PCR. **Biol Pharm Bull** 30: 1181-184, 2007.
83. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD: P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. **Proc Natl Acad USA** 94: 4330-335, 1997.
84. Cantley LC: The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science** 296: 1655-657, 2002.
85. Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel M: Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110 $\alpha$ /p85 $\beta$ . **Cell Cycle** 7: 1151-156, 2008.
86. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD: Cellular function of phosphoinositide 3-kinase: implications for development, homeostasis and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol** 17: 2117-121, 2001.
87. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancer. **Science** 304: 554, 2004.
88. Samuels Y, Ericson K: Oncogenic PI3K and its role in cancer. **Curr Opin Oncol** 18: 77-82, 2006.
89. Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, Gymnopoulos M: Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. **Trends Biochem Sci** 32: 342-349, 2007.
90. Yu J, Wjasow C, Backer JM: Regulation of the p85/p110 alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. **J Biol Chem** 273: 30199-203, 1998.
91. Nicholson KM, Anderson NG: The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. **Cell Sig** 14: 381-395, 2002.
92. Rodríguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J: Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. **Cell** 89: 457-67, 1997.
93. Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR: Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. **Mol Cell Biol** 20: 8969-982, 2000.
94. Baldwin AS: Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **J Clin Invest** 107: 3-6, 2001.
95. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB: NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. **Nature** 401: 82-85, 1999.

96. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to cell-intrinsic death machinery. **Cell** 91: 231-241,1997.
97. Scheid MP, Schubert KM, Duronio V: Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. **J Biol Chem** 274: 31108-113, 1999.
98. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N: Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. **J Biol Chem** 273: 29864-672, 1998.
99. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa D: Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 278: L1280-8, 2000.
100. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL: 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 Res** 15: 1541-545, 2000.
101. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature** 399: 601-605, 1999.
102. Giehl K: Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. **Biol Chem** 386: 313-319, 2005.
103. Kiaris H, Spandidos DA: Mutations of Ras genes in human tumours. **Int J Oncol** 7: 413-421, 1995.
104. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y: The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. **Hum Mut** 28: 992-1006, 2008.
105. Rodenhuis S, Slebos RJ: Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. **Cancer Res** 52: 2665-669, 1992.
106. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A: Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. **Pathol Res Pract** 205: 858-62, 2009.
107. Semczuk A, Berbec H, Kostuch M, Cybulsky M, Wojcierowski J, Baranowski N: K-ras gene point mutations in human endometrial carcinomas: correlation with clinicopathological features and patients outcome. **J Cancer Res Clin Oncol** 124: 695-700, 1998.
108. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell** 116: 85-867, 2004.
109. Daves H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 417: 949-954, 2002.
110. Wellbrok C, Karasarides M, Marais R: The RAF proteins take centre stage. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5: 874-885, 2004.
111. Kawaguchi M, Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Kobayashi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D: Analysis of correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer. **Int J Oncol** 34: 1541-547, 2009.
112. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I: BRAF mutations in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. **Hum Cancer Biol** 17: 6133-138, 2005.
113. Pappa KI, Choleza M, Markaki S, Giannikaki E, Kyroudi A, Vlochos G, Voulgaris Z, Anagnostou NP: Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutations status. **Gyn Oncol** 100: 596-600, 2006.

114. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H: Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. **J Cell Sci** 107: 3655-663, 1994.
115. Gumbiner BN: Signal transduction of beta-catenin. **Curr Opin Cell Biol** 7: 634-640, 1995.
116. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW: Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. **J Biol Chem** 272: 24735-738, 1997.
117. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R: Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 16: 3797-804, 1997.
118. Tetsu O, McCormick F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. 

1	
---	--

**Nature** 398: 422-426, 1999.
119. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T: Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. **Am J Pathol** 155: 1033-38, 1999.
120. Persad S, Troussard AA, McPhee TR, Mulholland DJ, Dedhar S: Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of beta-catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation. **J Cell Biol** 153: 1161-74, 2001.
121. Wappenschmidt B, Wardelmann E, Gehrig A, Schondorf T, Maass N, Bonatz G, Gassel AM, Pietsch T, Mallmann P, Weber BH, Schmutzler RK: PTEN mutations do not cause nuclear beta-catenin accumulation in endometrial carcinomas. **Hum Pathol** 35: 1260-265, 2004.
122. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Volgestein B, Kinzler KW: Activation of beta-catenin or APC. **Science**, 275: 1787-790, 1997.
123. Palacios J, Gamallo C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. **Cancer Res** 58: 1344-347, 1998.
124. Leckband D, Sivasankar S: Mechanism of hydrophilic cadherin adhesion. **Curr Opin Cell Biol** 5: 587-592, 2000.
125. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O: Cadherin cell adhesion molecule in human epithelial tissue and carcinomas. **Cancer Res** 49: 2128-33, 1989.
126. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H: E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. **Cancer Res** 54: 3845-852, 1994.
127. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F: E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. **EMBO J** 14: 6107-115, 1995.
128. Kihana T, Yano N, Murao S, Ketani H, Hamada K, Yano J, Murao S, Iketani H, Hamada K, Yano J, Matsura S: Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology. **Jpn J Cancer Res** 87: 1184-1190, 1996.
129. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J: Mutations of the E-cadherin gene in human gynecological cancers. **Nat Gen** 7: 98-102, 1994.
130. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sánchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matias Guiu X, Palacios J: Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin ( $\beta$ -,  $\gamma$ -catenin, and p120) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. **J Pathol** 199: 471-478, 2004.
131. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM: The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification and target therapies. **Cancer Con** 16: 8-13, 2009.
132. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Dolcet X: Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. **J Clin Pathol** 62: 777-785, 2009.
133. Lane DP: p53, guardian of the genome. **Nature** 358: 15-16, 1992.
134. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM: p53 has a direct apoptotic role at the mitochondria. **Mol Cell** 11: 577-590, 2003.
135. Bode AM, Dong Z: Post-translational modifications of p53 in tumorigenesis. **Nat Rev** 4: 793-805, 2004.

136. May P, May E: Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 18: 7621-636, 1999.
137. Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL: Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. **Genes Dev** 13: 2490-501, 1999.
138. Buchlop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC: Interaction of p53 with the human Rad51 protein. **Nucleic Acids Res** 25: 3868-874, 1997.
139. Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG: p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 413-417, 1994.
140. Fan G, Ma X, Whong PY, Rodrigues CM, Steer CJ: p53 dephosphorylation and p21 (Cip1/Waf1) translocation correlate with caspase-3 activation TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis of HuH-7 cells. **Apoptosis** 9: 211-221, 2004.
141. Serrano J, Goebel SU, Peghni PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT: Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas. **J Clin Endocrinol Metab** 85: 4146-156, 2000.
142. Tao W, Levine AJ: p14ARF stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of MDM2. **Proc Acad Sci USA** 29: 6937-941, 1999.
143. Fuster JJ, Sanz-González SM, Mol UM, Andrés V: Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. **Tr Mol Med** 13: 192-198, 2007.
144. El-Deyry WS: Regulation of p53 downstream genes. **Semin Cancer Biol** 8: 345-357, 1998.
145. Meek DW, Lin AW: Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? **Oncogene** 18: 7666-675, 1999.
146. Prives C, Hall PA: The p53 pathway. **J Pathol** 187: 112-126, 1999.
147. Blattner C, Hay T, Meek DW, Lane DP: Hypophosphorylation of MDM2 augments p53 stability. **Mol Cell Biol** 22: 6170-182, 2002.
148. Grossman SR: p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. **Eur J Biochem** 268: 2773-778, 2001.
149. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME: The p53 family and programmed cell death. **Oncogen** 27: 6507-521, 2008.
150. Chene P: In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. **J Mol Biol** 281: 205-209, 1998.
151. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature** 366: 704-707, 1993.
152. Kamb A: Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. **Curr Top Microbiol Immunol** 227: 139-148, 1998.
153. Salvesen HB, Kumar R, Stefansson I, Angelini S, MacDonal N, Smeds J, Jacobs IJ, Hemminki K, Das S, Akslen LA: Low frequency of BRAF and CDKN2A mutations in endometrial cancer. **Int J Cancer** 115: 930-934, 2005.
154. Wood RD, Mitchel M, Sgouros J, Lindahl T: Human DNA repair genes. **Science** 291: 1284-289, 2001.
155. Karamurzin Y, Rutgers JKL: DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 28: 239-255, 2009.
156. Schofield MJ, Hsieh P: DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biologic functions. **Ann Rev Microbiol** 57: 35-46, 2003.
157. Jascur T, Boland CR: Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. **Int J Cancer** 119: 2030-35, 2006.
158. Modrich P: Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. **J Biol Chem** 272: 24727-730, 1997.

