



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Prevalencia del Síndrome de Lynch en  
Pacientes con Cáncer de Endometrio no  
Seleccionado

Cecilia Magdalena Egoavil Rojas



Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Prevalencia del Síndrome de Lynch en Pacientes con Cáncer de  
Endometrio no Seleccionado**

*Cecília Magdalena Egoavíl Rojas*

Tesis presentada para aspirar al grado de

**DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

**Universidad de Alicante**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y**

**APLICADA**

Dirigida por:

Dr. José Luis Soto Martínez

Dra. Cristina Alenda González

**2017**



## *DIRECTORES*

**Dr. José Luis Soto Martínez**

Facultativo Especialista

Jefe de la Unidad de Genética Molecular

Hospital General Universitario de Elche



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Dra. Cristina Alenda González**

Facultativo Especialista de Anatomía Patológica.

Directora Científica del Biobanco

Hospital General Universitario de Alicante



## **FINANCIACION**

- **TÍTULO DEL PROYECTO:** *Identificación del Síndrome de Lynch en pacientes con carcinoma de endometrio en población no seleccionada. (AP-177/10)*  
*IP: Cristina Alenda González.*  
*Convocatoria 2009*  
*2010-2011*
- **TÍTULO DEL PROYECTO:** *Estrategia de cribado en pacientes con carcinoma colorrectal y endometrial para la detección del síndrome de Lynch. Análisis de coste-efectividad del proceso. AP/165/11*  
*Convocatoria de ayudas para el desarrollo de proyectos de investigación en materia sanitaria 2011. Consellería Sanidad Comunidad Valenciana.*  
*IP: José Luis Soto Martínez.*  
*2011*

Universidad de Alicante





*A mis padres Jorge y Tula*

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **AGRADECIMIENTOS**

---



*Mi agradecimiento:*

*A mis directores de tesis*

*Dr. José Luis Soto y Dra. Cristina Alenda*

*por darme la oportunidad de trabajar con ellos,*

*admiro su vocación y dedicación a su trabajo.*

*Al personal del Departamento de Anatomía Patológica*

*del HGUA ,HGUE en las personas de*

*Dr Ignacio Aranda y Dra Encarnación Andrada.*

*Y al personal de la UCGC del HGUE*

*en la persona de Ana-Beatriz Sánchez Heras*

*por su apoyo desinteresado durante el desarrollo mis*

*actividades de investigación y formación profesional*

Universitat d'Alacant

Universidad de Alicante

*A Gloria Peiró gracias por su tiempo y  
dedicación en parte de este proyecto.*

*Agradezco los consejos y el cariño recibido.*

*Especial a Dra Adela Castillejo, Dr Víctor Barberá*

*e Isabel Castillejo de quienes he aprendido la importancia*

*del trabajo metódico y me han transmitido el*

*entusiasmo por la investigación*



*Mi agradecimiento*

*A mis compañeras y amigas*

*Dra Carla Guarinos, Dra Eva Hernandez, Dra Ana Martinez,*

*Dra Araceli García, Dra Lucia Perez, Dra Laura Sánchez*

*Dra Maria Rodriguez Soler, a quienes agradezco*

*su amistad y apoyo.*

*En especial a la Dra Miriam Juárez, por compartir  
conmigo momentos de agobio, gracias por  
la ayuda, el apoyo constante y el inmenso  
cariño que he recibido*

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

*Por último, quiero agradecer a mi familia, a mis padres,*

*por el apoyo que siempre me han dado.*

*En especial a Rolandllescas, por su paciencia y ayuda que*

*hizo posible la realización de este trabajo.*



## RESUMEN

El síndrome de Lynch (SL) es una condición hereditaria que aumenta el riesgo de cáncer endometrial y otros tipos de cáncer. La identificación de pacientes de cáncer de endometrio (CE) con SL tiene el potencial de influir en intervenciones que alteran el curso de la enfermedad e incrementan la expectativa de vida del sujeto afectado. Nuestro objetivo fue estudiar la prevalencia de SL entre los pacientes de CE en nuestra población. MÉTODOS: El cribado universal para SL se realizó en una serie de casos consecutivos de CE. Para seleccionar los casos sospechosos de SL se analizaron la inestabilidad de microsatélites (IMS), la inmunohistoquímica (IHC) por la expresión de las proteínas (MMR) y cuando fue necesario, el análisis de metilación de *MLH1*. Se realizó la secuenciación de los correspondientes genes MMR en los casos sospechosos de SL. RESULTADOS: 173 casos de CE (edad promedio, 63 años) fueron seleccionados. 61 pacientes (35%) tuvieron resultados de IHQ o IMS anormales. Después del análisis de metilación *MLH1*, 27 casos fueron considerados sospechosos de SL. De éstos, 22 pacientes fueron contactadas y remitidas para asesoramiento genético. 19 de ellas continuaron con pruebas genéticas y 8 fueron diagnosticadas de SL. Las mutaciones fueron más frecuentes en pacientes más jóvenes (<50 años). Tres casos tuvieron IHQ o MSS intacto, lo cual refuerza la necesidad de implementar el cribado de CE con ambas técnicas. Del estudio de familiares 68% (17/25) eran portadores de mutación (edad promedio, 39.6 años) 4 con neoplasia asociada al SL. CONCLUSIÓN: La prevalencia de SL en pacientes con CE fue de 4,6% (8/173); Con una frecuencia predictiva de 6,6% en la población española. Se recomienda el cribado universal de CE para SL.





## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Lynch syndrome (LS) is a hereditary condition that increases the risk for endometrial and other cancers. The identification of endometrial cancer (EC) patients with LS has the potential to influence life-saving interventions. We aimed to study the prevalence of LS among EC patients in our population. **METHODS:** Universal screening for LS was applied for a consecutive series EC. Tumor testing using microsatellite instability (MSI), immunohistochemistry (IHC) for mismatch-repair (MMR) protein expression and *MLH1*-methylation analysis, when required, was used to select LS-suspicious cases. Sequencing of corresponding MMR genes was performed. **RESULTS:** One hundred and seventy-three EC (average age, 63 years) were screened. Sixty-one patients (35%) had abnormal IHC or MSI results. After *MLH1* methylation analysis, 27 cases were considered suspicious of LS. From these, 22 were contacted and referred for genetic counseling. Nineteen pursued genetic testing and eight were diagnosed of LS. Mutations were more frequent in younger patients (<50 yrs). Three cases had either intact IHC or MSS and reinforce the need of implement the EC screening with both techniques. From relatives analysis 68% (17/25) were mutation carrier (average age, 39.6 years) 4 had a neoplasm-LS. **CONCLUSION:** The prevalence of LS among EC patients was 4.6% (8/173); with a predictive frequency of 6.6% in the Spanish population. Universal screening of EC for LS is recommended.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ÍNDICE**

---



# ÍNDICE

GLOSARIO .....	xvii
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 GENÉTICA DEL SÍNDROME DE LYNCH.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 MECANISMOS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES .....	7
1.1.2 ALTERACIONES EN LOS GENES REPARADORES Y FENOTIPO CLÍNICO ASOCIADO.....	8
1.1.3 CAUSAS ALTERNATIVAS DEL SÍNDROME DE LYNCH.....	13
1.1.3.1 EPIMUTACION EN LÍNEA GERMINAL DEL <i>MLH1</i> .....	13
1.1.3.2 EPIMUTACIÓN DEL <i>MSH2</i> POR DELECIÓN DEL <i>EPCAM</i> .....	14
1.1.4 TIPOS DE MUTACIONES EN LOS GENES DE LA VÍA REPARADORA SEGÚN SU SIGNIFICADO CLÍNICO .....	16
<b>1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 CAMBIOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH Y SU IMPACTO CLÍNICO .....	22
1.3.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH.....	23
1.3.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO EN SÍNDROME DE LYNCH.....	25
<b>1.4 TUMORES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE LYNCH.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 VARIANTES CLÍNICAS DEL SÍNDROME DE LYNCH .....</b>	<b>29</b>
1.5.1 SÍNDROME DE DEFICIENCIA CONSTITUCIONAL DE MMR (CMMRD).....	29
1.5.2 SÍNDROME DE MUIR-TORRE .....	29
1.5.3 SÍNDROME LYNCH-LIKE .....	30
<b>1.6 IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE LYNCH.....</b>	<b>31</b>
1.6.1 APROXIMACIONES CLÍNICAS AL SÍNDROME DE LYNCH .....	31
1.6.2 ESTUDIO DEL TUMOR CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH .....	34
1.6.2.1 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SISTEMA MMR POR INMUNOHISTOQUÍMICA.....	35
1.6.2.2 EVALUACIÓN DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	35
1.6.3 ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE LYNCH .....	37
<b>2 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>3 HIPÓTESIS .....</b>	<b>43</b>

4	OBJETIVOS .....	44
4.1	OBJETIVOS PRINCIPALES.....	44
4.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	44
5	MATERIAL Y MÉTODO.....	45
5.1	DISEÑO DEL ESTUDIO .....	45
5.2	VARIABLES A ESTUDIO.....	46
5.3	INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y CODIFICACIÓN .....	48
5.4	RECOGIDA DE VARIABLES.....	49
5.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	77
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	77
6	RESULTADOS.....	79
6.1	CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE ENDOMETRIO .....	79
6.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	80
6.3	CARACTERÍSTICAS RELACIONAS CON EL SÍNDROME DE LYNCH.....	82
6.4	ALTERACIONES DE LA VÍA REPARADORA .....	84
6.5	DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES CON SOSPECHA DE SL Y CE ESPORÁDICO .....	86
6.6	ANÁLISIS EN LÍNEA GERMINAL DE MUTACIONES EN GENES DE LA VIA REPARADORA ..	90
6.7	CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES .....	94
6.8	CRITERIOS DE BETHESDA.....	106
6.7	ESTUDIO FAMILIAR.....	108
7	DISCUSIÓN.....	116
8	CONCLUSIONES.....	128
9	ANEXOS.....	129
10	REFERENCIAS .....	135

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>TABLA 1. Riesgo de cáncer estimado a lo largo de la vida para individuos con SL</i>	5
<i>TABLA 2. Heterogeneidad fenotípica por defectos en línea germinal de MMR</i>	11
<i>TABLA 3. Riesgo de cáncer a los 70 años en individuos con Síndrome de Lynch comparado con la población general.</i>	12
<i>TABLA 4. Inactivación heterocigoto de EPCAM y/o MSH2 en el riesgo de CCR y CE entre portadores mutaciones en línea germinal que inactivan MSH2.</i>	15
<i>TABLA 5. Resumen de las recomendaciones y tipo de evidencia de la Clasificación de las Variaciones en Línea germinal para el Síndrome de Lynch.</i>	18
<i>TABLA 6. Sensibilidad y especificidad para Síndrome de Lynch utilizando deferentes estrategias.</i>	34
<i>TABLA 7. Criterios clínicos para el diagnóstico del síndrome de Lynch.</i>	49
<i>TABLA 8. Anticuerpo. Fuente clona, dilución y método de detección usados</i>	52
<i>TABLA 9. Secuencias de los primers (cebadores) se marcadores de microsatélites</i>	56
<i>TABLA 10. Distribución por Grupo etario de los pacientes con cáncer de endometrio.</i>	79
<i>TABLA 11. Características Clínico-patológicas en pacientes con cáncer de endometrio.</i>	81
<i>TABLA 12. Características relativas al Síndrome de Lynch en pacientes con cáncer de endometrio</i>	83
<i>TABLA 13. Descripción de las alteraciones de la Vía Reparadora en los pacientes con cáncer de endometrio.</i>	85
<i>TABLA 14. Análisis comparativo de los factores asociados con el riesgo de Síndrome de Lynch y cáncer de endometrio esporádico.</i>	87
<i>TABLA 15. Análisis comparativo de los factores asociados con MMR alterado y normal en Tumores de endometrio.</i>	89



<i>TABLA 16. Patrón de expresión proteica por IHQ pacientes con sospecha de SL.</i>	90
<i>TABLA 17. Estudio comparativo de pacientes con CE asociado a SL vs CE esporádico</i>	92
<i>TABLA 18. Características de los pacientes con mutación en línea germinal de Síndrome de Lynch con Cáncer de endometrio.</i>	93
<i>TABLA 19. Síndrome de Lynch en relación a los criterios de Bethesda.</i>	107
<i>TABLA 20. Resumen de los estudios de detección universales del Síndrome de Lynch en el Cáncer Endometrial.</i>	126



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA 1. Esquematización de la función del sistema MMR que interaccionan formando heterodímeros en respuesta a agentes mutagénicos.</i>	9
<i>FIGURA 2. Distribución de los tipos de Variantes en Línea Germinal en cada gen MMR. Análisis basado en los datos del InSiGHT<sup>87</sup> y se restringe a variantes con cambios en la codificación. EL número total de variantes por gen incluidos en el análisis son 1104 para MLH1, 883 para MSH2 414 para MSH6 y 197 para PMS2.</i>	19
<i>FIGURA 3. Frecuencia de mutaciones en línea germinal con predisposición a cáncer hereditario en mujeres con Cáncer de Endometrio.</i>	21
<i>FIGURA 4. Estrategia de estudio genético de síndrome de Lynch en pacientes con CCR o CE diagnosticado antes de los 70 años recomendado por el programa de consejo genético en cáncer familiar de la Comunidad Valenciana.</i>	40
<i>FIGURA 5. Estrategia de estudio genético de síndrome de Lynch en pacientes que cumplen criterios de Bethesda recomendado por el programa de consejo genético en cáncer familiar de la Comunidad Valenciana.</i>	41
<i>FIGURA 6. Expresión proteica por técnica de Inmunohistoquímica de las proteínas MMR en tumores malignos de endometrio.</i>	53
<i>FIGURA 7. Condiciones de PCR multiplex de los marcadores monomórficos.</i>	56
<i>FIGURA 8. Electroferograma del estudio de Inestabilidad de Microsatélites</i>	57
<i>FIGURA 9. Análisis de Hipermetilación del promotor de MLH1. (MS-MLPA©DNA Methylation ME011-A1 MMR o ME011-B1.</i>	60
<i>FIGURA 10. Condiciones de PCR para BRAF V600E.</i>	61
<i>FIGURA 11. Procedimiento a seguir para el análisis genético de MLH1, MSH2 y MSH6:</i>	63
<i>FIGURA 12. Condiciones de PCR para MLH1 todos los exones excepto 12.1 y MSH2 todos los exones</i>	65
<i>FIGURA 13. Condiciones de PCR para MLH1 exón 12.1.</i>	65
<i>FIGURA 14. Condiciones de PCR para MSH6 exón 1</i>	66

<i>FIGURA 15. Condiciones de PCR para MSH6 exones 2-7 y exón 10</i>	67
<i>FIGURA 16. Condiciones de PCR para MSH6 exones 8 y 9.</i>	67
<i>FIGURA 17. Condiciones de PCR para secuenciación.</i>	68
<i>FIGURA 18. Algoritmo de trabajo para la identificación de pacientes con Síndrome de Lynch.</i>	75
<i>FIGURA 19. Algoritmo del circuito asistencial de las Unidad de Consejo Genético en Cáncer.</i>	76
<i>FIGURA 20. Distribución por Grupo etario de los pacientes cáncer de endometrio.</i>	80
<i>FIGURA 21. Cromatografía de la secuencia genética del gen MLH1. Se muestra la mutación frameshift encontrada c.2154_2157insAACA no descrita en InSiGHT, detectada en el caso End 131.</i>	95
<i>FIGURA 22. Resultado del estudio de MLPA MLH1-MSH2 del caso End 111. Se observa una delección del exón 1 al 3 afectando a las tres sondas de sendos exones que incluye el kit de Salsa MLPA P003.</i>	96
<i>FIGURA 23. Cromatografía de la secuencia genética del gen MSH2. Se muestra la mutación frameshift encontrada c.1226_1227delAG. Detectada en el caso End 091.</i>	97
<i>FIGURA 24. Resultado del estudio de MLPA MLH1-MSH2 del caso End 03. Se observa una delección del exón 9 y 10 afectando a las dos sondas de dicho exón que incluye el kit de Salsa MLPA P003.</i>	98
<i>FIGURA 25. Cromatografía de la secuencia genética del gen MSH6 exón 4. Se muestra la mutación encontrada c.2731C&gt;T heterocigosis. Detectada en el caso End 14.</i>	99
<i>FIGURA 26. Cromatografía de la secuencia genética del gen MSH6. Se muestra la mutación nonsense encontrada c.1367G&gt;A no descrita en InSiGHT. Detectada en los casos End 88 y End 137.</i>	100
<i>FIGURA 27. Resultado del estudio de MLPA de PMS2 del caso End 034. Se observa una delección del exón 6 afectando a las dos sondas de dicho exón que incluye el kit MLPA PMS2 P008-B1 PMS2 exón 6 heterocigoto.</i>	103
<i>FIGURA 28. Esquema de la localización de la delección y estimación del tamaño de la región del exón 6 del PMS2.</i>	104

<i>FIGURA 29. Esquema de la Endonucleasa PMS2 (P54278) y la localización de los dominios de la proteína. Se señala la localización de la zona de ledeción del exón 6 c.538-?_705+?del</i>	105
<i>FIGURA 30. Pedigree familiar para una mujer de 41 años de edad con una mutación en la línea germinal en MLH1 (Caso # End 131). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.</i>	109
<i>FIGURA 31. Pedigree familiar para una mujer de 44 años de edad con una mutación en la línea germinal en MSH2 (Caso # End 111). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch. Presenta CE.</i>	110
<i>FIGURA 32. Pedigree familiar para una mujer de 40 años de edad con una mutación en la línea germinal en MSH2 (Caso # End 91). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch. Los estudios realizados en la familia no se realizaron en nuestra UCGC.</i>	111
<i>FIGURA 33. Pedigree familiar para una mujer de 44 años de edad con una mutación en la línea germinal en MSH2 (Caso # End 03). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.</i>	112
<i>FIGURA 34. Pedigree familiar para una mujer de 61 años de edad con una mutación en la línea germinal en MSH6 (Caso # End 14). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.</i>	113
<i>FIGURA 35. Pedigree familiar para una mujer de 60 años de edad con una mutación en la línea germinal en MSH6 (Caso # End 88 Y 137). Esta paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.</i>	114
<i>FIGURA 36. Pedigree familiar para un mujer de 60 años de edad con una mutación en la línea germinal en PMS2 (Caso # End 34). Esta paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.</i>	115





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

---



## LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AmlI Criterios de Ámsterdam

*APC: Adenomatous polyposis coli*

ARN: Ácido ribonucleico

*BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CCHNP: Cáncer colorectal hereditario no polipósico

CCR: cáncer colorrectal

CMMRD: Síndrome de Deficiencia Constitucional de MMR

CE: cáncer de endometrio

*EPCAM: Epithelial cell adhesión molecule*

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

IHQ: Inmunohistoquímica

IMS: Inestabilidad de microsatélites

*MLH1: Human MutS Homologue 1*

MLPA: Multiplex Ligation Probe Amplification (Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación)

MMR: Mismatch repair (reparación de errores de emparejamiento)

*MSH2: Human MutS Homologue 2*

*MSH3: Human MutS Homologue 3*

*MSH6: Human MutS Homologue 6*

MS-MLPA: Methylation sensitive-Multiplex Ligation Probe Amplification

MSS: estabilidad en microsatélites

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

rBG Recomendaciones de Bethesda

SIR: Standardized incidence ratios (tasas de incidencia estandarizada)

SL: Síndrome de Lynch

SLL: Síndrome *Lynch-like*

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

TMA: Tissue matrix array (matriz de tejidos)

VNC: Variación del número de copias

VSD: Variante genética de significado clínico desconocido







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**GLOSARIO**

---



## GLOSARIO

**Caso índice:** Individuo afecto que se selecciona para realizar el estudio genético inicial de detección de mutaciones. Generalmente, se selecciona en base a su disponibilidad y la edad más temprana de diagnóstico de cáncer y/o el número de tumores padecidos.

**DNA mismatch repair (MMR) (Corrección del ADN defectuoso):** Mecanismos de reparación de los errores producidos durante la replicación del ADN.

**Epimutación Constitucional:** Alteración epigenética somática, normalmente hipermetilación, que se detecta en diferentes tejidos.

**Especificidad:** Proporción de individuos sanos que tienen un resultado negativo en un test.

**Fenotipo mutador:** Un cáncer con una alta carga de mutaciones somáticas en todo el genoma (>12 mutaciones por 10<sup>6</sup> bases). Hace referencia a tumores que presentan un elevado número de mutaciones en todo el genoma. Normalmente es debido a pérdida de funcionalidad en los mecanismos de reparación de los errores del ADN.

**Inestabilidad de microsatélites (IMS):** Se produce cuando hay una deficiencia funcional en el sistema MMR y genera mutaciones somáticas generalizadas en el genoma en secuencias repetitivas llamadas microsatélites (mono, di, o trinucleótidos repetidos). Las mutaciones son de tipo inserción/delección de las unidades de repetición.

**Inmunohistoquímica:** Proceso para obtener imágenes de antígenos selectivos en células o tejidos a través del principio de unión antígeno-anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un fluoróforo o a una enzima como la peroxidasa.

**Islas CpG:** Son regiones de ADN y conforman aproximadamente un 40% de promotores de los genes de mamíferos. Son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos. La "p" en CpG representa que están enlazados por un fosfato. Al contrario de sitios de CpG ubicados en la región codificante de un gen, en la mayoría de los casos, la citosina en las islas CpG está desmetilada si los genes están expresándose. Esta observación conlleva a la especulación de que la metilación de los sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión de un gen.

**Metilación:** Es la adición de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a una molécula. La metilación se observa tanto en el ADN como en proteínas.

**Metilación CpG:** Fenómeno epigenético que consiste en la metilación del Carbono 5 de la citosina de un dinucleótido CpG. La hipermetilación de las citosinas puede ser un mecanismo de regulación de la expresión génica cuando afecta a las regiones promotoras de los genes.

**Microsatélite estable (MSS):** No se evidencia alteraciones en el número de repeticiones de los microsatélites, por lo que se asume que el sistema MMR está operativo.

**Mutación constitucional:** mutación presente en todas las células del organismo.

**Mutación en línea germinal:** Alteración genética presente en células germinales o gametos que puede ser heredada por la progenie.

**Mutación fundadora:** Mutación que es común a varias familias de una población dada que tiene un ancestro común.

**Promotor:** Región que controla la expresión de un gen

**Sensibilidad:** La sensibilidad de una prueba es la probabilidad de que un sujeto enfermo tenga un resultado positivo en la prueba..

**Tumores colorrectales sincrónicos:** múltiples CCR al diagnóstico y dentro de los 6 meses después de la resección quirúrgica de un CCR.

**Tumores colorrectales metacrónicos:** CCR que ocurre después de los 6 meses de la resección quirúrgica de un CCR.

**Variantes:** variaciones genotípicas detectadas sobre la secuencia consenso

**Tipos de mutación asociadas a SL:**

**Missense:** tipo de mutación puntual que consiste en un cambio de nucleótido de un triplete (codón) que ocasiona un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína..

**Nonsense:** tipo de mutación puntual que consiste en un cambio de nucleótido de un triplete (codón) que ocasiona un codón de parada prematuro y como consecuencia una proteína truncada..

**Inserción:** tipo de mutación puntual que consiste en la adición de uno o varios nucleótidos que puede ocasionar o no, un cambio en el patrón de lectura a

partir de la mutación. Si el número de nucleótidos que se insertan es de tres o múltiplo de tres, el resultado es una inserción sin cambio en la pauta de lectura y por tanto solo se adicionará uno o varios aminoácidos. Si el número de nucleótidos que se inserta es por el contrario, diferente a múltiplo de tres el efecto es una alteración en la pauta de lectura que ocasiona una secuencia de aminoácidos diferente y suele crear codones de parada prematuros y por tanto, proteínas aberrantes y truncadas.

**Delección:** tipo de mutación puntual que consiste en la pérdida de uno o varios nucleótidos que puede ocasionar o no, un cambio en el patrón de lectura a partir de la mutación. Si el número de nucleótidos que se delecionan es de tres o múltiplo de tres, el resultado es una delección sin cambio en la pauta de lectura y por tanto solo se perderá uno o varios aminoácidos. Si el número de nucleótidos que se deleciona es por el contrario, diferente a múltiplo de tres el efecto es una alteración en la pauta de lectura que ocasiona una secuencia de aminoácidos diferente y suele crear codones de parada prematuros y por tanto, proteínas aberrantes y truncadas..

**Duplicación:** Consiste en que un fragmento de ADN se copia anormalmente una o varias veces.

**Frameshift:** Ocurre cuando la adición o pérdida de bases del ADN cambia el marco de lectura de un gen. Un marco de lectura consta de un grupo de tres bases que codifican un aminoácido. Una mutación *frameshift* cambia el agrupamiento de estas bases y cambia el código de aminoácido; la proteína resultante usualmente no funciona.

**Inversión:** Un defecto en el cromosoma en el que un segmento del cromosoma se rompe y se reinserta en el mismo lugar, pero en la dirección inversa con respecto al resto del cromosoma.

**Splice site:** Mutaciones que afectan a las secuencias consenso implicadas en el mecanismo de corte y empalme para el ensamblaje de los exones (splicing) durante el proceso de maduración del ARN mensajero. Las mutaciones en sitios consenso de splicing producen splicing aberrantes y como consecuencia pérdida de funcionalidad.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## INTRODUCCIÓN

---



# 1 INTRODUCCIÓN

Identificar formas hereditarias de neoplasias entre los pacientes con cáncer, es crucial para mejorar el manejo y prevención de otras formas malignas asociadas, en el paciente y sus familiares<sup>1</sup>.

Se han descubierto más de 100 síndromes hereditarios de susceptibilidad a desarrollar cáncer y en muchos de ellos se conocen los genes asociados. Los individuos con mutaciones en línea germinal presentan un elevado riesgo a diferentes tipos de cáncer, según el síndrome que se trate.

El diagnóstico genético de un síndrome de cáncer hereditario en una familia con la sospecha clínica, permite identificar a los individuos sanos de la familia que tienen un alto riesgo de desarrollar cánceres asociados al síndrome para recibir asesoramiento. El diagnóstico genético permite ofrecer medidas de prevención, vigilancia, seguimiento y tratamiento precoz e incluso preventivo de forma personalizada.

El síndrome de Lynch (SL) es la principal causa hereditaria de cáncer de colon, recto (CCR) y endometrio (CE) y está asociado a las mutaciones en línea germinal en los genes reparadores de la replicación del ADN. Representa alrededor del 2-5% de todos los CCR<sup>2,3</sup>. Ha habido un progreso significativo en el conocimiento de la patogénesis, vías moleculares, valoración del riesgo, bases genéticas e incluso prevención (programas de cribado) en el CCR asociado al SL. Sin embargo sólo hasta estos últimos años el enfoque se ha

desplazado hacia las mujeres con SL, que tienen un 40%-60% de probabilidad de desarrollar CE como primera manifestación clínica<sup>4</sup> y tiene más potencial de influir en la detección precoz y prevención de otros cánceres, que el diagnóstico de CCR asociado al SL.

El SL, identificada originalmente por el patólogo Aldred Scott Warthin en 1895 y estudiada posteriormente por Henry Lynch en 1966, ha recibido diversos nombres, en 1971 Lynch, H. T. & Krush, la llamaron Síndrome de Cáncer Familiar para describir a las familias con mayor incidencia de cáncer<sup>5</sup>. La comunidad científica de la época no aceptó fácilmente la idea de una etiología genética del síndrome, porque iba en contra del dogma que primaba en el momento, que consideraba como causa del cáncer a *los factores medioambientales*, que con frecuencia compartían los familiares; a pesar de ello, los reportes iniciales permitieron reconocer sus características fenotípicas, y establecer criterios diagnósticos y guías de manejo, dando inicio a la “era clínica” en la historia del SL<sup>6</sup>.

C. Richard Boland en 1984<sup>7</sup> fue el primero en sugerir el término Síndrome de Lynch, sin embargo el mismo año Lynch utilizó el término Cáncer Colorectal Hereditario no polipósico (HNPCC)<sup>8</sup> a fin de diferenciarlo de la Poliposis Adenomatosa Familiar. La pertinencia del nombre se discutió nuevamente en el International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer en Bethesda el 2004, allí se propuso reintroducir el nombre SL, por su asociación con tumores extra-colónicos<sup>9</sup>. Finalmente, fue Kalady *et al* en 2013<sup>10</sup>, quien demostró que el término HNPCC es inadecuado, al observar una elevada incidencia de pólipos adenomatosos en pacientes con SL.

El 50% de mujeres con SL presentan en primer lugar, cáncer de endometrio. Realizar el diagnóstico de SL en el momento del diagnóstico del CE, podría ser una estrategia coste-eficaz, aunque a día de hoy no hay datos que lo avalen.

Puede ser más coste-eficaz, principalmente porque la mortalidad de la CCR es mucho mayor que la de la CE. Actualmente, a pesar de que varios grupos a nivel nacional e internacional están enfocando sus investigaciones en CE y SL, las nuevas aportaciones en este campo siguen en plena evolución. La mayoría de los médicos y proveedores de atención de la salud no son conscientes de las características clínico-patológicas del CE relacionado al SL. Además, su actividad se dificulta por la falta de consenso en cuanto a la forma de hacer el diagnóstico desde la perspectiva clínico-patológica y la mejor manera de confirmar el diagnóstico de SL a nivel genético.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 1.1 GENÉTICA DEL SÍNDROME DE LYNCH

El Síndrome de Lynch es uno de los primeros síndromes hereditarios reconocidos con alto riesgo de presentar cáncer a lo largo de la vida y uno de los más prevalentes. Si uno de los progenitores presenta una mutación patogénica responsable del síndrome, la probabilidad de cada uno de los hijos de heredar el rasgo genético es del 50%.

El SL ocurre por deficiencia funcional del proceso de reparación de ADN que corrige los errores producidos durante su replicación, lo cual predispone a varios tipos de cánceres, principalmente de colon, recto y endometrio<sup>11,12,13</sup> pero también ovario, estómago, intestino delgado, urotelio, cerebro, hepatobiliar, páncreas, vejiga, riñón, próstata y mama<sup>14,15,16,17,18,19,20,21</sup>. Se estima que el riesgo de presentar una neoplasia a lo largo de la vida en el SL es de un 22-75% para el CCR y de 32-45% para el CE<sup>22,23,24</sup> como se muestra en las Tablas 1 y 2.

Además, el SL ocurre entre 2% y 4% de sujetos con CCR, y su prevalencia en la población general se acerca a 1:440<sup>12,25,26</sup> (aunque esto puede estar subestimado por la carencia actual de test sistemáticos). El riesgo de un segundo CCR primario en individuos con SL es elevado (estimado en 16% a los 10 años) y el riesgo de un cáncer asociado al SL en un familiar de primer o segundo grado es aproximadamente 45% para varones y 35% para mujeres a los 70 años<sup>27</sup>.