159. Hickman MJ, Samson LD: Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O6-methylguanine. **Mol Cell** 14: 105-116, 2004.
160. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature** 363: 558-561, 1993.
161. Imai K, Yamamoto H: Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogen** 29: 673-680, 2008.
162. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J: Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Cancer Res** 59: 462-466, 1999.
163. Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F, Gibb RK, Powell MA, Rader JS, Mutch DG: Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. **J Clin Oncol** 25: 2042-48, 2007.
164. Stefansson I, Akslen LA, MacDonald N, Ryan A, Das S, Jacobs IJ, Salvensen HB: Loss of hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-base study. **Clin Cancer Res** 8: 138-142, 2002.
165. Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, Sijmons RH, de Vries EG, Pras E, Mourits MJ, Hofstra RM, Buys CH, Kleibeuker JH, van Der Zee AG: MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. **Int J Cancer** 92: 398-403, 2001.
166. Bolan CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: National cancer institute of microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res** 58: 5248-457, 1998.
167. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 3: 415-428, 2002.
168. Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** 16: 6-21, 2002.
169. Takai D, Jones PA: Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosome 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 3740-745, 2002.
170. Sharma S, Kelly TK, Jones PA: Epigenetics in cancer. **Carcinogene** 31: 27-36, 2009.
171. 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, 2008.
172. Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K, Sakamoto H, Yoshida T, Sasaki H: Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Res** 65: 2115-124, 2005.
173. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Harasawa A, Tsukazaki K, Aoki D: Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related with carcinogenesis of endometrial cancer. **Oncol Rep** 16: 1189-196, 2006.
174. Kornberg RD, Lorch Y: Twenty five years of the nucleosome fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell** 98: 285-294, 1999.
175. Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. **Science** 293: 1074-1080, 2005.
176. Cress WD, Seto E: Histone deacetylase, transcriptional control, and cancer. **J Cell Physiol** 184: 1-6, 2000.
177. Gray SG, Ekstrom TJ: The human histone deacetylase family. **Exp Cell Res** 262: 75-83, 2001.
178. Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, Von RU, Beier HM, Alfer J: Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. **Hum Reprod** 22: 2956-966, 2007.
179. Waltregny D, de Leval L, Glénison W, Tran SL, North BJ, Bellancé A, Wedle U, Verdin E, Castronovo V: Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. **Am J Pathol** 2: 553-564, 2004.

180. Humphrey GW, Wang Y, Russanova VR, Hirai T, Quin J, Nakatani Y, Howard BH: Stable histone deacetylase complex is distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. **J Biol Chem** 276: 6819-824, 2001.
181. Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W: NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. **Mol Cell** 2: 815-861, 1998.
182. You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL: CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 1454-458, 2001.
183. Guenther MG, Barak O, Lazar MA: The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase. **Mol Cell Biol** 21: 6091-6101, 2001.
184. Yamagoe S, Kanno T, Kanno Y, Sasaki S, Siegel RM, Lenardo MJ, Humphrey G, Wang Y, Nakatani Y, Howard BH, Ozato K: Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo. **Mol Cell Biol** 23:1025-1033, 2003.
185. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T: Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. **EMBO J** 21: 2383-396, 2002.
186. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP: HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature** 417: 455-458, 2002.
187. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN: Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. **Prostate** 59: 177-189, 2004.
188. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Röken C: Association of classes of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. **Lancet Oncol** 9: 139-148, 2007.
189. Weichert W, Röske A, Niesporek S, Noske A, Buchendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Bohem M, Beckers T, Denkert C: 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. **Clin Cancer Res** 14: 1669- 677, 2008.
190. Özdag H, Teschendorff AE, Ahmed AA, Hyland SJ, Blenkinsop C, Bobrow L, Veerakumarasivan A, Burt G, Subkhankulova T, Arends MJ, Collins VP, Bowtell D, Kouzarides T, Brenton JD, Caldas C: Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancer. **BMG Genomics** 7: 90, 2006.
191. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chronet M, Caballero R, Alaminos M, Setien F, Paz MF, Schwartz Jr S, Esteller M: A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. **Nat Genet** 38: 566-569, 2006.
192. Luo RX, Postigo AA, Dean DC: Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. **Cell** 92: 463-473, 1998.
193. Pan L, Lu J, Wang X, Han L, Zhang Y, Han S, Huang B: Histone deacetylase inhibitor trichostatin A potentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression. **Cancer** 109: 1676-688, 2007.
194. Kim YK, Seo DW, Kang DW, Lee HY, Han JW, Kim SN: Involvement of HDAC1 and PI3K/PKC signaling pathways in NF- $\kappa$ B activation by the HDAC inhibitor apicidin. **Biochem Biophys Res Commun** 347: 1088-1093, 2006.
195. Jiang S, Dowdy SC, Meng XW, Wang Z, Jones MB, Podratz KC, Jiang SW: Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both type I and type II endometrial cancer cells. **Gyn Oncol** 105: 493-500, 2007.
196. Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, et al: Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. **J Clin Oncol** 23: 3923-931, 2005.
197. Hess-Stump H: Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. **Eur J Cell Biol** 84: 109-121, 2005.
198. Kouzarides T: Chromatin modifications and their functions. **Cell** 128: 693-705, 2007.

199. Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, Weisenberger DJ, Egger G, Takai D, Gonzales FA, Jones PA: Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in human genome. **Proc Natl Acad Sci USA** 101: 7357-7362, 2004.
200. Allis CD; Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhatter R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y: New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell** 131: 633-636, 2007.
201. Jiang C, Puugh BF: Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. **Nat Rev Genet** 10: 161-172, 2000.
202. Smith CL, Peterson CL: ATP-dependent chromatin remodeling. **Curr Top Dev Biol** 65: 115-148, 2005.
203. Shivaswamy S, Bhinge A, Zhao Y, Jones S, Hirst M, Iyer VR: Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. **pLoS Biol** 6: 65, 2008.
204. Oda S, Oki E, Maehara Y, Sugimachi K: Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. **Nucleic Acids Res** 25: 3415-420, 1997.
205. Schouten JP, McElgunn CJ, WaaijerR, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res** 30, e57, 2002.
206. Jeuken JW, Cornelissen SJB, Vriezen M, Dekkers MMG, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SHE, Wesseling P: MS-MLPA: an attractive laboratory assay for robust, reliable and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. **Lab Invest** 87: 1055-1065, 2007.
207. StitzelNO, TsengYY, PervouchineD, GoddeauD, KasifS, LiangJ: Structural location of disease-associated single-nucleotide polymorphisms. **J Mol Biol** 327: 1021-1030, 2003.
208. Nakken S, Alseth I, Rognes T: Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. **Neuroscience** 145: 1273-9, 2007.
209. Yue P, Li Z, MouldJ: Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. **J Mol Biol** 353: 459-73, 2005.
210. Yue P, Mould J: Identification and analysis of deleterious human SNPs. **J Mol Biol** 356: 1263-74, 2006b.
211. Yue P, Melamud E, Mould J: SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. **BMC Bioinformatics** 7:166, 2006a.
212. Ferrer-Costa C, Gelpi JL, Zamakola L, Parraga I, del CX, Orozco M: PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. **Bioinformatics** 21: 3176-178, 2005.
213. Ng P, Henikoff S: Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res** 11: 863-74, 2001.
214. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A: PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. **Genome Res** 13: 2129-141, 2003.
215. Thomas PD, Kejariwal A: Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: Evolutionary evidence for differences in molecular effects. **Proc Natl Acad Sci USA** 43: 15398-403, 2004.
216. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J Mol Biol** 292: 195-202, 1999.
217. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C: The MicrRNA.org source target and expression. **Nucleic Acids Res** 36: 149-153, 2007.
218. Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR: An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. **Hum Mol Genet** 15: 2490-508, 2006.
219. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang M Q, Krainer A R: ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. **Nucleic Acids Res** 31: 3568-571, 2003.
220. Bonneau D, Longy M: Mutations of the human PTEN gene. **Hum Mutat** 16: 109-122, 2000.