**TABLA 1. Riesgo de cáncer estimado a lo largo de la vida para individuos con SL**

Cáncer	Riesgo de cáncer estimado a lo largo de la vida para individuos con SL (%)	Riesgo de cáncer estimado a lo largo de la vida para la Población General (%)
CCR a los 70 años	Varones:38 Mujeres:31	5.0-6.0
Endometrio	Mujeres:33	Mujeres:2.0-3.0
Gástrico	0.7	1
Ovario	Mujeres: 9	Mujeres: 1.0-2.0
Intestino Delgado	0.6	0.01
Tracto Urinario	1.9–8.4	4
Cerebro	4	0.6
Riñón, Pelvis renal	3	1
Vías Biliares	0.6	0.5
Páncreas	0.4–3.7	1.4
Próstata	Varones: 9.1–30.0	Varones: 13.2
Mama	Mujeres: 5.4–14.4	Mujeres: 12.9

Adaptado de Lynch et al <sup>6</sup>

Las alteraciones genéticas que causan el SL son mutaciones en línea germinal que mayoritariamente son: a) *mutación puntuales* en regiones codificantes o de *splicing* en alguno de los genes reparadores del ADN: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (sistema MMR), b) *grandes reordenamientos* (deleciones o duplicaciones) que afectan a dichos genes, delecionadas en la región terminal del gen *EPCAM* y zona intergénica *EPCAM-MSH2*, c) *epimutación constitucional* del *MLH1* y *MSH2*<sup>3,28</sup> y c) *Inversiones* que involucran exones del gen *MSH2*<sup>29,30</sup>.

Para que el cáncer se desarrolle, el gen mutado del sistema MMR debe sufrir posteriormente una segunda mutación patogénica espontánea en el alelo



normal de las células del colon, endometrio u otro órgano afecto. Esta segunda mutación somática ocurre focalmente en un tejido y en consecuencia se altera o detiene la producción de la proteína. La ausencia de una proteína implica la pérdida en la reparación de errores que se producen en el ADN durante la replicación de las células. Esto implica una acumulación de mutaciones a lo largo del genoma que podrían afectar a genes clave en el mantenimiento de la homeostasis celular. En consecuencia, podría provocar un deterioro crítico en la fisiología celular, pudiendo afectar el control de otros genes que regulan las actividades funcionales, estructurales, de crecimiento y desarrollo celular, conduciendo al desarrollo de cáncer.

Los tumores de los pacientes con SL presentan unas alteraciones moleculares características, que se descubrieron en ciencias básicas paralelamente a la *era clínica* del SL y que explicaron los mecanismos de la patogénesis de los cánceres asociados al SL.

En los años 70s, se reconoció que las secuencias repetitivas de 2 a 6 nucleótidos denominados microsatélites, incrementan el riesgo de mutaciones tipo frameshift <sup>31,32,33</sup> y que estas mutaciones ocurrían con más frecuencia cuando las secuencias se introducían en estirpes de *Escherichia coli mut S* y *mut L* <sup>34</sup>. Estudios posteriores en el *Saccharomyces cerevisiae*, demostraron que las mutaciones en los genes *MSH2* (homólogo del MutS)) *MLH1* (homologo al MutL) incrementaban hasta en 700 veces la inestabilidad de las secuencias repetitivas <sup>35</sup>. En 1993 el grupo del Dr. Manuel Perucho describieron la existencia de cánceres colorrectales humanos en los que se producían mutaciones de tipo pequeñas inserciones y deleciones en los microsatélites de

una forma generalizada a nivel de todo el genoma<sup>36</sup>. Estos hallazgos llevaron a establecer el concepto de *fenotipo mutador*, que se manifiesta con inestabilidad de microsatélites (IMS), consecuencia de una alteración en el sistema de reparación del ADN.

### **1.1.1 MECANISMOS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES**

Los microsatélites son repeticiones en tándem de nucleótidos en el ADN frecuentes a lo largo de todo el genoma, son polimórficas entre individuos pero únicas y de longitud uniforme en cada tejido de cada persona por lo que es utilizada en estudios forenses, mapeo genético y análisis de discriminación alélica<sup>37</sup>.

Los genes reparadores del ADN involucrados en el SL son el *MutL homologue 1* (*MLH1*), los *Mut S homologue 2* y *6* (*MLH2* y *MLH6*) y el *postmeiotic segregation increased 2* (*PMS2*)<sup>38,39,40,41,42</sup>

Durante la replicación del ADN que tiene lugar en el núcleo celular de forma previa a la mitosis se pueden producir errores en la fidelidad de las nuevas copias de ADN generadas. Estos errores son especialmente patentes en zonas repetitivas en tándem, como son los microsatélites. En el proceso de replicación las regiones repetitivas más largas pueden formar horquillas que al ser replicadas producen deleciones en el número de repeticiones que serán heredadas por las células hijas, y así sucesivamente en cada mitosis. Si estas regiones repetitivas están en regiones codificantes de genes, las deleciones pueden generar cambios en el patrón de lectura y en consecuencia, codones de parada prematuros y proteínas truncadas. Se han descrito una serie de genes que son diana del fenotipo IMS y que tienen un papel en la

carcinogénesis de este subtipo de tumores con inestabilidad de microsatélites<sup>43</sup>.

### **1.1.2 ALTERACIONES EN LOS GENES REPARADORES Y FENOTIPO**

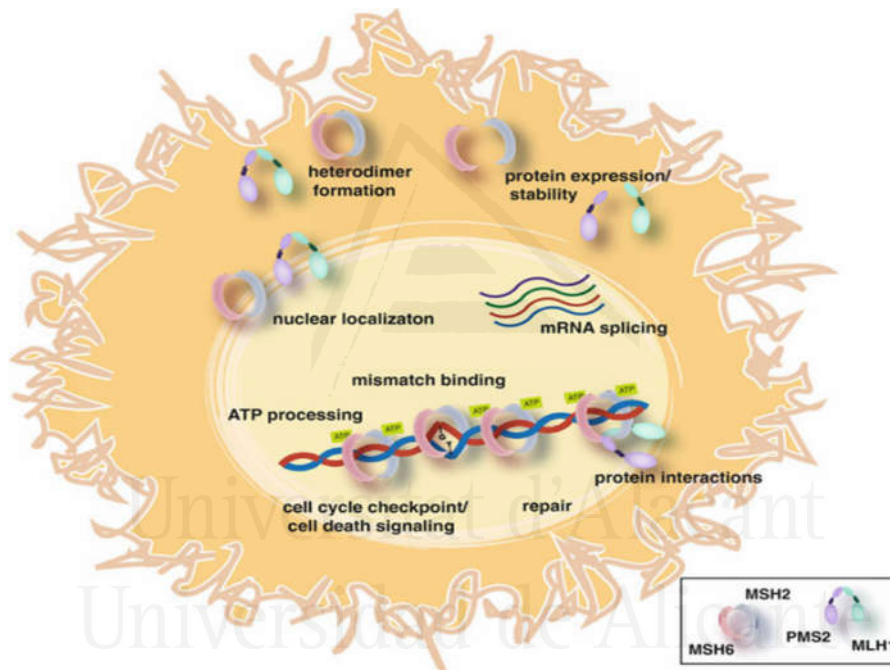
#### **CLÍNICO ASOCIADO**

La reparación del ADN es un mecanismo importante para conservar el genoma y el correcto funcionamiento celular. La principal función de las proteínas MMR es mantener la estabilidad genómica corrigiendo los errores de mal apareamiento de una base y bucles de inserción/delección (IDL) que pueden ocurrir durante la replicación<sup>44</sup>. Las proteínas MMR reconocen otros tipos de daño endógeno o exógeno como la inducida por oxidación<sup>45</sup> o alcalinización<sup>46</sup> la corrigen y si no es posible, activan las señales de apoptosis y muerte celular. Las proteínas MMR regulan la recombinación genética durante la meiosis, corrigiendo los errores de emparejamiento o suprimiendo la recombinación entre las secuencia homologas<sup>47</sup>. Además las proteínas MMR permiten y promueven la hipermutación somática en las regiones hipervariables de los genes que codifican para las inmunoglobulinas, permitiendo así la generación de una enorme variabilidad en la especificidad de los anticuerpos<sup>48</sup>.

En humanos el sistema MMR está conformado por cinco proteínas homólogas al MutS (MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 y MSH6) y cuatro proteínas homólogas al MutL (MLH1, PMS1, PMS2, y MLH3) los cuales forman heterodímeros en diferentes combinaciones. El heterodímero hMutS $\alpha$ , conformado por MSH2 y MSH6, reconoce bases únicas mal apareadas e IDLs. Otro heterodímero hMutS $\beta$ , formado por MSH2 y MSH3 reconoce principalmente bucles IDLs. Al detectar una zona de error del ADN el complejo hMutS sufre un cambio

conformacional dependiente de ATP y recluta un heterodímero hMutL el cual puede ser hMutL $\alpha$  (MLH1 y PMS2) que participa en la reparación de un solo nucleótido o un IDLs, o alternativamente el heterodímero hMutL $\gamma$  compuesto por MLH1 y MLH3 que contribuye a reparar principalmente IDLs <sup>49,50</sup>.

**FIGURA 1.** Esquematización de la función del sistema MMR que interaccionan formando heterodímeros en respuesta a agentes mutagénicos.



Extraído de Heinen and Rasmussen 2012<sup>51</sup>

Las mutaciones en cualquiera de ellas, conducen a la IMS, pero ocasionan una expresión fenotípica heterogénea según el gen afectado, (Tabla 2 y 3), esto dificulta la identificación de los sujetos sospechosos de padecer la enfermedad.

Además de los fenotipos diferentes en función del gen mutado, el riesgo de cáncer a lo largo de la vida es significativamente mayor en los portadores de

mutación en *MSH2* y *MLH1* comparado con los portadores de mutaciones en *MSH6* o *PMS2*; esto puede reflejar la redundancia funcional de las proteínas *MSH6* con el *MSH3* y del *PMS2* con los *MLH3* y *PMS1* antes visto.

El riesgo de cáncer a los 70 años de cualquier cáncer asociado al SL para portadores de mutaciones en *MSH2* está entre 57%<sup>52</sup> y 80%<sup>53</sup> y para los portadores de mutaciones en *MLH1* está entre 59%<sup>52</sup> y 65%<sup>53</sup>. En el caso de los portadores de mutación en *MSH6* el riesgo alcanza el 24% para varones y 40% en mujeres<sup>54</sup>. Los portadores de mutaciones heterocigotos para *PMS2* pueden tener hasta un 25–32 % de riesgo de cáncer a lo largo de su vida<sup>55</sup>.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**TABLA 2. Heterogeneidad fenotípica por defectos en línea germinal de MMR**

Mecanismo causal	Heterogeneidad fenotípica asociada
Mutación Heterocigoto del <i>MLH1</i>	SL: predomina CCR, Neoplasias extracolonicas menos infrecuente que en mutaciones del <i>MSH2</i>
Mutación Heterocigoto del <i>MSH2</i>	SL: Mayor frecuencia de neoplasias extracolonicas.
Mutación Heterocigoto del <i>MSH6</i>	SL: <b>Predomina CE</b> , los tumores presentan IMS de bajo nivel.
Mutación Heterocigoto del <i>PMS2</i>	SL: Pueden tener mayor número de pólipos, baja frecuencia de cáncer.
Delección Heterocigoto del <i>EPCAM</i>	SL: Expresión silente del <i>MSH2</i> , bajo riesgo de neoplasias extracolonicas, <b>si la delección es cercana a <i>MSH2</i> se incrementa el riesgo de CE.</b>
Epimutación monoalélica del <i>MLH1</i>	SL: Expresión fenotípica semejante a los portadores de mutación del <i>MLH1</i> , algunos casos son heredados, pero con frecuencia es un defecto epigenético que surge <i>de novo</i> .
Mutación bialélica de cualquier de los cuatro genes MMR	Síndrome de deficiencia constitucional de MMR: presencia de Cáncer a edades pediátricas: hematológicas, CCR, Tracto urinario, glioblastomas, neurofibromatosis.

Tabla adaptada de Lynch et al 2015<sup>6</sup>



**TABLA 3.** Riesgo de cáncer a los 70 años en individuos con Síndrome de Lynch comparado con la población general.

Cancer	General Population Risk <sup>1</sup>	MLH1 or MSH2 <sup>1,2</sup>		MSH6 <sup>2</sup>		PMS2 <sup>3</sup>	
		Risk	Mean Age of Onset	Risk	Mean Age of Onset	Risk	Mean Age of Onset
Colon	5.5%	52%–82%	44–61 years	10%–22%	54 years	15%–20%	61–66 years
Endometrium	2.7%	25%–60%	48–62 years	16%–26%	55 years	15%	49 years
Stomach	<1%	6%–13%	56 years	≤3%	63 years	†	70–78 years
Ovary	1.6%	4%–24% <sup>5</sup>	42.5 years	1%–11%	46 years	†	42 years
Hepatobiliary tract	<1%	1%–4%	50–57 years	Not reported	Not reported	†	Not reported
Urinary tract	<1%	1%–7% <sup>6</sup>	54–60 years	<1%	65 years	†	Not reported
Small bowel	<1%	3%–6%	47–49 years	Not reported	54 years	†	59 years
Brain/CNS	<1%	1%–3%	~50 years	Not reported	Not reported	†	45 years
Sebaceous neoplasms	<1%	1%–9%	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Pancreas <sup>4</sup>	<1%	1%–6%	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported

1 Adaptado de Kohlmann W, Gruber SB (Actualizado Mayo 22, 2014) Síndrome de Lynch. En: GeneReviews at Gene Test: Medical Genetics Information Resource (base de datos online). Copyright, Universidad de Washington, Seattle. 1993-2014. Disponible en <http://www.genetests.org>. Acceso en Abril 20, 2016. 2 Bonadona V, et al. JAMA 2011;305:2304-2310. 3 Senter L, et al Gastroenterology 2008;135:419-428 4 Kastrinos F, et al. JAMA 2009; 302:1790-1795. 5 El 24% de riesgo reportado por Bonadona V et al (JAMA 2011;305:2304-2310) incluyó intervalos de confianza amplios (1%-65% para MLH1; 3%-52% para MSH2).6 El riesgo para mutaciones MSH2 puede ser mayor (Joost P, et al. Urology 2015;86:1212-1217). † El riesgo combinado de renal pélvico, estómago, ovario, intestino delgado, uréter, y cerebro es 6% para la edad de 70 (Senter L, et al. Gastroenterology 2008; 135:419-428)

(extraído de NCCN Guidelines® Genetic/Familial High-Risk Assessment: CRC Version 2.2016)<sup>56,57</sup>





### 1.1.3 CAUSAS ALTERNATIVAS DEL SÍNDROME DE LYNCH

Se han identificado otros mecanismos de alteración genética en el SL, adicionales de las mutaciones en los genes del sistema MMR. En algunos casos ocurre por *epimutación constitucional*, que consiste en el silenciamiento aberrante de un gen, normalmente activo, en células somáticas y en ausencia de mutación<sup>58</sup>. Se han descrito epimutaciones constitucionales del *MLH1*<sup>59,60,61</sup> y *MSH2*<sup>62,63</sup> en familias con SL sin mutación aparente en los genes MMR.

#### 1.1.3.1 EPIMUTACION EN LÍNEA GERMINAL DEL *MLH1*

La epimutación en *MLH1* se caracteriza por la metilación monoalélica de las islas CpG de la región promotora de *MLH1* que ocurre de forma constitutiva en todas las células somáticas. El cáncer se puede generar cuando ocurre un segundo evento que inactiva (genético o epigenético) el alelo no metilado<sup>64,60,61,65</sup>.

Se han descrito casos en los que la epimutación constitucional en *MLH1* tiene carácter hereditario autosómico dominante y está relacionado con la variante de nucleótido único (SNV) c.-27C>A en el promotor en línea germinal<sup>66,67</sup> y a una duplicación en línea germinal que engloba al gen *MLH1* y genes adyacentes<sup>68</sup>. No obstante, en la mayoría de casos descritos, no se puede evidenciar una herencia de tipo autosómico, probablemente debido a un proceso que no se transmite a la descendencia, por la reversibilidad del mantenimiento de los patrones de metilación durante en la meiosis<sup>69</sup>.

Los mecanismos precisos por el cual ocurre el silenciamiento epigenético constitucional del *MLH1* aún no están definidos. La epimutación de *MLH1* sirve

como primer evento en la carcinogénesis, por tanto, si ocurre solamente la pérdida de heterocigosidad del alelo no metilado o una mutación somática (segundo evento) sería suficiente para que se desarrolle el tumor y se provoque la pérdida de expresión de la proteína en IHQ e IMS en el tumor<sup>64,59,70</sup>.