221. Fujii HG, Morimoto AM, Berson AE, Bolen JB: Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudo-gene, psi PTEN. **Oncogene** 18: 1765-69, 1999.
222. Matsushima-Nishiu M, Unoki M, Ono K, Tsunoda T, Minaguchi T, Kuramoto H, Nishida M, Satoh T, Tanaka T, Nakamuta Y: Growth and gene expression profiles analyses of endometrial cancer cell expression exogenous PTEN. **Cancer Res** 61: 3741-749, 2001.
223. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M: p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev** 9: 95-107, 2009.
224. Yang G, Rahadurai A, Tsao H: Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. **J Invest Dermatol** 125: 1242-51, 2005.
225. Samarthai N, Hall K, Tien-Yeh I: Molecular profiling of endometrial malignancies. **Obstet Gynecol Int** ID162363, 2010.
226. Hirai Y, Tanaka N, Furuta R, Kawaguchi T, Sakamoto M, Shirahama S, Noda T: Somatic mutations of the PTEN/NMAC1 gene associated with frequent chromosomal loss detected using comparative genomic hybridization in endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 83: 81-88, 2001.
227. Amant F, de la Rey M, Dorfling CM, van der Walt L, Dreyer G, Dreyer L, Vergote I, Lindeque BG, Van Rensburg EJ: PTEN mutations in uterine sarcomas. **Gynecol Oncol** 85: 165-169, 2002.
228. Pallares J, Bussaglia E, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Sanchez-Verde L, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X: Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. **Mod Pathol** 18: 719-27, 2005.
229. Zhao L, Vogt PK: Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (p13K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. **Cell Cycle** 9: 596-600, 2010.
230. Chalhounb N, Baker S. J: PTEN and PI3-Kinase pathway. **Ann Rev Pathol Mech Dis** 4: 127-50, 2007.
231. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Encinas M, LLecha N, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X: PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. Correlation with PTEN and K-RAS alterations. **Hum Pathol** 37: 1465-472, 2006.
232. Barbi S, Cataldo I, De Manzoni G, Bersani S, Lamba S, Mattuzzi S, Bardelli A, Scarpa A: The analysis of PIK3CA mutations in gastric carcinoma and metanalysis of literature suggest that exon-selectivity is a signature of cancer type. **J Exp Clin Cancer Res** 29: 32, 2010.
233. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J: PIK3CA mutations in kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with prognosis parameters. **Mod Pathol** 21: 131-139, 2007.
234. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Barker SJ, Elelson LH: PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrial carcinoma and complex atypical hyperplasia. **Hum Cancer Biol** 12: 5932-939, 2006.
235. Oda K, Stokoe D, Yaketani Y, McCormic F: High frequency of coexistence mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. **Cancer Res** 65: 10669-673, 2005.
236. Freeman DJ, Li AJ, Wei G, Li H, Kertesz N, Lesche R, Whale AD, Martínez-Diaz H, Rozengurt N, Cardiff RD, Liu X, Hong W: PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. **Cancer Cell**, 3: 117-30, 2003.
237. Astanehe A, Arenillas D, Wasserman WW, Leung PCK, Dunn SE, Davies BR, Mills GB, Auersperg N: Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface and ovarian cancer. **J Cell Sci** 121: 664-674, 2008.
238. Ollikainen M, Gylling A, Puputti M, Nupponen NN, Abdel-Rahaman WM, Butzow R, Peltomaki P: Patterns of PIK3CA alterations in familial colorectal and endometrial carcinoma. **Int J Cancer** 15: 915-920, 2007.
239. Koul A, Willen R, Bendhal P, Nilbert M, Borg A: Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. **Cancer** 94: 2369-379, 2002.
240. Caduff RF, Johnston CM, Frank TS: Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. **Am J Pathol** 145: 182-188, 1995.

241. Kang S, Seo SS, Chang HJ, Yoo CW, Park SY, Dong SM: Mutual exclusiveness between PIK3CA and KRAS mutations in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Cancer** 18: 1339-343, 2008.
242. Tang KT, Lee CH: BRAF mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic role and clinical implications. **J Chin Med Assoc** 73: 113-128, 2010.
243. Vehlo S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schimtt F, Carneiro F, Oliveira C, Seruca R: BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? **BMC Cancer** 8: 225-231, 2008.
244. Konopka B, Janiec-Janowska A, Czapczak D, Paszko Z, Bidzinski M, Olszewski W, Goluda C. Molecular genetics defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations. **J Cancer Res Oncol**, 2007.
245. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J: Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. **Mod Pathol** 22: 522-29, 2009.
246. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YSN, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D: Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. **J Med Genet** 41: 508-517, 2004.
247. More H, Humar B, Weber W, Ward R, Christian A, Lintot C, Graziano F, Ruzzo AM, Acosta E, Boman B, Harlan M, Ferreira P, Seruca R, Suriano G, Guilford P: Identification of seven novel germline mutations in the human E-Cadherin (CDH1) gene. **Hum Mutat** 28: 203, 2007.
248. Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers M, van Bokhoven A, van Roy F: Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-Cadherin (CDH1). **Genomics** 26: 281-289, 1995.
249. Semczuk A, Boltze C, Marzec B, Szczygielska A, Roessner A, Schneider-Stock R: p16INK4A alterations are accompanied by aberrant protein immunostaining in endometrial carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol** 129: 589-596, 2003.
250. Bilbao C, Rodríguez G, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Rivero JF, Flcó Jr O, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC, Perucho M: The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. **Int J Cancer** 119, 563-570, 2006.
251. Cohn DE, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Dintzis SM, Gersell DJ, Todd CR, Goodfellow PJ: Genotypic and phenotypic progression in endometrial tumorigenesis: determining when defects in DNA mismatch repair and KRAS2 occur. **Gen Chrom Cancer** 32: 295-301, 2001.
252. Houg JM, Coyyu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R: Bat 26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancer and cell lines. **Cancer Res** 5: 300-306, 1997.
253. Perera S, Bapat B: The MLH1 variantas p.Arg256Cys and p.Lys618Ala affects protein stability while p.Leu769Gln affects heterodimer formation. **Hum Mutat** 29: 332, 2007.
254. Bécouarn Y, Rullier A, Gorry P, Smith D, Richard-Molard B, Echinard E, Texereau P, Beyssac R, Legoux JL, Lamouliatte H, Frebourg T, Olschwang S, Gilbert B, Venat L, Picot V, Paraf F, Longy M: Value of microsatellite instability typing in detecting hereditary non-polyposis colorectal cancer. A prospective multicentric study by the Association Aquitaine Gastro. **Gastroenterol Clin Biol** 29: 667-75, 2005.
255. Mac Philliphs M, Meldrum CJ, Creegan R, Edkins E, Scott RJ: Deletion mutations in an Australian series of HNPCC patients. **Hered Cancer Clin Pract** 3: 43-47, 2005.
256. Muller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber JE, Syngal S, Kolodner RD: Comprehensive molecular analysis of mismatch repair gene defects in suspected Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) cases. **Cancer Res** 69: 7053-61, 2009.
257. Niessen RC, Berends JW, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtemberg MJL, de Walle HEK, de Vries EGE, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AGJ, Hofstra RMW, Kleibeuker JH: Identification of mismatch repair gene mutations in young colorectal cancer patients and patients with multiple HNPCC-associated tumours. **Gut** 55:1781-788, 2006.

258. Taylor NP, Zigelboim I, Huetter PC, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, Mutch DG, Edmonston TB, Goodfellow PJ: DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis. **Mod Pathol** 19: 1333-338, 2006.
259. Seeber LM, Zweemer RP, Marchioni L, Massuger LF, Smit VT, van Baal VM, Verheikjen RH, van Diest PJ: Methylation profiles of endometrioid and serous endometrial cancers. **Endocr Relat Cancer** 17: 663-73, 2010.
260. Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ Rader JS, Gibb RK, Swisher E, Look K, Walls KC, Fan MY, Mutch DG: Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutations in an unselected series of endometrial cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 100: 5908-913, 2003.
261. Krusche C, Wülfing P, Kersting C, Vloet A, Böcker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J: Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat** 1: 15-23, 2005.



***Anexos***

Tabla 56a, Sondas utilizadas en el kit SALSA MLPA P003 MLH1/MSH2 para los ensayos de MLPA.

Tamaño (bp)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica		
		Referencia	hMLH1	hMSH2
130	Reference probe 0797-L00463	5q31		
136	Reference probe 0981-L0566	10p11		
142	<b>MLH1 probe</b> 0886-L0474		Exón 1	
148	<b>MSH2 probe</b> 1027-L0599			Exón 1
154	<b>MLH1 probe</b> 1008-L0577		Exón 2	
160	<b>MSH2 probe</b> 0906-L0494			Exón 2
166	<b>MLH1 probe</b> 0888-L0476		Exón 3	
172	<b>MSH2 probe</b> 1029-L0601			Exón 3
178	<b>MLH1 probe</b> 0889-L0477		Exón 4	
184	<b>MSH2 probe</b> 0908-L0496			Exón 4
190	<b>MSH2 probe</b> 6343-L5729			Exón 1
196	Reference probe 3861-L3610	3p22		
202	<b>MLH1 probe</b> 0890-L6064		Exón 5	
211	<b>MSH2 probe</b> 0909-L0497			Exón 5
216	<b>MSH2 probe</b> 13145-L14624			Exón 1
220	<b>MLH1 probe</b> 0891-L0479		Exón 6	
229	<b>MSH2 probe</b> 0910-L0498			Exón 6
238	<b>MLH1 probe</b> 0892-L0480		Exon 7	
247	<b>MSH2 probe</b> 0911-L0499			Exon 7
256	<b>MLH1 probe</b> 0893-L0481		Exón 8	
265	<b>MSH2 probe</b> 0912-L0582			Exón 8
274	<b>MLH1 probe</b> 0894-L0482		Exón 9	
283	Reference probe 0438-L0003	17q21		
292	<b>MSH2 probe</b> 0913-L0583			Exón 9
301	<b>MLH1 probe</b> 0895-L0483		Exón 10	
310	<b>MSH2 probe</b> 0914-L0584			Exón 10
319	<b>MLH1 probe</b> 0896-L0484		Exón 11	
328	<b>MSH2 probe</b> 0915-L0503			Exón 11
337	<b>MLH1 probe</b> 0897-L0485		Exón 12	
346	<b>MSH2 probe</b> 0916-L0504			Exón 12
355	<b>MLH1 probe</b> 0898-L0486		Exón 13	
364	<b>MSH2 probe</b> 1013-L0575			Exón 13
373	Reference probe 0681-L0154	4q25		
382	<b>MLH1 probe</b> 0899-L0586		Exón 14	
391	<b>MSH2 probe</b> 0918-L0506			Exón 14
400	<b>MLH1 probe</b> 0900-L0488		Exón 15	
409	<b>MSH2 probe</b> 0919-L0585			Exón 15

Tabla 56b, Sondas utilizadas en el kit SALSA MLPA P003 MLH1/MSH2 para los ensayos de MLPA.