Parece ser que la epimutación constitucional en *MLH1* ocurre con una frecuencia de 1% - 10% en pacientes con cáncer que reúnen criterios para SL con pérdida de expresión en IHQ de *MLH1* sin mutación en línea germinal y en los pacientes con CCR esporádicos con IMS y *MLH1* hipermetilado<sup>71,72,73</sup>.

#### **1.1.3.2 EPIMUTACIÓN DEL *MSH2* POR DELECIÓN DEL *EPCAM***

Otro mecanismo genético que causa el SL es la delección heterocigoto en línea germinal del gen *epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)*. Este gen codifica para una molécula de adhesión presente en todas las células de estirpe epitelial y está localizado a 17 kb delante (“aguas arriba”) del gen del *MSH2* en el cromosoma 2<sup>63</sup>. Esta delección engloba al menos los dos últimos exones (8 y 9) del gen *EPCAM*<sup>74</sup> provocando la metilación de toda la región intergénica y afectando al promotor del gen *MSH2*<sup>75</sup>.

Esta inactivación es monoalélica y tiene carácter autosómico dominante, además la hipermetilación de la región circundante a la delección se produce solamente en aquellos tejidos de estirpe epitelial que expresan la proteína *EPCAM*, por lo tanto los pacientes portadores de la delección de *EPCAM* mostrarán un patrón mosaico en la inactivación del *MSH2*, observándose niveles altos de metilación en epitelio colónico normal<sup>62</sup> pero no en otros tejidos, como el endometrial<sup>63</sup>, por esta razón, los pacientes portadores de una

delección del *EPCAM* presentarán un fenotipo modificado del SL, que ha demostrado tener un riesgo similar de CCR que los portadores de una mutación en *MSH2*, pero un riesgo muy reducido de CE<sup>76,77</sup> (Tabla 4), y un riesgo de transmisión a los descendientes del 50%<sup>63,78</sup>

**TABLA 4.** Inactivación heterocigoto de *EPCAM* y/o *MSH2* en el riesgo de CCR y CE entre portadores mutaciones en línea germinal que inactivan *MSH2*.

	Inactivación de gen		Riesgo de cáncer	
	<i>EPCAM</i>	<i>MSH2</i>	CCR	CE
Delección 3'end <i>EPCAM</i>	Sí	Mosaico	Alto	Bajo
Delección <i>EPCAM-MSH2</i>	Sí	Sí	Alto	Alto
Delección Intragenica <i>MSH2</i>	No	Sí	Alto	Alto

Adaptado de Ligtenberg *et al.* 2013<sup>79</sup>

El riesgo de cáncer depende de si la delección afecta solamente al gen *EPCAM* o al conjunto *EPCAM-MSH2*, y puede variar con respecto a los portadores de una mutación en el gen *MSH2* produciéndose diferencias en tipo y espectro de tumor<sup>76</sup>. Se calcula que al menos un 3% de los casos con SL se deben a mutaciones por delección del *EPCAM*<sup>80</sup>.

Los tumores del SL con pérdida de expresión de *MSH2* y *MSH6* tienen hipermetilación del *MSH2* por delección del *EPCAM* en 20% a 25% de casos<sup>79</sup>. Por tanto estos pacientes deben ser evaluados para delecciones germinales en *EPCAM* si no se identifica mutación germinal en *MSH2*.

#### **1.1.4 TIPOS DE MUTACIONES EN LOS GENES DE LA VÍA REPARADORA SEGÚN SU SIGNIFICADO CLÍNICO**

Si bien la identificación de variantes genéticas es un proceso bien estandarizado desde el punto de vista analítico, la clasificación de las variantes genéticas detectadas según su significado clínico continúa siendo un reto.

En general, las variantes genéticas, que son consideradas como patogénicas son: *a)* aquellas que producen un codón de parada prematuro (*nonsense* y *frameshift*), *b)* las variantes en sitios consenso de *splicing*, *c)* los grandes reordenamientos, todas las deleciones y las duplicaciones cuyos puntos de corte afectan a la secuencia codificante o *splicing*.

La clasificación de otro tipo de variantes como las pequeñas inserciones o deleciones *in frame* (que no se altera la pauta de lectura del ADN), así como una buena parte de variantes de tipo *missense* que no están descritas como polimorfismos, son consideradas como de significado clínico desconocido (VSD).

La clasificación de las VSD como patogénicas o no patogénicas es un proceso complejo que requiere de la integración de los resultados de diferentes líneas de evidencia como: frecuencia de la variante en controles, cosegregación de la variante con la enfermedad, predicción *in silico* de la patogenicidad, análisis funcionales en modelos *in vitro*, análisis de alteraciones genéticas-epigenéticas en el tumor, etc.<sup>81</sup>.

Clínicamente se requiere conocer el nivel de penetrancia de una mutación o variante para establecer el tipo de manejo del sujeto afectado y sus familiares, y se han propuesto varios esquemas de clasificación<sup>82,83,84</sup>.

La Sociedad Internacional de Tumores Hereditarios Gastrointestinales (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors (InSIGHT)) ha recogido información de más de 3100 secuencias de variantes de los genes de MMR<sup>85</sup> depositadas en una base de datos pública (<http://insight-group.org/variants/database/>) y las han clasificado en 5 grupos, según las recomendaciones de la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer (IARC) (Tabla 5 y Figura 2), las clases 4 y 5 son consideradas como variantes “probablemente patogénicas” y “patogénicas” respectivamente, lo que implica que se las considera como mutación causal y de alto riesgo, por consiguiente, se debe seguir un protocolo de seguimiento y manejo para el individuo portador y sus familiares.

Las clases 2 y 1 indican que las variantes son “probablemente no patogénicas” y “no patogénicas” respectivamente y deben ser tratadas como “mutación no detectada” en la práctica clínica<sup>86</sup>. Thomsom *et al* encuentra que la mayoría de variantes clase 4 y 5 (59%) del InSIGHT son de tipo *nonsense* y *frameshift*; y que las variantes intrónicas y las *missense* representan hasta el 89% (42% y 47% respectivamente) de las variantes de clase 1 y 2<sup>85</sup>.



**TABLA 5.** Resumen de las recomendaciones y tipo de evidencia de la Clasificación de las Variaciones en Línea germinal para el Síndrome de Lynch.

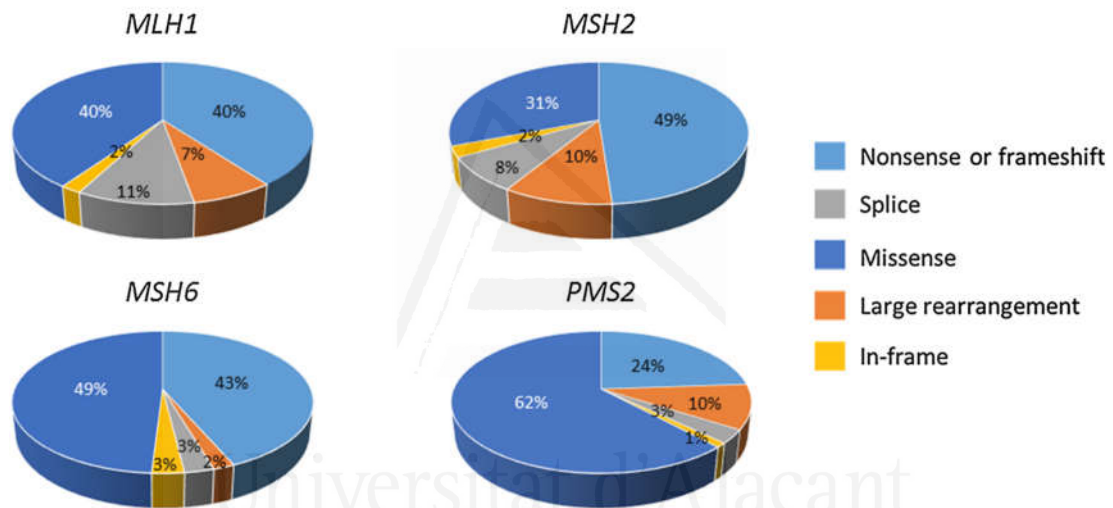
Clase 5 Patogénica	Clase 4 Patogénica	Clase 3 Patogénica	Clase 2 Patogénica	Clase 3 Patogénica
Nonsense/frameshif			Antecedentes Familiares $\geq$ 1% en grupos étnicos específicos	Antecedentes Familiares $\geq$ 1% en grupos de referencia control
○			○	○
Grandes deleciones			Variantes intrónicas sin alteración en el ARNm	PP < 0.001
○			○	○ 3 puntos de evidencia, si la función es adecuada, de lo contrario se requieren 4 puntos:
Grandes Duplicaciones confirmadas que codifican un frameshif que	Inactivación completa de un alelo variante por un <i>splicing</i> aberrante		PP 0.001- 0.049	- Función adecuada o co-ocurrencia sin MMRD.
○	○	PP 0.05- 0.949	<b>2 puntos de evidencia si la función es adecuada, de lo contrario se requieren 3 puntos:</b>	- Antecedentes Familiares 0.01- 1%.
Inactivación completa de un alelo variante por un <i>splicing</i> aberrante	PP 0.95- 0.99	○	- Función adecuada o co-ocurrencia sin MMRD.	- No Co-segregación con enfermedad.(LR 0.01: 1)
○	<b>o 2 puntos de evidencia:</b>	Insuficiente evidencia para	- Antecedentes Familiares 0.01- 1%.	- $\geq$ 3 CCR estables, o con IHQ inconsistente.
PP > 0.99	- CMMRD		- No Co-segregación con enfermedad.(LR 0.01: 1)	- Odds Ratio >95% IC menor de 4en estudios caso-control
<b>○ 4 puntos de evidencia:</b>	- Co-segregación con enfermedad.(LR 5:1)		- $\geq$ 3 CCR estables, o con IHQ inconsistente.	
- CMMRD	- $\geq$ 2 tumores con fenotipo molecular de SL..		- Odds Ratio >95% IC menor de 4en estudios caso-control	
- Co-segregación con enfermedad ( LR 10:1)				
- $\geq$ 2 tumores con fenotipo molecular de SL..				
- Ausencia en 1000				

Adaptado de Thomson *et al* 2014<sup>85</sup>





**FIGURA 2.** Distribución de los tipos de Variantes en Línea Germinal en cada gen MMR. Análisis basado en los datos del InSiGHT<sup>87</sup> y se restringe a variantes con cambios en la codificación. EL número total de variantes por gen incluidos en el análisis son 1104 para *MLH1*, 883 para *MSH2* 414 para *MSH6* y 197 para *PMS2*.



Extraído de Pálvi Peltomáki 2016<sup>88</sup>.



## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

La incidencia y la mortalidad estimada de cáncer de endometrio (CE) en Europa en 2012 fueron de 58.300 y 24.400, respectivamente. El CE representa aproximadamente el 4% de todos los cánceres en mujeres<sup>89</sup>. En UE se esperaba para el 2016 una tasa de incidencia estandarizada (SIR) 4.69 (4.58-4.80) y el fallecimiento de 28900 por esta causa<sup>90</sup>. La incidencia está aumentando y aproximadamente el 5% de los casos se cree que son el resultado de una predisposición genética<sup>91,92</sup>.

El cáncer uterino es una neoplasia ginecológica común en España. En 2012 representó el 5,9% de todas las neoplasias malignas, después cáncer de mama y CCR, con 5121 casos nuevos<sup>93</sup>. El CE representa la mayoría del cáncer uterino, mientras que los sarcomas uterinos son menos comunes, menos del 5% de todo el cáncer uterino<sup>92</sup>

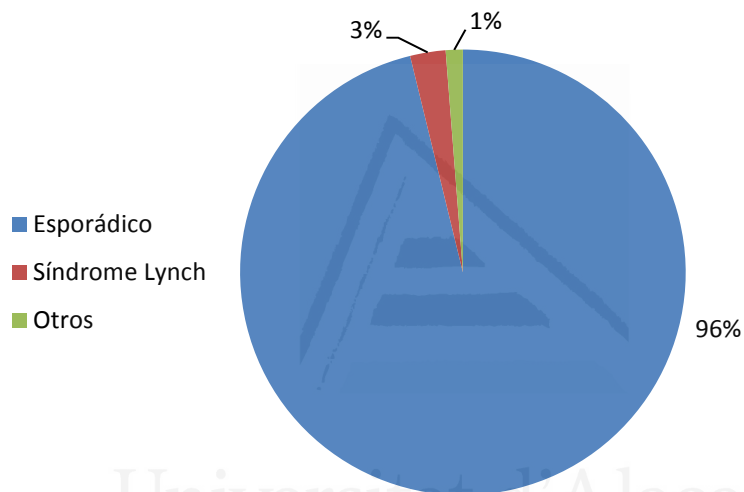
En la población general, el riesgo de CE está significativamente influenciado por los factores de riesgo de historia clínica personal, aumenta con la edad y la mayoría de los casos se diagnostican en mujeres de 50-60 años<sup>94,95</sup>. La obesidad aumenta en 7 veces el riesgo de CE<sup>96</sup>, y el uso de anticonceptivos orales disminuye el riesgo de CE en un 50%<sup>97</sup>. En las mujeres con CE diagnosticado antes de los 50 años, un mayor índice de masa corporal se asoció con menor probabilidad de SL<sup>98</sup>.

Otros factores de riesgo para el CE son la diabetes mellitus<sup>99</sup> la hipertensión arterial, el síndrome de ovario poliquístico-anovulación, la nuliparidad, la exposición a estrógenos exógenos<sup>94,95,100</sup> y actividad física<sup>101</sup>. La mayoría de



los casos de CE son esporádicos, sin embargo la acumulación en las familias, se produce en cerca del 5% <sup>92</sup>. Sólo el 2% -3% de todos los cánceres endometriales son hereditarios y casi todo el cáncer endometrial hereditario es atribuible al SL <sup>102,103</sup>.

**FIGURA 3.** Frecuencia de mutaciones en línea germinal con predisposición a cáncer hereditario en mujeres con Cáncer de Endometrio.



Adaptado de Daniels M et al. <sup>102</sup>



## **1.3 CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH**

La incidencia de SL en población no seleccionada de pacientes con CE es de 2%-3%, sin embargo es posible que esté subestimada porque algunas poblaciones pueden tener frecuencias de mutación diferente y porque la importancia clínica aún es incierta<sup>12</sup>.

El cáncer de endometrio es el segundo cáncer más común asociado al SL<sup>104,53,105,106,52</sup> y con frecuencia es el tumor centinela (50%)<sup>107</sup>. Las mujeres con SL tienen 40%-70% más riesgo de desarrollar CE que la población general femenina y tienen un riesgo a lo largo de la vida mayor de desarrollar CE que CCR<sup>108,109</sup>. El riesgo de desarrollar CCR en mujeres con SL a lo largo de la vida es de 42.7% y el riesgo de desarrollar cualquiera de éstos carcinomas es el 73,4%<sup>110</sup>. Además el riesgo de CE en mujeres con SL tras un primer CCR es de 26% a los 10 años de la cirugía<sup>111</sup>, y un 50% a los 15 años después del diagnóstico inicial de CE<sup>112</sup>.

El riesgo durante toda la vida de CE está asociado con la edad, suele presentarse en edades tempranas pero el rango es amplio de 48-62 años<sup>113,105</sup>.

### **1.3.1 CAMBIOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH Y SU IMPACTO CLÍNICO**

La tasa de mutación de los genes MMR muestra una frecuencia en el gen *MSH2* de 50-66%, en *MLH1* de 24-40%, en *MSH6* de 10-13% y en *PMS2* de 5%<sup>52</sup>.