Tamaño (bp)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica		
		Referencia	hMLH1	hMSH2
418	<b>MLH1 probe</b> 1009-L0576		Exón 16	
427	<b>MSH2 probe</b> 1053-L0627			Exón 16
436	<b>MLH1 probe</b> 1030-L0602		Exón 17	
445	<b>MLH1 probe</b> 1031-L0603		Exón 18	
454	<b>MLH1 probe</b> 0904-L0492		Exón 19	
463	Reference probe 0979-L0568	10p14		
472	Reference probe 13147-L14404			Extremo 5'
481	Reference probe 13130-L03603			Extremo 5'
490	Reference probe 04274-L03639	13q12		

Tabla 57, Sondas utilizadas en el kit SALSA MS-MLPA ME011-B1 MMR para los ensayos de MS-MLPA.

Tamaño (bp)	Sonda SALSA MS-MLPA	Referencia	Posición cromosómica		
			hMLH1	hMSH2	hMSH6
130	CTNN probe 03896-L00020	11q13.3			
136	KCNJ6 probe 03797-L04594	21q22.13			
142	PMS2 probe 07935-L16571	7p22.1			
148	<b>MLH1 probe</b> 01685-L01265	3p22.2	Promotor		
154	PMS2 probe 11966-L13112	7p22.1			
160	<b>MSH6 probe</b> 06228-L05731	2p16.3			Promotor
166	<b>MLH1 probe</b> 01686-L15580	3p22.2	Promotor		
172	MGMT probe 14133-L15736	10q26.3			
178	TNFRSF1A probe 00554-L13113	12p13.31			
184	<b>MSH2 probe</b> 06227-L07711	2p21		Promotor	
190	PROKR2 probe 11954-L12774	20p12.3			
196	<b>MLH1 probe</b> 06222-L07712	3p22.2	Promotor		
202	MGMT probe 05670-L14276	10q26.3			
208	<b>MSH6 probe</b> 06230-L05733	2p16.3			Promotor
214	MGMT probe 12250-L14205	10q26.3			
220	MSH3 probe 07940-L14208	5q14.1			
232	PAH probe 02334-L13114	12q23			
238	MLH1 probe 07187-L07710	3p22.2			
247	<b>MSH2 probe</b> 11634-L12398	2p21		Promotor	
256	SEPT9 probe 09646-L09804	17q25.3			
265	<b>MLH1 probe</b> 06221-L01747	3p22.2	Promotor		
274	<b>MSH2 probe</b> 06142-L00599	2p21		Promotor	
283	MSH3 probe 11947-L00795	5q14.1			
292	<b>MLH1 probe</b> 02258-L01745	3p22.2	Promotor		
301	<b>MSH6 probe</b> 06229-L05732	2p16.3			Promotor
310	CACNA1A probe 09065-L15938	19p13.2			
319	TSC1 probe 04324-L03897	9q34.13			
328	KCNQ1 probe 15055-L04802	11p15.5			
339	PMS2 probe 07934-L16147	7p22.1			
346	MGMT probe 13716-L15582	10q26.3			
355	MLH3 probe 07941-L07722	14q24.3			
364	CUGBP2 probe 01234-L00781	10p14			
373	ABC4 probe 04727-L04144	7q21.12			
382	MGMT probe 14136-L12791	15q21.1			
391	FBN1 probe 02459-L01903	10q26.3			

400	MSH2 probe 06141-L13115	2p21		Promotor	
409	MGMT probe 14135-L16573	10q26.3			
418	TSC2 probe 13553-L12763	16p13.3			

Tabla 58, Normalización de los valores de MLPA de la muestra tumoral de la paciente 9.

Sonda	Altura Paciente	Media altura controles	Promedio correcciones	Cor. control 1	Cor. control 2	Cor. control 3	Cor. control 4	Cor. control 5	Cor. control 6	Cor. control 7	Cor. control 8	Cor. control 9
Control 1	3741	4263,5	1,039139648	1	1,0128	0,6828	0,9936	1,0175	1,1376	1,1606	1,1768	1,1706
Control 2	4004	4621,5	1,026038332	0,9874	1	0,6742	0,9811	1,0047	1,1233	1,1459	1,162	1,1558
MLH1 ex 1	4915	4163,5	1,398033016	1,3454	1,3626	0,9186	1,3368	1,3689	1,5305	1,5614	1,5833	1,5748
MSH2 ex 2A	3842	4642,5	0,980071867	0,9432	0,9552	0,644	0,9371	0,9597	1,073	1,0946	1,1099	1,104
MLH1 ex 2	4406	4050	1,288373977	1,2398	1,2557	0,8466	1,2319	1,2616	1,4105	1,4389	1,4591	1,4513
MSH2 ex 2	1860	2179,5	1,010668071	0,9726	0,985	0,6641	0,9664	0,9896	1,1065	1,1288	1,1446	1,1385
MLH1 ex 3	4346	3403	1,512447288	1,4555	1,4741	0,9938	1,4462	1,481	1,6558	1,6892	1,7128	1,7037
MSH2 ex 3	3779	4702	0,951802282	0,916	0,9276	0,6254	0,9101	0,932	1,042	1,063	1,0779	1,0722
MLH1 ex 4	3541	2867	1,462684666	1,4076	1,4256	0,9611	1,3986	1,4322	1,6013	1,6336	1,6565	1,6477
MSH2 ex 4	3463	3969,5	1,03316375	0,9942	1,0069	0,6789	0,9879	1,0117	1,1311	1,1539	1,17	1,1638
MSH2 ex 1B	3332	4030,5	0,979035731	0,9422	0,9542	0,6433	0,9361	0,9587	1,0718	1,0934	1,1087	1,1029
Control 3	3958	3080	1,521869972	1,4645	1,4832	1	1,4552	1,4902	1,6661	1,6997	1,7235	1,7143
MLH1 ex 5	5515	4650,5	1,404424325	1,3515	1,3688	0,9228	1,3429	1,3752	1,5375	1,5685	1,5905	1,582
MSH2 ex 5	2567	2986,5	1,017925102	0,9796	0,9921	0,6689	0,9733	0,9967	1,1144	1,1369	1,1528	1,1467
MSH2 ex 1C	4325	4848	1,056515749	1,0167	1,0297	0,6942	1,0102	1,0345	1,1567	1,18	1,1965	1,1901
MLH1 ex 6	4657	3793	1,45403838	1,3993	1,4171	0,9554	1,3903	1,4238	1,5919	1,6239	1,6467	1,6379
MSH2 ex 6	3361	3736	1,065403501	1,0253	1,0384	0,7001	1,0187	1,0432	1,1664	1,1899	1,2066	1,2002
MLH1 ex 7	4140	3177,5	1,543004727	1,4849	1,5038	1,0139	1,4754	1,5109	1,6893	1,7233	1,7474	1,7382
MSH2 ex 7	2160	2805	0,911954898	0,8776	0,8888	0,5992	0,872	0,893	0,9984	1,0185	1,0328	1,0273
MLH1 ex 8	4307	3710,5	1,374658781	1,3229	1,3398	0,9033	1,3144	1,346	1,505	1,5353	1,5568	1,5485
MSH2 ex 8	2796	3639	0,909929167	0,8757	0,8868	0,5979	0,87	0,891	0,9962	1,0163	1,0305	1,025
MLH1 ex 9	3526	3029,5	1,378363696	1,3264	1,3434	0,9057	1,318	1,3497	1,509	1,5394	1,561	1,5527
Control 4	2391	2707,5	1,045835996	1,0064	1,0193	0,6872	1	1,0241	1,145	1,168	1,1844	1,1781
MSH2 ex 9	1778	1964	1,072118396	1,0317	1,0449	0,7045	1,0251	1,0498	1,1737	1,1974	1,2142	1,2077
MLH1 ex 10	3411	2607	1,549505646	1,4911	1,5102	1,0182	1,4816	1,5172	1,6964	1,7306	1,7548	1,7455
MSH2 ex 10	3045	3738,5	0,964589182	0,9283	0,9401	0,6338	0,9223	0,9445	1,056	1,0773	1,0924	1,0866
MLH1 ex 11	3792	3400,5	1,320620469	1,2709	1,2871	0,8678	1,2627	1,2931	1,4458	1,4749	1,4956	1,4876
MSH2 ex 11	3010	3147,5	1,13253917	1,0899	1,1038	0,7442	1,0829	1,109	1,2399	1,2649	1,2826	1,2758
MLH1 ex 12	2788	2630	1,255421308	1,2081	1,2236	0,8249	1,2004	1,2293	1,3744	1,4021	1,4218	1,4142
MSH2 ex 12	3257	3956	0,975020957	0,9383	0,9503	0,6407	0,9323	0,9547	1,0674	1,089	1,1042	1,0983
MLH1 ex 13	3050	2571,5	1,404642438	1,3517	1,369	0,923	1,3431	1,3754	1,5378	1,5688	1,5907	1,5823
MSH2 ex 13	1693	2080	0,963931334	0,9276	0,9395	0,6334	0,9217	0,9439	1,0553	1,0766	1,0916	1,0858
Control 5	1679	1947	1,02126211	0,9828	0,9953	0,6711	0,9765	1	1,1181	1,1406	1,1566	1,1504
MLH1 ex 14	1726	1494,5	1,36772047	1,3162	1,333	0,8987	1,3078	1,3392	1,4974	1,5275	1,5489	1,5407
MSH2 ex 14	1416	1982	0,846081264	0,8142	0,8246	0,5559	0,809	0,8285	0,9263	0,9449	0,9582	0,9531
MLH1 ex 15	3610	2709,5	1,577867465	1,5184	1,5378	1,0368	1,5087	1,545	1,7274	1,7622	1,7869	1,7774
MSH2 ex 15	2369	3100,5	0,904869187	0,8708	0,8819	0,5946	0,8652	0,886	0,9906	1,0106	1,0248	1,0193
MLH1 ex 16	2577	2594	1,176513518	1,1322	1,1467	0,7731	1,125	1,152	1,288	1,314	1,3324	1,3253
MSH2 ex 16	2954	4000,5	0,874477603	0,8415	0,8523	0,5746	0,8362	0,8563	0,9574	0,9767	0,9903	0,9851
MLH1 ex 17	1872	1768	1,253937985	1,2067	1,2221	0,8239	1,199	1,2278	1,3728	1,4005	1,4201	1,4125
MLH1 ex 18	2595	2364,5	1,299722145	1,2508	1,2667	0,854	1,2428	1,2727	1,4229	1,4516	1,4719	1,4641
MLH1 ex 19	2606	2315,5	1,33285253	1,2827	1,299	0,8758	1,2744	1,3051	1,4592	1,4886	1,5094	1,5014
Control 6	1526	1978,5	0,91342092	0,879	0,8902	0,6002	0,8734	0,8944	1	1,0202	1,0344	1,0289
Control 7	2295	3035,5	0,895374924	0,8617	0,8727	0,5883	0,8561	0,8767	0,9802	1	1,014	1,0086

Control 8	2421	3247	0,883008686	0,8497	0,8606	0,5802	0,8443	0,8646	0,9667	0,9862	1	0,9947
Control 9	922	1230	0,88772466	0,8543	0,8652	0,5833	0,8488	0,8692	0,9719	0,9915	1,0053	1

Tabla 59, Normalización de los valores de MLPA de la muestra tumoral 15.

Sonda	Altura Paciente	Media altura controles	Promedio correcciones	Cor. control 1	Cor. control 2	Cor. control 3	Cor. control 4	Cor. control 5	Cor. control 6	Cor. control 7	Cor. control 8	Cor. control 9
Control 1	2248	2034	0,9335334	1	0,8765	0,9838	1,0242	1,111	0,855	0,7504	0,7332241	1,0839693
Control 2	3575	2834,5	1,0671273	1,1409	1	1,1224	1,1686	1,267	0,9755	0,8561	0,8365351	1,2367002
MLH1 ex 1	2275	2155	0,8932042	0,955	0,837	0,9395	0,9781	1,061	0,8165	0,7166	0,7001946	1,0351397
MSH2 ex 2A	3312	2118	1,3230645	1,4145	1,2398	1,3916	1,4488	1,571	1,2094	1,0614	1,0371677	1,5333073
MLH1 ex 2	2025	1918	0,8932912	0,955	0,8371	0,9396	0,9782	1,061	0,8166	0,7166	0,7002628	1,0352405
MSH2 ex 2	1994	1354	1,2460146	1,3322	1,1676	1,3106	1,3644	1,48	1,139	0,9996	0,9767673	1,4440137
MLH1 ex 3	1927	1831,5	0,8902079	0,9517	0,8342	0,9363	0,9748	1,057	0,8138	0,7142	0,6978457	1,0316672
MSH2 ex 3	3377	2273	1,2570376	1,3439	1,178	1,3222	1,3765	1,493	1,1491	1,0085	0,9854083	1,4567884
MLH1 ex 4	1811	1721,5	0,890078	0,9516	0,8341	0,9362	0,9747	1,057	0,8136	0,7141	0,6977439	1,0315167
MSH2 ex 4	2987	2152,5	1,1741098	1,2553	1,1003	1,2349	1,2857	1,395	1,0733	0,9419	0,9204001	1,3606828
MSH2 ex 1B	3142	2164,5	1,2281891	1,3131	1,1509	1,2918	1,3449	1,459	1,1227	0,9853	0,9627936	1,4233556
Control 3	1826	1625	0,950745	1,0165	0,8909	1	1,0411	1,129	0,8691	0,7627	0,7453015	1,101824
MLH1 ex 5	2493	2395	0,880711	0,9416	0,8253	0,9263	0,9644	1,046	0,8051	0,7065	0,6904009	1,0206612
MSH2 ex 5	2525	1645	1,2987098	1,3885	1,217	1,366	1,4222	1,543	1,1872	1,0419	1,0180757	1,5050825
MSH2 ex 1C	3867	2460,5	1,3297422	1,4217	1,2461	1,3986	1,4561	1,579	1,2155	1,0668	1,0424024	1,5410461
MLH1 ex 6	2172	2163	0,8496106	0,9083	0,7962	0,8936	0,9304	1,009	0,7766	0,6816	0,666021	0,9846188
MSH2 ex 6	2927	1902,5	1,3017114	1,3917	1,2198	1,3691	1,4254	1,546	1,1899	1,0443	1,0204287	1,5085611
MLH1 ex 7	1910	2007	0,8051979	0,8609	0,7545	0,8469	0,8817	0,956	0,736	0,646	0,6312052	0,9331487
MSH2 ex 7	2196	1490,5	1,2465709	1,3327	1,1682	1,3112	1,3651	1,481	1,1395	1,0001	0,9772034	1,4446585
MLH1 ex 8	1780	1742,5	0,8642987	0,924	0,8099	0,9091	0,9464	1,027	0,7901	0,6934	0,6775351	1,0016409
MSH2 ex 8	3072	2033,5	1,2781849	1,3665	1,1978	1,3444	1,3997	1,518	1,1684	1,0254	1,001986	1,4812961
MLH1 ex 9	1698	1694,5	0,8478378	0,9065	0,7945	0,8918	0,9284	1,007	0,775	0,6802	0,6646312	0,9825642
Control 4	1490	1380,5	0,9132013	0,9763	0,8558	0,9605	1	1,085	0,8348	0,7326	0,7158705	1,0583144
MSH2 ex 9	1782	1105	1,3644639	1,4588	1,2786	1,4352	1,4942	1,621	1,2473	1,0946	1,0696213	1,5812854
MLH1 ex 10	1412	1310	0,9119689	0,975	0,8546	0,9592	0,9987	1,083	0,8336	0,7316	0,7149045	1,0568862
MSH2 ex 10	2733	1855	1,2465576	1,3327	1,1681	1,3111	1,365	1,481	1,1395	1	0,9771929	1,4446431
MLH1 ex 11	1581	1659,5	0,8060672	0,8618	0,7554	0,8478	0,8827	0,957	0,7368	0,6467	0,6318867	0,9341561
MSH2 ex 11	2626	1621,5	1,370233	1,465	1,284	1,4412	1,5005	1,627	1,2525	1,0993	1,0741437	1,5879711
MLH1 ex 12	1398	1374	0,860869	0,9204	0,8067	0,9055	0,9427	1,022	0,7869	0,6906	0,6748466	0,9976662
MSH2 ex 12	2893	1876,5	1,3044172	1,3946	1,2224	1,372	1,4284	1,549	1,1924	1,0465	1,0225498	1,5116968
MLH1 ex 13	1616	1663,5	0,8219307	0,8788	0,7702	0,8645	0,9001	0,976	0,7513	0,6594	0,6443223	0,9525404
MSH2 ex 13	1649	996,5	1,400103	1,4969	1,312	1,4726	1,5332	1,663	1,2799	1,1232	1,0975592	1,6225877
Control 5	1216	1222	0,8419359	0,9001	0,789	0,8856	0,922	1	0,7696	0,6754	0,6600046	0,9757245
MLH1 ex 14	829	797,5	0,8795094	0,9403	0,8242	0,9251	0,9631	1,045	0,804	0,7056	0,689459	1,0192687
MSH2 ex 14	1587	1012	1,3268232	1,4185	1,2434	1,3956	1,4529	1,576	1,2129	1,0644	1,0401142	1,5376633
MLH1 ex 15	1390	1306,5	0,9001648	0,9624	0,8435	0,9468	0,9857	1,069	0,8229	0,7222	0,705651	1,0432064
MSH2 ex 15	2269	1471	1,305084	1,3953	1,223	1,3727	1,4291	1,55	1,193	1,047	1,0230725	1,5124696
MLH1 ex 16	1427	1303	0,9266083	0,9907	0,8683	0,9746	1,0147	1,101	0,847	0,7434	0,7263805	1,0738519
MSH2 ex 16	2977	2086,5	1,207194	1,2906	1,1313	1,2697	1,3219	1,434	1,1035	0,9685	0,9463353	1,3990244
MLH1 ex 17	1033	995	0,8784031	0,9391	0,8231	0,9239	0,9619	1,043	0,803	0,7047	0,6885918	1,0179866
MLH1 ex 18	1096	1171,5	0,7915619	0,8463	0,7418	0,8326	0,8668	0,94	0,7236	0,635	0,6205158	0,9173458
MLH1 ex 19	1346	1372	0,8300564	0,8874	0,7778	0,8731	0,909	0,986	0,7588	0,6659	0,6506921	0,9619573
Control 6	1569	1213,5	1,0939559	1,1696	1,0251	1,1506	1,1979	1,299	1	0,8776	0,8575664	1,267792
Control 7	2492	1691,5	1,2465011	1,3327	1,1681	1,3111	1,365	1,481	1,1394	1	0,9771487	1,4445776
Control 8	2496	1655,5	1,2756515	1,3638	1,1954	1,3417	1,3969	1,515	1,1661	1,0234	1	1,4783601
Control 9	668	655	0,8628828	0,9225	0,8086	0,9076	0,9449	1,025	0,7888	0,6922	0,6764252	1