En comparación con el CE, la tasa de mutación genética en los CCR asociados a SL muestra algunas diferencias, es decir, la tasa de mutación *MSH2* es más alta en los CCR asociados al SL, las mutaciones en *MLH1*, son segunda más frecuente en los CE y CCR asociados al SL. Aunque la tasa de mutación general de *MSH6* es relativamente baja (10-13%), está estrechamente relacionado con los CE asociados a SL<sup>52,12</sup>, mientras que la tasa de mutación en *PMS2* es inferior al 5% entre los CE<sup>55</sup>, la de más baja frecuencia.

Se reconoce que en SL, el riesgo de CE es igual o mayor que el riesgo de CCR y el riesgo durante toda la vida de la CE relacionada con SL está asociado con la mutación de un gen MMR específico. Los pacientes con mutaciones *MSH6* están en mayor riesgo (64%-71%) para el desarrollo de CE que aquellos con mutaciones en *MSH2* o *MLH1* (40%-50%)<sup>114,54</sup>.

Como se mencionó previamente, además de las mutaciones en los genes del sistema MMR, el SL puede ocurrir por inactivación del *MSH2* por delección del *EPCAM*, aunque no está claro si las consecuencias fenotípicas son las mismas que para la inactivación directa de *MSH2*. En particular, el riesgo de CE puede ser menor en las mujeres con delecciones de *EPCAM*<sup>75</sup>.

### **1.3.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE LYNCH**

Se ha pensado durante mucho tiempo que el CE asociado al SL se produce a edades más jóvenes que en casos esporádicos. En un estudio, la edad media en el diagnóstico de SL relacionados con CE fue de 49 años en comparación

con los 60 años para el CE en la población general<sup>115</sup>. En una cohorte no seleccionada de cánceres endometriales con edad menor de 50 años, la incidencia de SL fue del 9%<sup>98</sup>. Sin embargo, otros han encontrado la edad media en una cohorte prospectiva no seleccionada de 54 años<sup>116</sup>. Si se hubiera seleccionado un límite de edad de 50 años para la selección de SL, el 60% de los pacientes habrían sido perdidos<sup>117</sup>. De hecho, otros han descrito que el 25% de los pacientes SL no se ajustan a los criterios estándar de cribado, como los criterios de Amsterdam, Bethesda, donde la edad es un factor prominente (límite de edad 50)<sup>107</sup>.

En el SL, el 50% de los CE se presentan primero antes del diagnóstico de CCR, si los diagnósticos no son sincronos. Por lo tanto, el CE puede servir como un cáncer "centinela" para los propios pacientes y potencialmente para los miembros de su familia, además, la mayoría de pacientes con CE son sintomáticas en estadios iniciales y tiene una tasa de supervivencia a los 5 años del 85%<sup>118</sup> lo que proporciona un tiempo adecuado para detectar un segundo cáncer, que conduzca a la prevención a un diagnóstico y tratamiento más precoz y una identificación más temprana de la familia en riesgo.

Pacientes con CE asociado al SL no suelen tener evidencia de sobre estimulación de estrógenos, como obesidad, diabetes, uso exógeno de estrógenos y síndrome de ovario poliquístico. Pueden presentar sangrado irregular, pero es menos probable que se asocie con hiperplasia endometrial antes del diagnóstico de CE. Se sospecha que existe CE asociado al SL cuando se diagnostica un CE en una paciente sin factores de riesgo de CE. Además, el bajo índice de masa corporal, la edad relativamente joven, y la

historia familiar positiva o cánceres relacionados al SL deben plantear la sospecha de CE asociado al SL.

### **1.3.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO EN SÍNDROME DE LYNCH**

Las características histopatológicas del CE asociado al SL no se han podido definir como en el caso de CCR, aunque Kobayashi *et al.* en 1995<sup>119</sup> encontraron que la IMS ocurre con más frecuencia en los CE pobremente diferenciados, los intentos de encontrar una correlación histopatológica útil en la detección de SL han sido infructuosos. Por lo tanto, la historia clínica personal debe considerarse como parte de la evaluación hereditaria del riesgo de cáncer en mujeres con CE.

Al igual que en los CEs esporádicos, la histología de los CE asociados al SL es predominantemente endometriode (96%)<sup>120</sup>. Sin embargo, los CEs asociados al SL tienen una histología variada e incluye a los subtipos endometroide y no endometroide, incluyendo el carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma de células claras, carcinoma endometrial seroso, carcinoma indiferenciado y el tumor mixto maligno uterino mixto (carcinosarcoma)<sup>120,121,122</sup>.

El CE asociado a SL tiene tendencia a invadir el segmento uterino inferior, Westin *et al.* (2008) encontraron que el 34% de CE localizados en el segmento inferior tenían niveles altos de IMS y de ellos el 29% presentó una mutación del SL<sup>123</sup>. Estos porcentajes son altos comparados con los CE no seleccionados<sup>120,124,125</sup>. Además el CE asociado a SL con localización baja se asocia con mutación en *MSH2*<sup>52</sup>.

## 1.4 TUMORES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE LYNCH

***Cáncer Colorectal Asociado al Síndrome de Lynch.*** En el SL el CCR es el tumor más frecuente y se presenta en pacientes jóvenes con una edad media de diagnóstico de 45 años, El riesgo a desarrollar CCR a los 70 años alcanza el 82%, dependiendo del gen afectado<sup>126</sup>(Tabla 3). La localización en el lado derecho (proximal a la flexura esplénica) es lo más frecuente (60-80%) frente al 30% en el caso de los CCR esporádicos<sup>127</sup> y la incidencia de tumores sincrónicos y metacrónicos es elevada<sup>128</sup>. El riesgo de desarrollar un nuevo CCR tras la resección quirúrgica alcanza a 16 % a los 10 años<sup>129</sup> y 41 % a los 20 años<sup>130,131</sup>.

El estudio histológico muestra las características como: *Células en anillo de sello, Histología mucinosa, Pobremente diferenciado: Patrón medular, con frecuentes figuras mitóticas y linfocitos intratumorales (LIT)*<sup>132,133</sup>. *Margen expansivo.* A este conjunto de hallazgos histológicos se le denominaron “histología IMS” por su asociación con la presencia IMS, sin embargo se ha detectado que hasta un 6% de CCR con IMS, no tiene ninguna de las características mencionadas<sup>134</sup>. A pesar de ello, Hamilton *et al*<sup>135</sup>, Bartley *et al.*<sup>136</sup> y Deschoolmeester *et al.*<sup>133</sup> enfatizan que los rasgos patológicos pueden ser útiles para distinguir a los CCR asociados SL de los CCR esporádicos.

Los pacientes con SL presentan una carcinogénesis acelerada. Se ha observado que la progresión de un adenoma a carcinoma puede ocurrir en 2 a 3 años, a diferencia de la población general en quienes el proceso puede tomar de 8 a 10 años<sup>137,138,139</sup>. Esto ha llevado a las recomendaciones de examen colonoscópico anual en sujetos con SL.

**Cáncer Urotelial.** Incluye aquellos que se originan en el uréter y pelvis renal, es 22 veces más frecuente en pacientes con SL que en la población general y los varones tienen 1,6 veces más riesgo que las mujeres<sup>140,141</sup>. Se estima que el riesgo de presentar cáncer urinario a lo largo de la vida es de 0.2 a 25%<sup>53,105</sup>.

**Cáncer de Vejiga.** Su asociación con el SL ha sido controvertido, sin embargo, Engel *et al.*<sup>142</sup> observaron que el riesgo acumulado a los 70 años de los varones con SL fue del 5.5% y del 3.5% para mujeres, y el riesgo frente a la población general se incrementa 8.5 veces para varones y 16.2 veces para mujeres portadoras de una mutación. Además se encontró un riesgo incrementado cáncer de vejiga en pacientes con mutación en *MSH2* comparado con portadores de mutación en *MLH1* y *MSH6*<sup>141,142</sup>.

**Cáncer de ovario.** Es relativamente raro, se estima que el riesgo de cáncer de ovario en las mujeres con SL es 14 veces mayor que la población general<sup>143,142,140</sup>. La literatura sugiere que suelen ser de tipo endometrioides o de células claras, y que suele presentarse a edades más tempranas que en la población general, el promedio de 45 años de edad<sup>144</sup>. Además suele tener una mayor tasa de mutación *MSH2*<sup>144,140</sup>.

**Cáncer de estómago.** Algunos estudios estiman que el riesgo de cáncer gástrico a lo largo de la vida en pacientes con SL es de hasta 13%<sup>52,53,145,146,140</sup>. Sin embargo Capelle LG *et al.* observa que en Norteamérica y el este de Europa el riesgo de cáncer gástrico a lo largo de la vida fue de 8.0% para varones y 5.3% en mujeres con mutaciones en *MMR*<sup>147</sup>. La mayoría son de tipo intestinal y potencialmente susceptible de seguimiento endoscópico<sup>146,147</sup>.

**Cáncer en Intestino Delgado.** El riesgo de cáncer Intestino delgado a lo largo de la vida en pacientes con SL es de hasta entre 0.4 a 12%<sup>52,53, 104,105,142,145</sup>. Al parecer en su mayoría se localizan en duodeno e íleon<sup>148</sup>.

**Cáncer de próstata.** Pacientes con SL tienen un riesgo acumulado para cáncer de próstata de 30% a los 70 años y se presenta a una edad menor que el cáncer esporádico<sup>20</sup>.

**Otros cánceres.** Existe conflicto en establecer el riesgo de otros cánceres extracolónicos en pacientes con SL como el cáncer de páncreas, mama; algunos estudios muestran ligeros incrementos mientras que otros no encuentran diferencias significativas respecto a la población general. (Tabla 2 y 3) Sin embargo se ha establecido que las pautas de seguimiento de estas neoplasias no difiere de la población general<sup>14</sup>.

Por otro lado, aunque el riesgo de glioblastomas y neoplasias sebáceas es mayor que la población general (<1%), llegando a alcanzar 4% para glioblastomas y 9% para los tumores sebáceos sólo se recomienda un examen físico anual que incluya examen de la piel<sup>149</sup>.

## **1.5 VARIANTES CLÍNICAS DEL SÍNDROME DE LYNCH**

### **1.5.1 SÍNDROME DE DEFICIENCIA CONSTITUCIONAL DE MMR**

#### **(CMMRD)**

Se trata de individuos con mutación patogénica bialélica en genes MMR. La prevalencia del CMMRD sigue siendo desconocida, sin embargo los hijos de un matrimonio de dos portadores tienen un 25% de probabilidad de que sean homocigotos para la mutación, es decir, tener mutaciones bialélicas en el ADN de los genes MMR. Clínicamente estas mutaciones se manifiestan con cánceres asociados a SL y del sistema hematológico (leucemias, linfomas) en edades muy tempranas, tumores cerebrales, signos de neurofibromatosis tipo 1 (manchas *café au lait*), síndrome de Turcot (coexistencia de CCR y tumor cerebral) y oligopoliposis en intestino delgado y colon<sup>150,151,152</sup>.

El peculiar espectro tumoral de este síndrome refleja la sensibilidad particular de las células progenitoras a la deficiencia de MMR vía un gen diana específico, la mutación en *NF1*<sup>153,152</sup>.

### **1.5.2 SÍNDROME DE MUIR-TORRE**

El síndrome de Muir-Torre (SMT) es una variante rara del SL se caracteriza por una alta incidencia de neoplasias de glándulas sebáceas, raras en la población general, (adenomas sebáceos y carcinomas) o tumores del folículo piloso (keratoacantomas) en pacientes con SL<sup>154</sup>. Estos pacientes presentan mutaciones preferentemente en el gen *MHS2*<sup>155</sup>. En el 25% de pacientes con SMT las neoplasias sebáceas se presentan antes que los tumores malignos viscerales<sup>156</sup>.

### 1.5.3 SÍNDROME LYNCH-LIKE

El síndrome Lynch-like (SLL) describe a los pacientes en quienes se demuestra IMS y / o expresión anormal de las proteínas MMR en IHQ, en ausencia de una mutación característica en línea germinal del SL. A diferencia del CCR esporádico no tienen mutación en *B-Raf protooncogene, serine/threonine kinase (BRAF)* ni metilación del promotor del *MLH1*<sup>157,158</sup>. Se estima que más del 70% de casos con sospecha de SL serán considerados SLL, a pesar de cumplir con los criterios clínicos de Ámsterdam, alta incidencia de tumores metacrónicos y agregación familiar<sup>158,159</sup>. Sin embargo muestran un riesgo elevado de presentar CCR respecto a la población general con una tasa SIR de CCR es 2.12<sup>160</sup>.

Algunos hallazgos sugieren que el SLL es realmente un SL con mutaciones germinales en el sistema MMR aún no detectables por los sistemas actuales de análisis, además por lo general no se analizan las secuencias intrónicas ni promotoras<sup>29,30,159</sup>. También existen otros mecanismos que podrían dar lugar a tumores que semejan un SL, así el 50% - 60% los CCR de pacientes con SLL presentan inactivación somática bi-alelica de los genes MMR en el tumor<sup>160,161,162</sup>.

La mayor parte de los casos considerados como SLL son realmente tumores esporádicos en los que se ha producido una inactivación somática y bialélica emulando un tumor del SL con pérdida de expresión en genes MMR, con IMS y sin metilación en *MLH1* ni mutación de *BRAF*<sup>158,163</sup>.

Generalmente estos casos no tienen una historia familiar de cáncer llamativa y sus tumores son considerados esporádicos.



## **1.6 IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE LYNCH**

### **1.6.1 APROXIMACIONES CLÍNICAS AL SÍNDROME DE LYNCH**

Para el diagnóstico del síndrome de Lynch se requiere la demostración de una mutación germinal en alguno de los genes reparadores de los errores de replicación del ADN mencionados anteriormente.

Inicialmente, cuando la genética del SL aún era poco conocida, el diagnóstico se basaba en criterios clínicos para identificar familias con mayor presencia de CCR y otros cánceres asociados al SL, para excluirlos de la PAF. En 1989, la International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer propuso los Criterios de Ámsterdam<sup>164</sup>, que luego se revisaron en 1999, para incluir a los tumores extracolónicos<sup>165</sup>. Estos criterios se desarrollaron como herramientas de investigación para identificar a las familias con mayor riesgo de SL y homogeneizar el material de estudio para investigaciones colaborativas, pero ninguna de ellas es óptima para identificar pacientes con SL<sup>166</sup>. Se ha descrito que los criterios de Ámsterdam II tienen una sensibilidad de 22% y una especificidad de 98% para el diagnóstico de SL<sup>167</sup>; del mismo modo más de un tercio de familias que reúnen criterios Ámsterdam I no tienen SL<sup>168,169</sup>.

En 1997 se establecen las guías de Bethesda para identificar individuos con CCR con elevada probabilidad de presentar SL, en los cuales estaría indicado efectuar un análisis de IMS o IHQ para las proteínas reparadoras en tumor<sup>169,37</sup>. Estas guías se revisaron en 2004<sup>15</sup>. Se estima que tienen una sensibilidad de 82% y especificidad 77% para diagnosticar pacientes con

SL<sup>170</sup>. La tabla 7 muestra los criterios de Amsterdam II y las guías de Bethesda.

Además existen modelos de predicción, que ofrecen una alternativa de acercamiento a la identificación de pacientes con SL y ayudan a identificar el riesgo individual de tener una mutación del SL. Todos parten de criterios clínicos preexistentes, podrían ser particularmente útiles en un paciente sin diagnóstico de cáncer o para aquellos en quienes el tumor no está disponible para test moleculares. En estos casos si un paciente tiene la probabilidad de ser portador de una mutación en un gen MMR de 5% o más, sería razonable realizar un estudio en línea germinal<sup>126</sup>.

Aunque el propósito general de estos modelos predictivos de riesgo es similar, se han desarrollado de forma diferente, y difieren en la población de donde derivan y en las que han sido validadas.