Tabla 60, Normalización de los valores de MLPA de la muestra tumoral 17.

Sonda	Altura Paciente	Media altura controles	Promedio correcciones	Cor. control 1	Cor. control 2	Cor. control 3	Cor. control 4	Cor. control 5	Cor. control 6	Cor. control 7	Cor. control 8	Cor. control 9
Control 1	3654	2277,5	1,112646	1	0,9218	0,9046	0,9687	0,7601	0,9413	0,7183	0,8535	0,7428
Control 2	4851	2787,25	1,021606	1,0848	1	0,9813	1,0509	0,8245	1,0211	0,7792	0,9258	0,8058
MLH1 ex 1	3519	3103,75	0,639465	0,7067	0,6514	0,6393	0,6846	0,5371	0,6652	0,5076	0,6031	0,5249
MSH2 ex 2A	5476	2718,75	1,031621	1,2554	1,1573	1,1357	1,2162	0,9542	1,1817	0,9018	1,0715	0,9326
MLH1 ex 2	2821	2331,5	0,766541	0,7541	0,6952	0,6822	0,7306	0,5732	0,7099	0,5417	0,6436	0,5602
MSH2 ex 2	3660	1768	1,234426	1,2903	1,1894	1,1672	1,25	0,9807	1,2145	0,9269	1,1012	0,9585
MLH1 ex 3	2258	2259	0,680016	0,623	0,5743	0,5636	0,6035	0,4735	0,5864	0,4475	0,5317	0,4628
MSH2 ex 3	5568	2752,75	1,363413	1,2607	1,1622	1,1405	1,2213	0,9583	1,1867	0,9056	1,076	0,9365
MLH1 ex 4	2184	2206,75	0,632052	0,6169	0,5686	0,558	0,5976	0,4689	0,5806	0,4431	0,5265	0,4582
MSH2 ex 4	4329	2019,75	1,144566	1,3359	1,2315	1,2085	1,2942	1,0154	1,2575	0,9596	1,1402	0,9924
MSH2 ex 1B	5800	2703	1,18533	1,3374	1,2329	1,2099	1,2956	1,0166	1,2589	0,9607	1,1415	0,9935
Control 3	3720	2097,5	0,568852	1,1054	1,019	1	1,0709	0,8402	1,0405	0,7941	0,9435	0,8212
MLH1 ex 5	3515	2947	0,751840	0,7434	0,6853	0,6725	0,7202	0,5651	0,6998	0,534	0,6345	0,5522
MSH2 ex 5	3532	2106,5	0,949448	1,0451	0,9634	0,9454	1,0124	0,7944	0,9837	0,7507	0,8919	0,7763
MSH2 ex 1C	5307	3098,25	0,910032	1,0676	0,9842	0,9658	1,0343	0,8115	1,0049	0,7669	0,9112	0,7931
MLH1 ex 6	3747	2700,5	0,790252	0,8648	0,7972	0,7823	0,8378	0,6573	0,814	0,6212	0,7381	0,6424
MSH2 ex 6	4124	1990,25	1,062280	1,2915	1,1906	1,1683	1,2512	0,9817	1,2157	0,9277	1,1023	0,9594
MLH1 ex 7	3023	2400,25	0,850865	0,785	0,7236	0,7101	0,7605	0,5967	0,7389	0,5639	0,67	0,5831
MSH2 ex 7	3873	1964,5	1,066590	1,2288	1,1328	1,1116	1,1904	0,934	1,1566	0,8827	1,0488	0,9128
MLH1 ex 8	2106	1909,75	0,65459	0,6873	0,6336	0,6218	0,6659	0,5224	0,647	0,4937	0,5866	0,5106
MSH2 ex 8	6020	2444,25	1,412108	1,5351	1,4151	1,3887	1,4871	1,1668	1,4449	1,1027	1,3102	1,1403
MLH1 ex 9	2572	2181	1,068528	0,735	0,6776	0,6649	0,7121	0,5587	0,6919	0,528	0,6273	0,546
Control 4	2967	1791,5	0,98243	1,0323	0,9516	0,9338	1	0,7846	0,9716	0,7415	0,881	0,7668
MSH2 ex 9	2468	1494,75	1,321421	1,0291	0,9487	0,931	0,997	0,7822	0,9687	0,7393	0,8783	0,7645
MLH1 ex 10	1966	1590,25	0,769198	0,7706	0,7103	0,6971	0,7465	0,5857	0,7253	0,5535	0,6577	0,5724
MSH2 ex 10	4899	1935,25	1,261475	1,5778	1,4545	1,4273	1,5285	1,1993	1,4852	1,1334	1,3466	1,1721
MLH1 ex 11	2678	2044,75	0,896768	0,8163	0,7525	0,7385	0,7908	0,6205	0,7684	0,5864	0,6967	0,6064
MSH2 ex 11	3844	2129,75	0,94782	1,125	1,037	1,0177	1,0898	0,8551	1,0589	0,8081	0,9601	0,8357
MLH1 ex 12	2507	1845,75	0,921075	0,8466	0,7804	0,7658	0,8201	0,6435	0,7969	0,6081	0,7225	0,6289
MSH2 ex 12	3943	1957,75	0,986758	1,2553	1,1572	1,1356	1,2161	0,9542	1,1816	0,9018	1,0714	0,9325
MLH1 ex 13	2999	2157,5	0,96773	0,8664	0,7987	0,7838	0,8393	0,6585	0,8155	0,6224	0,7394	0,6436
MSH2 ex 13	2322	1190	1,011353	1,2162	1,1211	1,1002	1,1782	0,9244	1,1448	0,8736	1,038	0,9034
Control 5	3944	1868,5	1,172707	1,3156	1,2128	1,1902	1,2745	1	1,2384	0,9451	1,1229	0,9773
MLH1 ex 14	1573	1206,5	0,84821	0,8126	0,7491	0,7351	0,7872	0,6177	0,7649	0,5837	0,6936	0,6037
MSH2 ex 14	3416	1442,75	1,28668	1,4758	1,3604	1,335	1,4296	1,1217	1,3891	1,0601	1,2595	1,0963
MLH1 ex 15	1557	1445,25	0,610793	0,6715	0,619	0,6074	0,6505	0,5104	0,632	0,4824	0,5731	0,4988
MSH2 ex 15	4239	1984,75	1,200244	1,3312	1,2272	1,2042	1,2896	1,0118	1,253	0,9563	1,1362	0,9889
MLH1 ex 16	2742	2064	0,966603	0,828	0,7633	0,7491	0,8022	0,6294	0,7794	0,5948	0,7067	0,6151
MSH2 ex 16	6193	2403,5	1,220038	1,606	1,4805	1,4528	1,5558	1,2207	1,5117	1,1537	1,3707	1,193
MLH1 ex 17	1885	1383,5	0,894451	0,8492	0,7828	0,7682	0,8227	0,6455	0,7993	0,61	0,7248	0,6308
MLH1 ex 18	2124	1726,75	0,792778	0,7667	0,7068	0,6936	0,7427	0,5827	0,7216	0,5507	0,6543	0,5695
MLH1 ex 19	1830	1692,25	0,776186	0,674	0,6213	0,6097	0,653	0,5123	0,6344	0,4842	0,5753	0,5007
Control 6	2241	1314,75	0,928270	1,0624	0,9794	0,9611	1,0292	0,8075	1	0,7632	0,9067	0,7892
Control 7	4587	2053,75	1,219857	1,3921	1,2833	1,2593	1,3486	1,0581	1,3103	1	1,1881	1,0341
Control 8	4701	2500,75	1,118929	1,1717	1,0801	1,0599	1,1351	0,8906	1,1029	0,8417	1	0,8704
Control 9	2257	1045	1,200093	1,3462	1,241	1,2178	1,3041	1,0232	1,2671	0,967	1,1489	1

Tabla 61, Normalización de los valores de MLPA de la muestra de sangre periférica 17.

Sonda	Altura Paciente	Media altura controles	Promedio correcciones	Cor. control 1	Cor. control 2	Cor. control 3	Cor. control 4	Cor. control 5	Cor. control 6	Cor. control 7	Cor. control 8	Cor. control 9
Control 1	2496	2277,5	1,032329	1	0,9873	1,0492	1,021	1,137	0,9644	0,9453	1,0461	1,1407
Control 2	3094	2787,25	1,045626	1,0129	1	1,0627	1,0341	1,1517	0,9769	0,9575	1,0595	1,1554
MLH1 ex 1	2832	3103,75	0,859486	0,8326	0,822	0,8735	0,85	0,9466	0,803	0,787	0,8709	0,9497
MSH2 ex 2A	2747	2718,75	0,951747	0,9219	0,9102	0,9673	0,9413	1,0483	0,8892	0,8715	0,9644	1,0517
MLH1 ex 2	2617	2331,5	1,057305	1,0242	1,0112	1,0746	1,0457	1,1645	0,9878	0,9682	1,0714	1,1683
MSH2 ex 2	2026	1768	1,079417	1,0456	1,0323	1,097	1,0676	1,1889	1,0084	0,9884	1,0938	1,1927
MLH1 ex 3	2529	2259	1,054544	1,0215	1,0085	1,0717	1,043	1,1615	0,9852	0,9657	1,0686	1,1652
MSH2 ex 3	2824	2752,75	0,966340	0,9361	0,9242	0,9821	0,9557	1,0643	0,9028	0,8849	0,9792	1,0678
MLH1 ex 4	2334	2206,75	0,996276	0,9651	0,9528	1,0125	0,9853	1,0973	0,9308	0,9123	1,0095	1,1009
MSH2 ex 4	2320	2019,75	1,081988	1,0481	1,0348	1,0996	1,0701	1,1917	1,0108	0,9908	1,0964	1,1956
MSH2 ex 1B	2908	2703	1,01339	0,9817	0,9692	1,0299	1,0023	1,1162	0,9468	0,928	1,0269	1,1198
Control 3	2191	2097,5	0,983949	0,9531	0,941	1	0,9731	1,0837	0,9192	0,901	0,997	1,0872
MLH1 ex 5	2860	2947	0,914151	0,8855	0,8743	0,9291	0,9041	1,0069	0,854	0,8371	0,9263	1,0101
MSH2 ex 5	2155	2106,5	0,963647	0,9335	0,9216	0,9794	0,9531	1,0614	0,9003	0,8824	0,9765	1,0648
MSH2 ex 1C	3054	3098,25	0,928506	0,8994	0,888	0,9437	0,9183	1,0227	0,8675	0,8502	0,9409	1,026
MLH1 ex 6	2660	2700,5	0,927832	0,8988	0,8873	0,943	0,9176	1,0219	0,8668	0,8496	0,9402	1,0252
MSH2 ex 6	2336	1990,25	1,105598	1,071	1,0574	1,1236	1,0935	1,2177	1,0329	1,0124	1,1203	1,2217
MLH1 ex 7	2315	2400,25	0,908504	0,8801	0,8689	0,9233	0,8985	1,0006	0,8488	0,8319	0,9206	1,0039
MSH2 ex 7	2051	1964,5	0,98343	0,9526	0,9405	0,9995	0,9726	1,0832	0,9188	0,9005	0,9965	1,0867
MLH1 ex 8	2367	1909,75	1,167492	1,1309	1,1165	1,1865	1,1547	1,2859	1,0907	1,0691	1,183	1,29
MSH2 ex 8	2469	2444,25	0,951497	0,9217	0,91	0,967	0,9411	1,048	0,8889	0,8713	0,9641	1,0514
MLH1 ex 9	2267	2181	0,979102	0,9484	0,9364	0,9951	0,9684	1,0784	0,9147	0,8966	0,9921	1,0819
Control 4	1923	1791,5	1,011101	0,9794	0,967	1,0276	1	1,1136	0,9446	0,9259	1,0245	1,1172
MSH2 ex 9	1642	1494,75	1,034753	1,0023	0,9896	1,0516	1,0234	1,1397	0,9667	0,9475	1,0485	1,1434
MLH1 ex 10	1788	1590,25	1,059093	1,0259	1,0129	1,0764	1,0475	1,1665	0,9895	0,9698	1,0732	1,1703
MSH2 ex 10	2385	1935,25	1,160870	1,1245	1,1102	1,1798	1,1481	1,2786	1,0845	1,063	1,1763	1,2827
MLH1 ex 11	2296	2044,75	1,057703	1,0246	1,0115	1,075	1,0461	1,165	0,9882	0,9685	1,0718	1,1687
MSH2 ex 11	2099	2129,75	0,928359	0,8993	0,8878	0,9435	0,9182	1,0225	0,8673	0,8501	0,9407	1,0258
MLH1 ex 12	1839	1845,75	0,93851	0,9091	0,8976	0,9538	0,9282	1,0337	0,8768	0,8594	0,951	1,037
MSH2 ex 12	2534	1957,75	1,219218	1,181	1,166	1,2391	1,2058	1,3429	1,139	1,1164	1,2354	1,3472
MLH1 ex 13	1991	2157,5	0,869266	0,842	0,8313	0,8834	0,8597	0,9574	0,8121	0,796	0,8808	0,9605
MSH2 ex 13	1509	1190	1,194468	1,1571	1,1423	1,214	1,1814	1,3156	1,1159	1,0938	1,2104	1,3199
Control 5	1801	1868,5	0,907931	0,8795	0,8683	0,9227	0,898	1	0,8482	0,8314	0,92	1,0032
MLH1 ex 14	1299	1206,5	1,014177	0,9824	0,9699	1,0307	1,003	1,117	0,9475	0,9287	1,0277	1,1206
MSH2 ex 14	1618	1442,75	1,056379	1,0233	1,0103	1,0736	1,0448	1,1635	0,9869	0,9673	1,0704	1,1673
MLH1 ex 15	1846	1445,25	1,203153	1,1655	1,1507	1,2228	1,1899	1,3252	1,124	1,1017	1,2192	1,3294
MSH2 ex 15	2360	1984,75	1,120052	1,085	1,0712	1,1383	1,1078	1,2336	1,0464	1,0256	1,1349	1,2376
MLH1 ex 16	2053	2064	0,936939	0,9076	0,8961	0,9522	0,9267	1,0319	0,8753	0,858	0,9494	1,0353
MSH2 ex 16	2646	2403,5	1,036998	1,0045	0,9917	1,0539	1,0256	1,1422	0,9688	0,9496	1,0508	1,1459
MLH1 ex 17	1456	1383,5	0,991321	0,9603	0,9481	1,0075	0,9804	1,0918	0,9261	0,9078	1,0045	1,0954
MLH1 ex 18	1562	1726,75	0,85208	0,8254	0,8149	0,866	0,8427	0,9385	0,7961	0,7803	0,8634	0,9415
MLH1 ex 19	1916	1692,25	1,066506	1,0331	1,02	1,0839	1,0548	1,1747	0,9964	0,9766	1,0807	1,1785
Control 6	1494	1314,75	1,070384	1,0369	1,0237	1,0878	1,0586	1,1789	1	0,9802	1,0846	1,1827
Control 7	2381	2053,75	1,092054	1,0579	1,0444	1,1099	1,0801	1,2028	1,0202	1	1,1066	1,2067
Control 8	2620	2500,75	0,986877	0,956	0,9438	1,003	0,976	1,087	0,922	0,9037	1	1,0905
Control 9	1004	1045	0,905002	0,8767	0,8655	0,9198	0,8951	0,9968	0,8455	0,8287	0,917	1

Tabla 62, Normalización de los valores de MLPA de la muestra tumoral 25.