**Modelo MMRpredict.** Se ha desarrollado utilizando una regresión logística para estimar la probabilidad global de ser portador de mutación en MMR a partir de pacientes con CCR diagnosticados antes de los 55 años y validado en una cohorte de alto riesgo de CCR menores de 45 años. Utiliza las variables sexo, edad al diagnóstico del CCR, localización tumoral, múltiples CCRs, presencia de CE en familiares de primer grado, edad de diagnóstico del CCR en los familiares y resultado de los test moleculares. No incluye a otros cánceres asociados al SL y su uso se limita a evaluar sólo individuos con CCR. Este modelo tiene una sensibilidad de 90% y una especificidad de 70%<sup>167,171</sup> (Tabla 6) y está disponible online en: [hnpccpredict.hgu.mrc.ac.uk](http://hnpccpredict.hgu.mrc.ac.uk).

**Modelo MMRpro.** Este modelo se desarrolló utilizando un esquema Bayesiano e integra datos de prevalencia y penetrancia de una mutación, para estimar la probabilidad de ser portador. Utiliza la historia familiar de primer y segundo grado de CCR y CE, edad al diagnóstico, edad actual o del último seguimiento, resultados de los estudios moleculares de los genes MMR, no incorpora información de CCR múltiple ni extra-colónicos, y requiere información completa del pedigree incluyendo edad de los familiares no afectados<sup>171</sup>. Calcula el riesgo para futuros tumores, en portadores asintomáticos e individuos no afectados, tiene una sensibilidad de 89% y especificidad de 85% (Tabla 6). Se encuentra disponible online en: [www4.utsouthwestern.edu / breasthealth / cagene /](http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/).

**Modelo PREMM** <sup>1,2,6</sup>. Este modelo se desarrolla usando una regresión logística politoma multivariable, y proporciona un estimado global de tener mutación en un gen MMR específico. Utiliza las variables del caso índice como sexo y/o historia personal y familiar de CCR y CE u otro cáncer asociado al SL, variables relativas a la historia familiar de cáncer en familiares de primer y segundo grado, pero no incorpora datos del tumor<sup>172</sup>. Este calculador estima el riesgo para mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*. Tiene una sensibilidad de 90% y especificidad de 67%. Es el que tiene mejor sensibilidad<sup>173</sup>(Tabla 6). Se encuentra online en: [premm.dfci.harvard.edu](http://premm.dfci.harvard.edu).

Estos modelos han sido validados en población con CCR para la detección de mutaciones en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* con resultados favorables, por el contrario fallaron frente a una población con CE<sup>174</sup>.

**TABLA 6.** Sensibilidad y especificidad para Síndrome de Lynch utilizando diferentes estrategias.

<b>Criterio</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Referencia</b>
<b>Clinical</b>			
Amsterdam II	0.22 (0.13-0.67)	0.98 (0.97-1.0)	171,25,175,167
Bethesda	0.82 (0.78-0.91)	0.77 (0.75-0.79)	25,170
<b>Modelos</b>			
Modelo MMRpredict	0.69 (0.68-0.75)	0.90 (0.86-0.94)	167,171
Modelo MMRpro	0.89 (0.60-1.0)	0.85 (0.60-1.0)	167
Modelo PREMM <sub>1,2,6</sub>	0.90 (0.60-1.0)	0.67 (0.60-1.0)	172
<b>Estudio del Tumor</b>			
IMS	0.85 (0.75-0.93)	0.90 (0.87-0.93)	176
IHQ	0.83 (0.75-0.89)	0.89 (0.68-0.95)	176

Adaptado de Giardiello *et al.* 2014<sup>143</sup>.

Universitat d'Alacant  
 Universidad de Alicante

### 1.6.2 ESTUDIO DEL TUMOR CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH

Los estudios de tumores en pacientes con sospecha de SL pueden realizarse desde los tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina, ya sea de biopsias o piezas quirúrgicas, y de material archivado, tomando en consideración que el tiempo de fijación en formaldehído y de archivo dificultan el análisis de las técnicas realizadas.

### **1.6.2.1 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SISTEMA MMR POR INMUNOHISTOQUÍMICA**

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica utilizada para determinar la presencia y el nivel específico de localización de proteínas celulares. Mide la expresión proteica utilizando anticuerpos marcados que se unen a las proteínas de interés.

Desde que se desarrollaron los anticuerpos monoclonales contra MSH2 y MLH1 para muestras de tejido en parafina, se han realizado numerosos estudios evaluando su utilidad para detectar casos con SL y se ha encontrado diferencias en la sensibilidad y especificidad en la detección en cada proteína del sistema MMR.

La detección de la pérdida de expresión para el MLH1 en casos de mutación del gen es de sólo 74%, mientras que para el MSH2 es del 94%<sup>177,178</sup>. La baja sensibilidad del MLH1 mejora si se evalúa también PMS2, ya que los defectos funcionales del MLH1 desestabilizan la formación del dímero MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2), y consecuentemente se degrada el PMS2<sup>179</sup>. Del mismo modo el uso de MSH6 podría mejorar la detección de MSH2.

Actualmente se utilizan los cuatro anticuerpos para el estudio de tumores en sospecha de SL, mejorando la sensibilidad del estudio de IHQ en predecir mutaciones del sistema MMR equivalente al del IMS (92%)<sup>180,181,25</sup>.

### **1.6.2.2 EVALUACIÓN DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES**

El análisis de IMS se realiza con la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR) con amplificación del ADN tumoral a partir de tejido tumoral

fresco o fijado en formol y embebido en parafina. Se requiere que este material sea previamente evaluado por un patólogo para asegurar que la muestra corresponde al tumor, evaluar el porcentaje de células tumorales presentes, el cual determina la sensibilidad de la prueba y señalar los límites de la microdissección para seleccionar áreas con mayor celularidad tumoral<sup>182</sup>. La técnica pierde sensibilidad por debajo del 20% de celularidad tumoral. En casos de tumores de origen extra-colónico Buecher y col. recomiendan además realizar un análisis paralelo de tejido normal (adyacente al tumor) o de linfocitos de sangre periférica para detectar alteraciones de un solo nucleótido<sup>182</sup>.

La IMS se detecta por amplificación de marcadores específicos de microsatélite. Inicialmente se determinaba por comparación de la longitud de los nucleótidos repetitivos en células tumorales y células normales. A finales de los 90s el Instituto Nacional de Cáncer (National Cancer Institute (NCI) Workshop) propuso los primeros 5 marcadores con sensibilidad y especificidad apropiada para detectar la IMS<sup>183</sup>, que incluía dos mononucleótidos (BAT-25, BAT-26) y tres dinucleótidos (D2S123, D5S346, y D17S250). Poco después se demostró que los mononucleótidos podían mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica<sup>184,185,186</sup>.

En un nuevo consenso se recomendó el uso de cinco marcadores mononucleótidos cuasi-monomórficos BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 y NR27<sup>15</sup>, Se denominan cuasi-monomórficos porque en el ADN normal presentan un número constante de nucleótidos repetidos y tienen igual tamaño entre individuos. Su uso evita la necesidad de comparar el ADN tumoral con tejido normal para identificar una IMS<sup>187</sup>.

Actualmente el análisis del ADN amplificado se realiza por electroforesis usando uno de los cebadores marcado con fluorescencia, lo que permite la discriminación de un nucleótido<sup>188</sup>. Usualmente la amplificación del ADN de todos los marcadores de microsatélites se realizan simultáneamente (PCR-múltiple), y cada marcador es señalado con un fluoróforo diferente para distinguirlos de los demás.

En la interpretación se distinguen los fenotipos IMS-alta, si presenta al menos dos marcadores de microsatélites inestables de los 5 analizados, IMS-baja con inestabilidad de un solo marcador y microsatélite estable (MSS) que tiene todos los marcadores estables. Solamente en el primer caso se considera que el tumor presenta IMS<sup>182</sup>.

### **1.6.3 ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE LYNCH**

La identificación temprana de sujetos con SL y los miembros de su familia en riesgo es crucial para la implementación de estrategias de prevención efectivas. Estas estrategias incluyen la evaluación de la historia personal y familiar de cáncer, estudio molecular del tumor, modelos de predicción clínica y la detección de mutaciones por análisis del ADN.

Después del descubrimiento de las mutaciones en los genes MMR, el SL recibió la atención de la comunidad médica, lo que llevó a la identificación de numerosas familias afectadas. Así, inicialmente, la sospecha diagnóstica de SL se establecía a partir de la historia familiar y su definición se basaba en cumplir todos los criterios de Ámsterdam, muy restrictivos y poco sensibles para su aplicación en la práctica asistencial. Las guías de Bethesda incrementaron la sensibilidad al permitir realizar técnicas moleculares a individuos altamente

sospechosos, por lo tanto es necesario seleccionar a los pacientes antes de realizar los test de mutación en los genes MMR.

El CCR es el cáncer más común asociado a SL y existe evidencia importante de que utilizar el test genético para todos los CCR recientemente diagnosticados (cribado universal) puede reducir la morbilidad y mortalidad de los familiares del caso índice<sup>189,190</sup>. Con este criterio Hampel *et al.* encontraron que 1 de cada 35 casos de CCR tenían SL<sup>11</sup>.

Existe preocupación importante en relación a la efectividad costo y facilidades prácticas del cribado universal, en los CCR nuevos. Por ello se proponen estrategias de diagnóstico a fin de incrementar la posibilidad pre-test de encontrar sujetos con una mutación.

La estrategia tradicional depende de los criterios clínico-patológicos (Amsterdam y Bethesda), y de los modelos computacionales (MMRpredict, MMRpro y el PREMM)<sup>167,191,192</sup> sin embargo ninguno de estos modelos es suficientemente consistente para identificar casos con SL. Así, los estudios moleculares en CCR revelan que más del 25% de los pacientes con SL no se detectan incluso con criterios clínicos más laxos como el Bethesda<sup>193</sup>. Igualmente los modelos computacionales fallan en sus predicciones y no son confiables para el uso de forma aislada.

Ante pérdida de expresión de MLH1 se debe comprobar que no sea consecuencia de la hipermetilación adquirida o somática, y con ello la presencia de mutación en *BRAF* responsable de la hipermetilación, para distinguirlo el CCR esporádico<sup>194</sup>. Por otro lado si se demuestra pérdida de

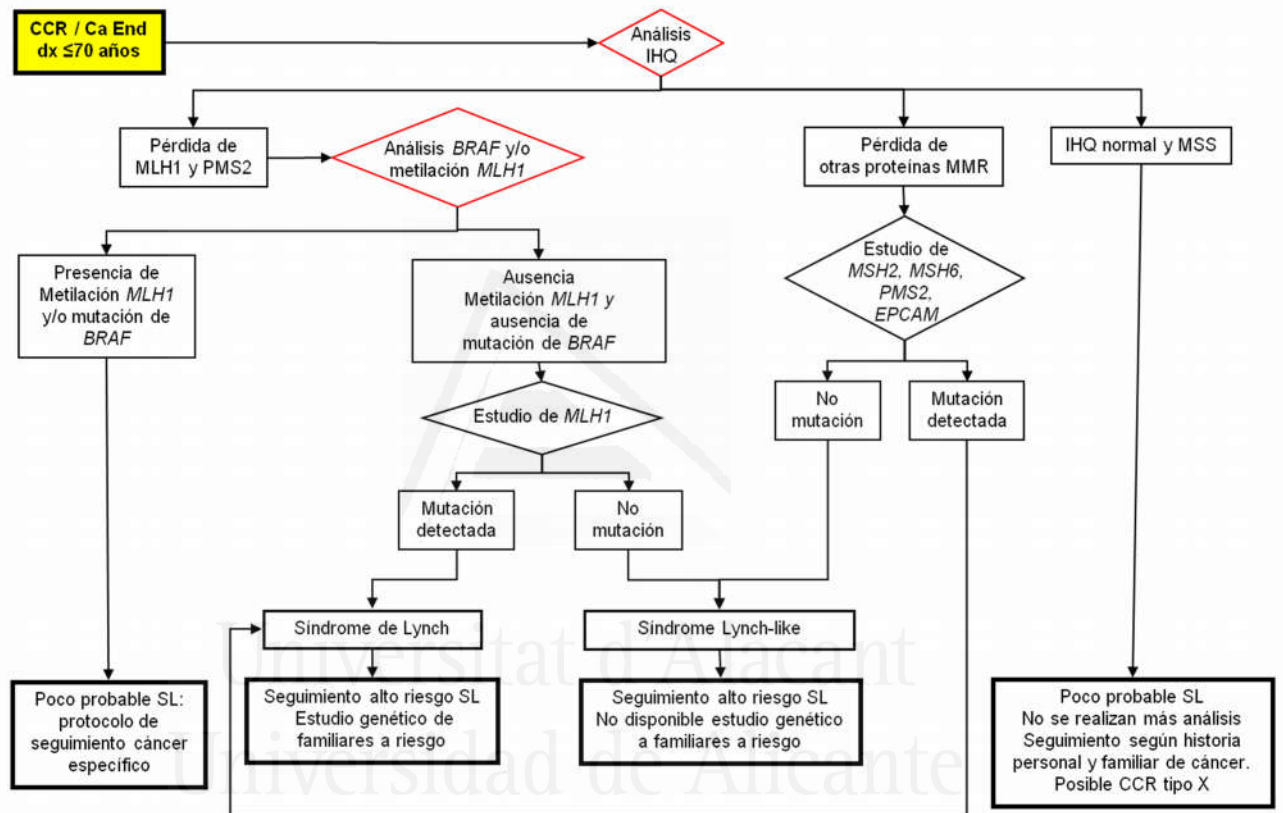


expresión de otra proteína por IHQ, es recomendable empezar analizando la mutación del gen correspondiente.

El algoritmo para las pruebas genéticas depende de dos factores: (I) si el individuo está afectado clínicamente; (II) si se conoce la mutación en línea germinal de la familia. Si la mutación se conoce se deben estudiar tanto a los individuos afectados como a los que están en riesgo. Sin embargo, cuando la mutación de la familia no se conoce, la prueba debe comenzar en el miembro de la familia con la más probabilidad pre-test, incluso si ya ha fallecido.

Los algoritmos seguidos por las Unidades de Consejo Genético en Cáncer (UCGC) de la Comunidad Valenciana para los pacientes CCR y CE, establecido para el 2017, se muestran en las Figuras 4 y 5, en las que se establece el estudio de IHQ para todos los pacientes con CCR y CE menores de 70 años, y para los pacientes que cumplen los criterios de Bethesda

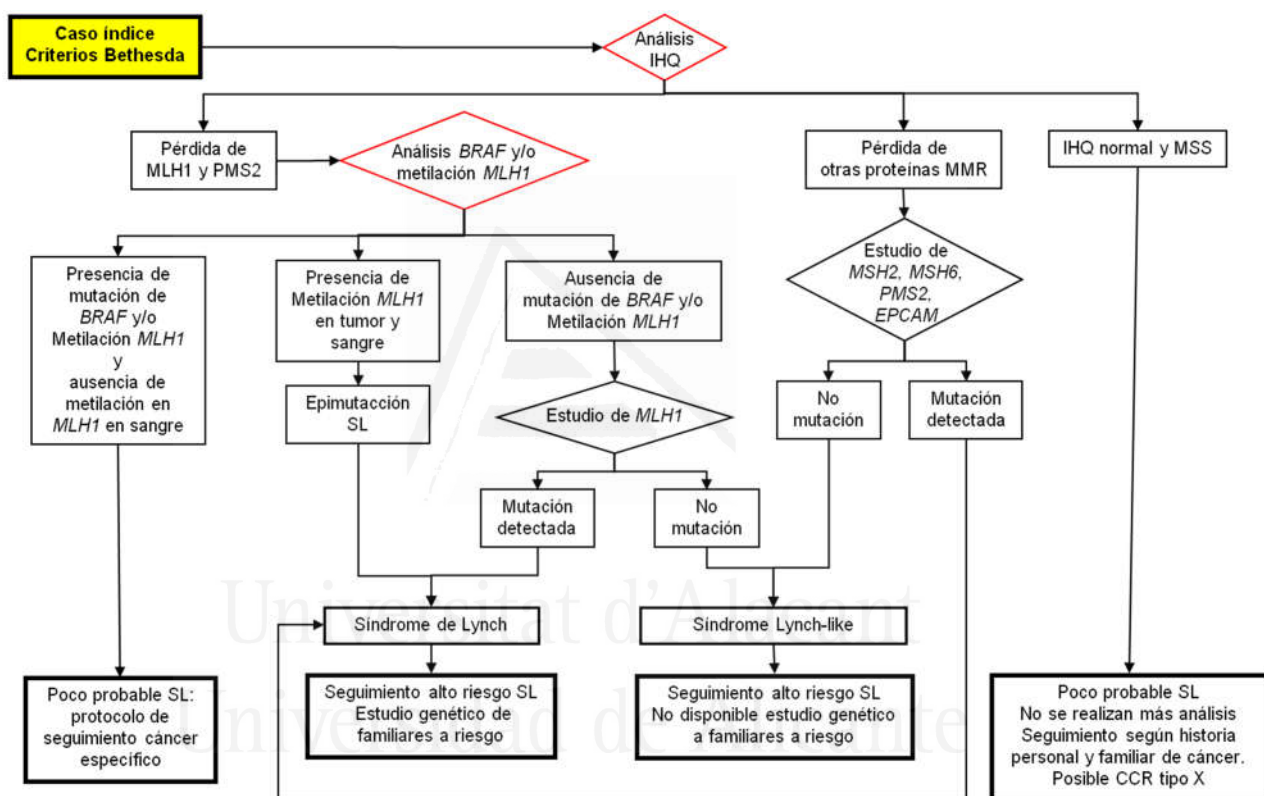
**FIGURA 4.** Estrategia de estudio genético de síndrome de Lynch en pacientes con CCR o CE diagnosticado antes de los 70 años recomendado por el programa de consejo genético en cáncer familiar de la Comunidad Valenciana.