Sonda	Altura Paciente	Media altura controles	Promedio correcciones	Cor. control 1	Cor. control 2	Cor. control 3	Cor. control 4	Cor. control 5	Cor. control 6	Cor. control 7	Cor. control 8	Cor. control 9
-------	-----------------	------------------------	-----------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

Control 1	1438	2033,5	0,9480147	1	1,2119	0,9178	0,9506	0,916	1,0862	0,8104	0,8416214	0,7972231
Control 2	1654	2834,5	0,7822749	0,8252	1	0,7574	0,7844	0,756	0,8963	0,6687	0,6944822	0,657846
MLH1 ex 1	1566	2155	0,9741926	1,0276	1,2453	0,9432	0,9768	0,942	1,1162	0,8328	0,8648614	0,8192372
MSH2 ex 2A	1838	2118	1,1633755	1,2272	1,4872	1,1263	1,1665	1,125	1,333	0,9945	1,0328128	0,9783285
MLH1 ex 2	1433	1918	1,0016083	1,0565	1,2804	0,9697	1,0043	0,968	1,1477	0,8562	0,8892004	0,8422922
MSH2 ex 2	929	1354	0,9198084	0,9702	1,1758	0,8905	0,9223	0,889	1,0539	0,7863	0,8165807	0,7735034
MLH1 ex 3	1574	1831,5	1,1521212	1,2153	1,4728	1,1154	1,1552	1,114	1,3201	0,9849	1,0228215	0,9688643
MSH2 ex 3	1617	2273	0,9536981	1,006	1,2191	0,9233	0,9563	0,922	1,0928	0,8153	0,846667	0,8020026
MLH1 ex 4	1348	1721,5	1,0497435	1,1073	1,3419	1,0163	1,0526	1,015	1,2028	0,8974	0,9319335	0,8827709
MSH2 ex 4	1618	2152,5	1,0077103	1,063	1,2882	0,9756	1,0104	0,974	1,1546	0,8614	0,8946175	0,8474235
MSH2 ex 1B	1706	2164,5	1,0566272	1,1146	1,3507	1,023	1,0595	1,021	1,2107	0,9032	0,9380446	0,8885597
Control 3	1252	1625	1,0328834	1,0895	1,3204	1	1,0357	0,998	1,1835	0,883	0,9169655	0,8685926
MLH1 ex 5	1800	2395	1,0075517	1,0628	1,288	0,9755	1,0103	0,974	1,1545	0,8613	0,8944767	0,8472901
MSH2 ex 5	1193	1645	0,9722431	1,0256	1,2428	0,9413	0,9749	0,94	1,114	0,8311	0,8631308	0,8175978
MSH2 ex 1C	1938	2460,5	1,0559193	1,1138	1,3498	1,0223	1,0588	1,021	1,2099	0,9026	0,9374162	0,8879644
MLH1 ex 6	1703	2163	1,0555006	1,1134	1,3493	1,0219	1,0583	1,02	1,2094	0,9023	0,9370444	0,8876123
MSH2 ex 6	1450	1902,5	1,0217477	1,0778	1,3061	0,9892	1,0245	0,988	1,1707	0,8734	0,9070796	0,8592282
MLH1 ex 7	1520	2007	1,0153051	1,071	1,2979	0,983	1,018	0,981	1,1633	0,8679	0,90136	0,8538103
MSH2 ex 7	1003	1490,5	0,9021304	0,9516	1,1532	0,8734	0,9046	0,872	1,0337	0,7712	0,8008866	0,7586372
MLH1 ex 8	1314	1742,5	1,0109343	1,0664	1,2923	0,9787	1,0137	0,977	1,1583	0,8642	0,8974797	0,8501347
MSH2 ex 8	2059	2033,5	1,3574146	1,4318	1,7352	1,3142	1,3611	1,312	1,5553	1,1604	1,2050754	1,1415037
MLH1 ex 9	1221	1694,5	0,965994	1,019	1,2349	0,9352	0,9686	0,934	1,1068	0,8258	0,857583	0,8123427
Control 4	1027	1380,5	0,9973197	1,052	1,2749	0,9656	1	0,964	1,1427	0,8525	0,885393	0,8386856
MSH2 ex 9	1354	1105	1,6426942	1,7328	2,0999	1,5904	1,6471	1,588	1,8822	1,4042	1,4583388	1,3814067
MLH1 ex 10	1015	1310	1,0387119	1,0957	1,3278	1,0056	1,0415	1,004	1,1902	0,8879	0,9221399	0,873494
MSH2 ex 10	2112	1855	1,5263367	1,61	1,9512	1,4777	1,5304	1,475	1,7489	1,3048	1,3550398	1,283557
MLH1 ex 11	1331	1659,5	1,0752294	1,1342	1,3745	1,041	1,0781	1,039	1,232	0,9192	0,9545592	0,904203
MSH2 ex 11	1423	1621,5	1,1764901	1,241	1,5039	1,139	1,1797	1,137	1,348	1,0057	1,0444556	0,9893572
MLH1 ex 12	1009	1374	0,9844752	1,0385	1,2585	0,9531	0,9871	0,952	1,128	0,8416	0,8739901	0,8278842
MSH2 ex 12	1475	1876,5	1,0537651	1,1115	1,3471	1,0202	1,0566	1,019	1,2074	0,9008	0,9355037	0,8861528
MLH1 ex 13	1242	1663,5	1,0009195	1,0558	1,2795	0,9691	1,0036	0,968	1,1469	0,8556	0,8885888	0,8417129
MSH2 ex 13	756	996,5	1,0170559	1,0728	1,3001	0,9847	1,0198	0,983	1,1654	0,8694	0,9029143	0,8552826
Control 5	943	1222	1,0345246	1,0913	1,3225	1,0016	1,0373	1	1,1854	0,8844	0,9184226	0,8699728
MLH1 ex 14	631	797,5	1,0607157	1,1189	1,3559	1,0269	1,0636	1,025	1,2154	0,9067	0,9416743	0,8919979
MSH2 ex 14	799	1012	1,0584409	1,1165	1,353	1,0247	1,0613	1,023	1,2128	0,9048	0,9396548	0,8900849
MLH1 ex 15	1092	1306,5	1,1205044	1,1819	1,4324	1,0848	1,1235	1,083	1,2839	0,9579	0,994753	0,9422766
MSH2 ex 15	1053	1471	0,959657	1,0123	1,2268	0,9291	0,9622	0,928	1,0996	0,8204	0,8519572	0,8070136
MLH1 ex 16	1002	1303	1,0309169	1,0874	1,3178	0,9981	1,0337	0,997	1,1812	0,8813	0,9152197	0,8669389
MSH2 ex 16	1631	2086,5	1,0479388	1,1054	1,3396	1,0146	1,0508	1,013	1,2007	0,8958	0,9303313	0,8812533
MLH1 ex 17	677	995	0,9121493	0,9622	1,166	0,8831	0,9146	0,882	1,0451	0,7797	0,8097811	0,7670625
MLH1 ex 18	795	1171,5	0,9097565	0,9596	1,163	0,8808	0,9122	0,879	1,0424	0,7777	0,8076569	0,7650503
MLH1 ex 19	1003	1372	0,9800476	1,0338	1,2528	0,9488	0,9827	0,947	1,1229	0,8378	0,8700593	0,8241609
Control 6	790	1213,5	0,8727456	0,9206	1,1157	0,845	0,8751	0,844	1	0,7461	0,7747996	0,7339263
Control 7	1476	1691,5	1,1698083	1,234	1,4954	1,1326	1,173	1,131	1,3404	1	1,0385237	0,9837382
Control 8	1391	1655,5	1,1264146	1,1882	1,4399	1,0906	1,1294	1,089	1,2907	0,9629	1	0,9472467
Control 9	581	655	1,189146	1,2544	1,5201	1,1513	1,1923	1,149	1,3625	1,0165	1,0556912	1