Extraído de la Guía de Práctica Clínica en Cáncer Hereditario de la Comunitat Valenciana, 2017<sup>195</sup>



**FIGURA 5.** Estrategia de estudio genético de síndrome de Lynch en pacientes que cumplen criterios de Bethesda recomendado por el programa de consejo genético en cáncer familiar de la Comunidad Valenciana.



Extraído de la Guía de Práctica Clínica en Cáncer Hereditario de la Comunitat Valenciana, 2017<sup>195</sup>





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**JUSTIFICACIÓN**

---



## 2 JUSTIFICACIÓN

La identificación de pacientes con SL en mujeres con CE tiene el potencial de influir en la planificación de intervenciones preventivas para los pacientes y sus familiares: consejo genético, vigilancia intensiva con diagnósticos tempranos, cribado y prevención. Dichas intervenciones van a impactar significativamente en la reducción de mortalidad por cáncer en estas familias con elevado riesgo.

Las pruebas genéticas son ahora una parte aceptada de la gestión de pacientes con tales cánceres y toda estrategia encaminada a una mejora en el rendimiento diagnóstico del síndrome de Lynch puede permitir un mejor manejo de estas familias, más aún en el caso del CE que tiene el potencial de una detección del caso índice más anticipada y con mejor pronóstico respecto al CCR, que ha sido clásicamente, el principal foco de atención de los estudios relacionados con SL.

La caracterización molecular de los tumores asociados al síndrome de Lynch tiene aplicación traslacional importante y aplicable en todo el proceso etiopatogénico de evolución de la enfermedad, predicción de respuesta al tratamiento e identificación de sujetos en riesgo de padecer un cáncer.

Además, una descripción precisa del fenotipo también es útil para lograr una correlación genotipo/fenotipo que puede cambiar para cada grupo poblacional.

Por estas razones creemos en la importancia de caracterizar adecuadamente esta entidad clínica en nuestra comunidad, que permita asegurar una planificación adecuada de las intervenciones preventivas para los pacientes y sus familiares.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**HIPÓTESIS**

---



### **3 HIPÓTESIS**

La estrategia para el diagnóstico del Síndrome de Lynch hasta ahora empleada para el cáncer colorrectal se basa en los criterios de Bethesda, y aun no existen criterios bien definidos en relación al cáncer de endometrio, por lo que creemos que identificar a los sujetos con alta probabilidad de SL entre pacientes con cáncer de endometrio no seleccionados permitirá estimar la prevalencia del SL en nuestra comunidad y establecer mejores estrategias de cribado.

El cribado universal mediante inmunohistoquímica en pacientes con CE permite detectar un mayor número de sujetos con alta probabilidad de presentar Síndrome de Lynch respecto a la estrategia basada en criterios clínicos.

Se espera, que al igual como sucede con el CCR, el porcentaje de tumores con alteración de la vía reparadora será menor que lo descrito en series anglosajonas. La inclusión de población no seleccionada con CE permitirá probablemente, detectar un mayor número de familias con mutación de MSH6, ya que las mutaciones en este gen se asocian a un fenotipo de síndrome de Lynch con una alta incidencia de carcinoma de endometrio y baja de CCR, con edades de diagnóstico más tardías.

Todo esto hace necesario que se lleven a cabo estudios para profundizar en el conocimiento del carcinoma de endometrio hereditario.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**OBJETIVOS**

---



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVOS PRINCIPALES**

- Determinar la prevalencia de Síndrome de Lynch en pacientes con cáncer de endometrio esporádico, en una población no seleccionada.

### **4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Describir las características clínicas y moleculares de riesgo de Síndrome de Lynch en una población no seleccionada.
- Correlacionar las características demográficas, clínicas y referentes al tumor (histopatológicas) con el riesgo de Síndrome de Lynch.
- Establecer la frecuencia de mutaciones en genes reparadores del DNA en el carcinoma de endometrio, de forma global en nuestro medio.

Universitat d'Alicant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **5 MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio observacional descriptivo de cohortes retrospectivas.

#### **SUJETOS DE ESTUDIO**

Pacientes mujeres con diagnóstico de carcinoma de endometrio en el Departamento de Salud Alicante-Hospital General en el periodo enero 2004 hasta diciembre de 2009.

#### **Criterios de inclusión:**

- Diagnóstico anatomopatológico de Cáncer de Endometrio con independencia del motivo de diagnóstico (hallazgo casual o propiciado por la clínica), del tipo de ingreso hospitalario (urgente o electivo), del estadio tumoral, o de las posibilidades o la realización de tratamiento.
- Material biológico disponible para realización de las técnicas inmunohistoquímicas y moleculares

#### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con muestra histológica inadecuada (muy pequeña, gastada, mal fijada).

#### **Muestras biológicas**

Las muestras biológicas para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas y moleculares han sido proporcionadas por el Biobanco del HGUA.

## 5.2 VARIABLES A ESTUDIO

1. Variables sociodemográficas:
  - a. Edad al diagnóstico
2. Variables clínicas
  - a. Criterios de Bethesda
  - b. Criterios de Amsterdam II
3. Variables patológicas convencionales:
  - a. Tamaño
  - b. Localización
  - c. Tipo histológico CE
  - d. Grado de diferenciación según criterios de la FIGO
  - e. Infiltrado linfoide intratumoral
  - f. Invasión Intravascular
  - g. Estadio tumoral
  - h. Invasión de miometrio
4. Variables inmunohistoquímicas: vía reparadora
  - a. MLH1
  - b. MSH2
  - c. MSH6
  - d. PMS2
5. Variables moleculares en el tumor:
  - a. Estudio de Inestabilidad de Microsatélites (IMS).
  - b. Análisis de Hipermetilación del promotor de *MLH1*
  - c. Análisis de mutación V600E del gen *BRAF* en tejido tumoral.

6. Análisis de mutación en línea germinal
7. Variables de resultado:
  - a. Estado de la vía reparadora
    - i. MMR deficiente
    - ii. MMR normal
  - b. Síndrome de Lynch
    - i. Confirmado SL
      1. Mutación en línea germinal identificada
    - ii. Sospechoso
      1. MMR deficiente y no metilado en *MLH1*
    - iii. No SL
      1. MMR deficiente y metilado en *MLH1*
      2. MMR normal
8. Variables de familias con mutación identificadas.
  - a. Edad
  - b. Neoplasia asociada a SL
  - c. Portador de la mutación del Caso índice

### **5.3 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y CODIFICACIÓN**

Se elaboraron fichas de registro de datos en el programa Access (Microsoft Office) como base de datos de recogida de la información que requiere un código de acceso. Para cada paciente se recodificó con un código alfanumérico para limitar el acceso a la información generada. A la información de la recodificación solo tenían acceso los integrantes del grupo de investigación.

Los datos clínicos se recogieron a partir de la Historia Clínica del paciente, posterior a la autorización del Comité de Ética del HGUA.

Se elaboró una ficha de estudio anatómopatológico, en el que se recogió los datos del estudio morfológico y de inmunoreacción. También se elaboró una ficha de datos moleculares para el registro de variables moleculares.

Una vez obtenidos los datos, éstos se revisaron para detectar errores en la recolección; y posteriormente se procedió a ser ingresados en una matriz de datos utilizando el paquete estadístico R; colocando las variables numéricas por el valor en cada unidad de estudio y las variables cualitativas por sus códigos.

## 5.4 RECOGIDA DE VARIABLES

Se solicitó al servicio de Anatomía Patológica del HGUA, los listados de pacientes con diagnóstico principal de CE desde el 1 de enero del 2004 al 31 de diciembre del 2009. Se diseñó una base de datos con el programa ACCESS (Microsoft Office). A cada paciente se le asignó un código alfanumérico.

### 1. Variables sociodemográficas.

La fecha de nacimiento y fecha de diagnóstico se obtuvieron a partir de la Historia Clínica del paciente.

### 2. Variables clínicas.

El cumplimiento de los criterios clínicos de Bethesda y Ámsterdam (Tabla 7) se obtuvo a partir de la Historia Clínica y/o mediante entrevista personal por parte de los Ginecólogos participantes en el proyecto (María José Román, José Antonio López, Óscar Piñero).

**TABLA 7.** Criterios clínicos para el diagnóstico del síndrome de Lynch.

#### **Criterios de Ámsterdam II**

- Tres o más familiares afectados de CCR o neoplasia asociada a CCHNP (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal),
- Uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos,
- Afectación de al menos dos generaciones consecutivas,
- Al menos un caso de CCR diagnosticado antes de los 50 años, y
- Se excluye la PAF



#### **Criterios de Bethesda revisados**

- CCR en paciente con < 50 años de edad.
- Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otra neoplasia de la esfera asociada al CCHNP (estómago, intestino delgado, páncreas, vía biliar, endometrio, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, adenomas sebáceos, queratoacantomas) con independencia de la edad.
- CCR con infiltración linfocitaria, diferenciación mucinosa/células en anillo de sello o patrón de crecimiento medular en paciente < 60 años de edad.
- Uno o más familiares de 1º grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCRHNP diagnosticada antes de los 50 años de edad.
- Dos o más familiares de 1º o 2º grado con CCR o neoplasia de la esfera asociada al CCHNP con independencia de la edad.

### **3. Variables patológicas convencionales.**

Para la obtención de las variables morfológicas se realizó una revisión centralizada de todas las preparaciones histológicas de los pacientes a estudio por los patólogos Gloria Peiro, Cristina Alenda y Cecilia Egoavil. Se elaboró una ficha de trabajo para cada patólogo, los casos discordantes se revisaron en conjunto y se decidió el diagnóstico final.

- a. Tamaño (cm)
- b. Localización CE: Segmento uterino bajo. (presente/ausente)
- d. Tipo histológico CE: Endometroide, Especial (carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma de células claras, carcinoma endometrial seroso, carcinoma indiferenciado y el tumor mixto maligno uterino mixto)
- e. Grado de diferenciación según criterios de la FIGO

- f. Infiltrado linfoide intratumoral ( $> 0 < 4$  linfocitos intraepiteliales por campo de gran aumento)
- g. Invasión Intravascular (sí/no)
- h. Estadío tumoral (TNM: I-IIA-IIB IIIA-IIIB-IIIC-IV)
- i. Invasión de miometrio (Ninguno,  $>50\%$ ,  $\leq 50\%$ )

#### **4. Variables de Inmunohistoquímicas.**

Para realizar el estudio inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) se construyeron matrices de tejido (TMA). Para ello se revisaron las preparaciones histológicas del archivo anatomopatológico y se eligió la sección con mejor representación del tumor, es decir secciones con mayor celularidad neoplásica. El tumor representativo se marcó en los cristales teñidos con Hematoxilina/Eosina, luego se lo identificó en el bloque de tejido correspondiente del cual se extrajeron dos cilindros de tejido de 1 mm de diámetro de las áreas marcadas que se incorporaron en un bloque receptor utilizando un arrayer de tejidos manual (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EEUU).

Los TMA contenían entre 30 y 50 cilindros de 1 mm de diámetro. Se incluyeron 2 cilindros de tejido tumoral por caso. Se cortaron secciones de 4 mm de espesor de TMA para el estudio IHQ<sup>196</sup>. Las técnicas IHQ se realizaron sobre cortes de los TMA, de forma automatizada con equipo Techmate-500, con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision (Dako). Para el estudio de la expresión de las proteínas MMR MLH1/MSH2/MSH6/ PMS2 se utilizaron los anticuerpos:



**TABLA 8.** Anticuerpo. Fuente clona, dilución y método de detección usados

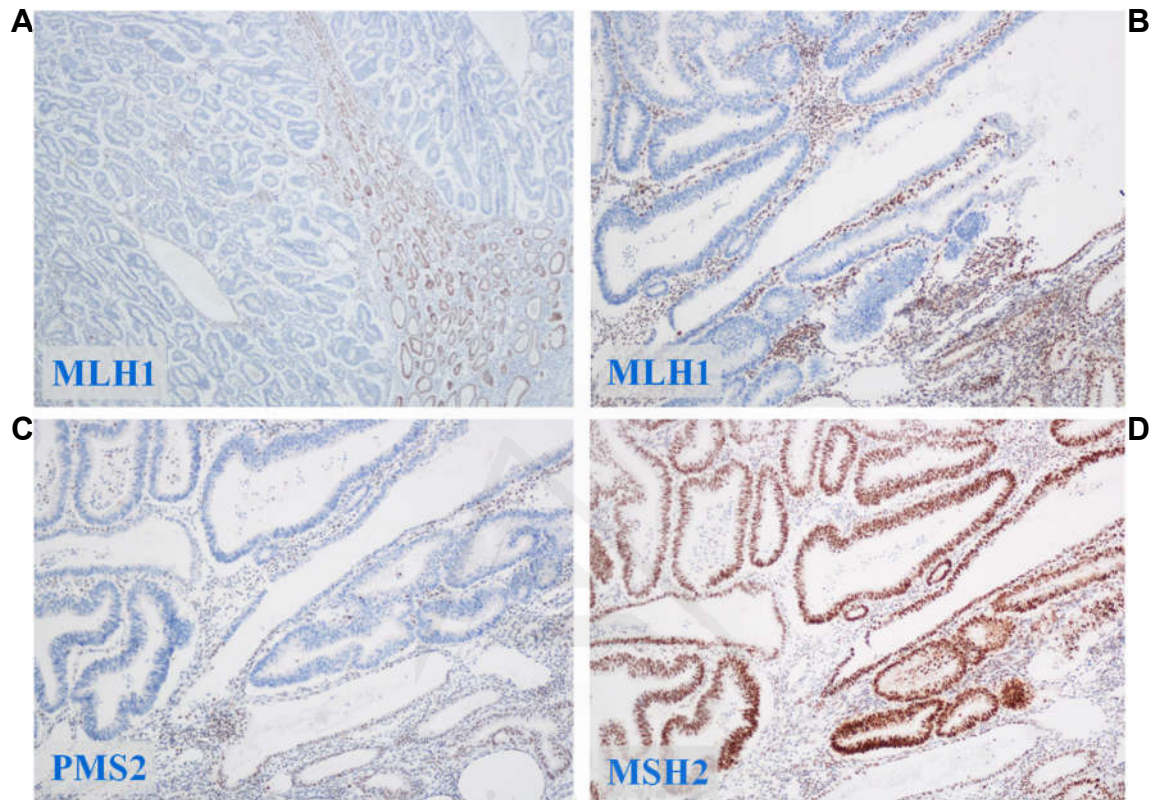
Anticuerpo	Marca	Clona	Dilución	Detección	pH
<b>MLH1</b>	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EE.UU	G168-15	1:30	ABC	Bajo
<b>MSH2</b>	BD Transduction Laboratories, San Diego CA, USA.	44	1:100	ABC	Bajo
<b>MSH6</b>	Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA,	FE11	1:30	ABC	Bajo
<b>PMS2</b>	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EE.UU	A16-4	1:100	ABC	Bajo

ABC: complejo avidin-biotin, StrpABC: complejo Strepta Avidin-biotin

Se consideró expresión positiva en aquellos casos con tinción nuclear inequívoca de las células tumorales. Se consideró negativo los casos que no mostraron tinción nuclear de las células tumorales, en presencia de células no neoplásicas (estroma, linfocitos) teñidas normalmente (control positivo intrínseco). Los casos negativos y los no informativos se repitieron sobre una sección completa. El proceso de análisis por parte de los patólogos fue a doble ciego (CE y CA)<sup>197</sup>.



**FIGURA 6.** Expresión proteica por técnica de Inmunohistoquímica de las proteínas MMR en tumores malignos de endometrio.



**A y B.** Pérdida de expresión de MLH1. **C.** Pérdida de expresión de PMS2.  
**D.** Expresión Normal de MSH2.



## **5. Variables moleculares en el tumor.**

Para la realización de las técnicas moleculares se extrajo ADN a partir de dos punch de tejido obtenido con el tissuearrayer de los bloques de parafina. El material fue desparafinado mediante disolución de la parafina en aceite mineral (Sigma Aldrich) a 95°C. Tras la eliminación de la parafina, el tejido fue incubado con proteinasa K (proteasa de amplio espectro que degrada las proteínas de las membranas celulares provocando la lisis celular) a 56°C durante 16 horas, y en caso necesario, se volvió a incubar a 56°C, tras la adición de más proteinasa K, hasta la total digestión del tejido.

Para la extracción de ADN se utilizó el Mini kit QiaAmp ADN (Qiagen Valencia, CA, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El método de extracción se basa en el empleo de columnas de adsorción que retienen el ADN. El procedimiento consiste en la digestión con proteinasa K durante toda la noche, seguida de una serie de lavados en columna y elución final en Tris Edta (TE), obteniendo un eluido de ADN purificado libre de proteínas, nucleasas y otros inhibidores. Se realizó en el sistema automático QiaCube (Qiagen, Valencia, CA, USA) según el protocolo del fabricante.

A continuación, se comprobó y cuantificó el ADN genómico en un espectrofotómetro Nanodrop (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Este instrumento calcula la concentración de ADN (en ng/ $\mu$ L) a partir de un volumen mínimo de muestra (2 $\mu$ L) mediante la determinación de la absorbancia de la muestra a 260nm (nanómetros) (longitud de onda específica de absorción de los ácidos nucleicos). Además, ofrece un ratio de la absorbancia a 260nm frente a la absorbancia a 280nm que determina la pureza del ADN. La longitud

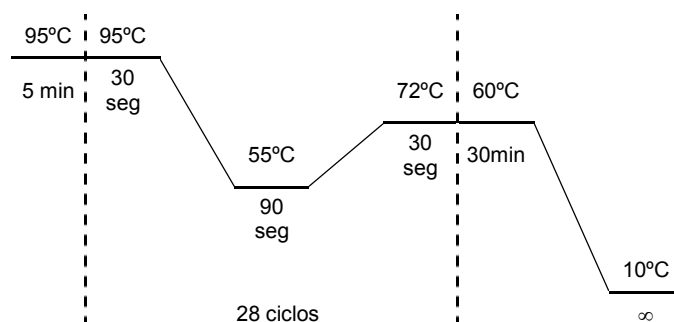


de onda a 280nm es específica de la absorción de posibles contaminantes del ADN como las proteínas. Un ratio 260/280 comprendido entre 1,8 y 2 denota una buena pureza del ADN. El ADN de las muestras se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

- **Estudio de Inestabilidad de Microsatélites (IMS).** Se analizó el ADN de las muestras tumorales utilizando PCR multiplex de los marcadores monomórficos repetitivos: BAT26, BAT25, NR21, NR24 y NR27<sup>198,199</sup> seguida de un análisis de fragmentos en un secuenciador automático.

Brevemente, las reacciones de PCR se realizaron con una desnaturalización inicial de 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido de 28 ciclos de 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ ; 90 seg a  $55^{\circ}\text{C}$  y 30 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ , después una extensión final durante 30 min a  $60^{\circ}\text{C}$  (Figura 7). Uno de los dos *primers* (o cebadores) de cada marcador de microsatélites estaba marcado con un fluorocromo en el nucleótido del extremo 5' terminal para permitir la detección de los microsatélites mediante el análisis de fragmentos por un Analizador Genético (ABI 3130, Applied Biosystems). Para ello se mezcla 1  $\mu\text{L}$  de producto de PCR con 24  $\mu\text{L}$  de formamida (HiDi Formamide, Applied Biosystems) y 1  $\mu\text{L}$  de marcador de tamaño GeneScan ROX-500 (Applied Biosystems) y se desnaturaliza durante 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Los datos se analizaron con el software de análisis Genemapper v4.0 (Applied Biosystems).

**FIGURA 7.** Condiciones de PCR multiplex de los marcadores monomórficos.



La tabla 9 muestra la secuencia de los cebadores de los marcadores de inestabilidad. En cada caso el cebador antisentido se marcó con fluorescente: FAM para BAT26 y NR21, HEX para BAT25 y NR27 y NED para NR24.

**TABLA 9.** Secuencias de los *primers* (cebadores) se marcadores de microsatélites

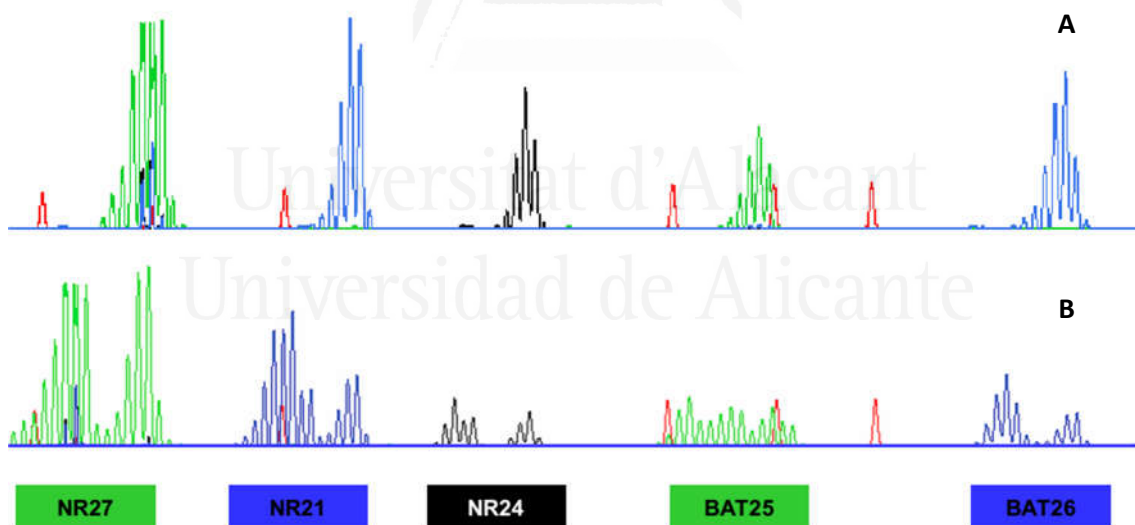
Marcador	Gen	Nº Gen Bank	Localización	Secuencia del Primer
NR-27	Inhibidor apoptosis Protein-1	AF070674	5'UTR	AACCATGCTTGCAAACCACT CGATAATACTAGCAATGACC
NR-21	SLC7A8	MX_033393	5'UTR	GAGTCGCTGGCACAGTTCTA CTGGTCACTCGCGTTTACAA
NR-24	Zinc finger 2	X60152	3'UTR	GCTGAATTTTACCTCCTGAC ATTGTGCCATTGCATTCCAA
BAT-25	<i>c-kit</i>	X69313	Intron 16	TACCAGGTGGCAAAGGGCA TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT-26	<i>hMSH2</i>	AY601851	Intron 5	CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG AACCATTCAACATTTTTTAACCC



IMS se definió como la presencia de un patrón anormal de picos en el electroferograma cuando se comparaba con un control negativo de un ADN normal<sup>186</sup>.

Se consideró IMS si el tumor presenta un patrón alterado de picos en al menos dos de los cinco marcadores de microsatélites analizados y se consideró un tumor estable (MSS) si el tumor presenta menos de dos marcadores inestables o un patrón normal de picos en los cinco marcadores analizados.

**FIGURA 8.** Electroferograma del estudio de Inestabilidad de Microsatélites



**A.** Patrón normal de picos en los cinco marcadores analizados. **B.** Patrón anormal de picos en los cinco marcadores analizados.



- **Análisis de Hipermetilación del promotor de *MLH1*.** En los tumores que mostraron pérdida de expresión inmunohistoquímica de *MLH1* se estudió el estado de hipermetilación del promotor de *MLH1*.

Para analizar el estado de metilación del gen *MLH1*, en nuestro estudio se utilizó técnica de MLPA sensible a metilación (MS-MLPA Kit de ME011; MRC-Holland, Países Bajos) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las regiones diana para el silenciamiento del gen *MLH1* por hipermetilación se encuentran en las regiones C y D del promotor *MLH1* (de los nucleótidos -248 a -178 y -109 a 15), que se contrastan con las sondas *MLH1* 3 y 4, respectivamente, incluidas en el sistema.

Los ensayos de MS-MLPA se realizaron como lo describe el fabricante (Anexo 1): en cada reacción se usan 200 ng de ADN (5 µl a 40 ng / µl). De forma similar a un ensayo de MLPA convencional, el ADN genómico se desnaturaliza primero y posteriormente se enfría a 25°C, seguido por la adición de sondas MS-MLPA y una etapa de hibridación de 16 h. El ensayo de MS-MLPA se divide luego en dos tubos; Un tubo se procesa como una reacción estándar de MLPA: ligación de oligonucleótidos sonda hibridados, seguido de amplificación por PCR. El otro tubo de la reacción de hibridación MLPA se incubaba con la endonucleasa *HhaI* sensible a la metilación. Durante el proceso de ligación la PCR se realizó tal como se describe por el fabricante. A continuación, se separaron los fragmentos de PCR y se cuantificaron por electroforesis en un Analizador Genético (ABI 3130, Applied Biosystems). (Ver protocolo en Anexo 1). Si para una región concreta la muestra no está metilada, la

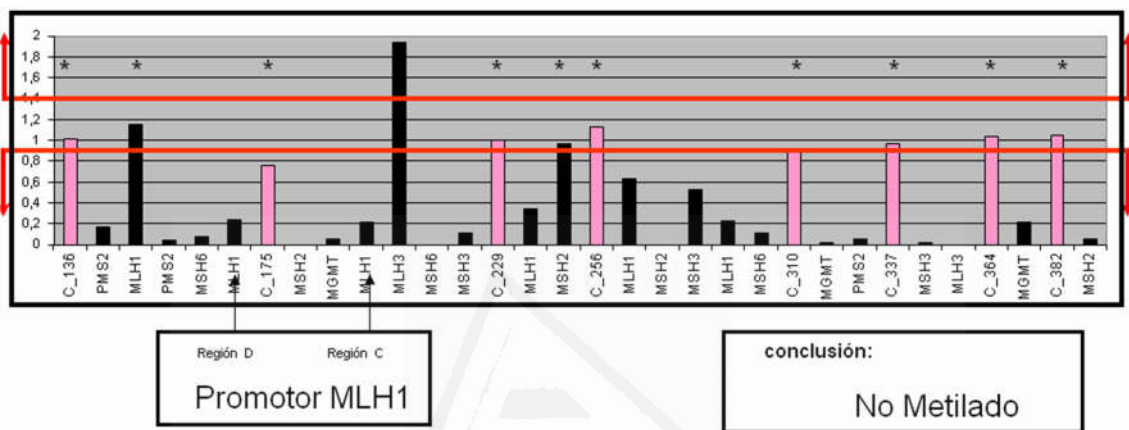
enzima cortará por su secuencia diana y no habrá amplificación de la sonda correspondiente. Pero si la muestra está metilada la enzima no reconoce su secuencia diana y no digiere la muestra, por lo que sí habrá amplificación de las sondas correspondientes a regiones metiladas. Después de la PCR se separan los fragmentos por electroforesis capilar.

El estado de metilación para una muestra de tumor se calculó usando el software de análisis Genemapper v4.0 (Applied Biosystems). El parámetro de altura de pico es proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. Para calcular la relación de metilación, cada altura del pico del ADN del tumor digerido con *HhaI* se dividió por su altura de pico correspondiente del ADN del tumor no digerido. Para compensar las diferencias en la eficiencia de PCR de las muestras individuales, cada altura de pico (digerido y no digerido) se normaliza dividiendo cada producto de amplificación de sonda por el valor medio de las 11 sondas de control sin un sitio de enzima *HhaI*<sup>200</sup>.

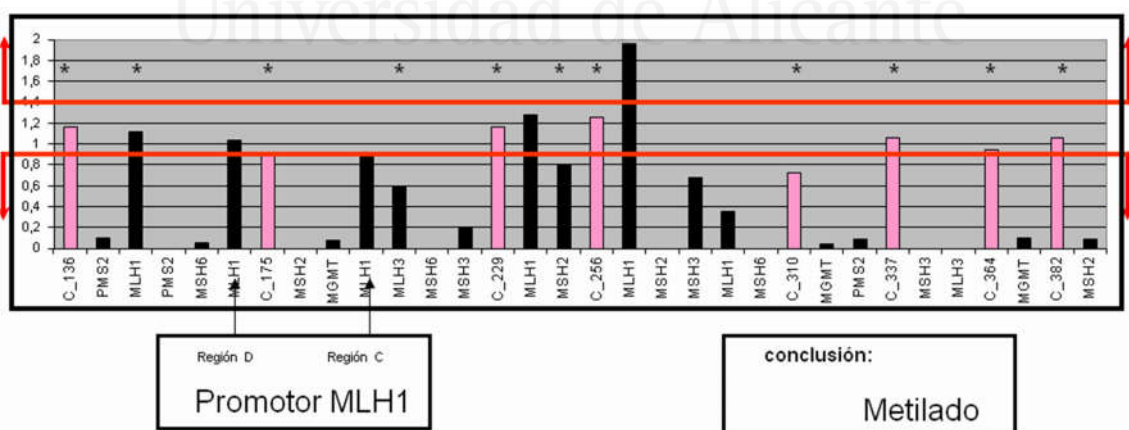
La media de la sonda *MLH1* 3 y 4 correspondiente a las regiones C y D, respectivamente, en el promotor *MLH1* se consideraron para calcular la relación de metilación. El umbral de dicotomización para distinguir metilado versus no metilado en las muestras, se estableció en un 15% basado en un estudio anterior asociado con el silenciamiento de genes<sup>201,202</sup> (Figura 9).

**FIGURA 9.** Análisis de Hipermetilación del promotor de *MLH1*. (MS-MLPA©DNA Methylation ME011-A1 MMR o ME011-B1.

A. Gráfica de un Tumor Endometrial No Metilado, se observan las barras que corresponden a las regiones C y D del promotor del *MLH1* que no han sido cortadas por la enzima *HhaI* (debajo del umbral de referencia).



B. Gráfica de un Tumor Endometrial Metilado, se observa las barras que corresponden a las regiones C y D del promotor del *MLH1* que han sido cortadas por la enzima *HhaI*, (alcanzan el umbral de referencia).

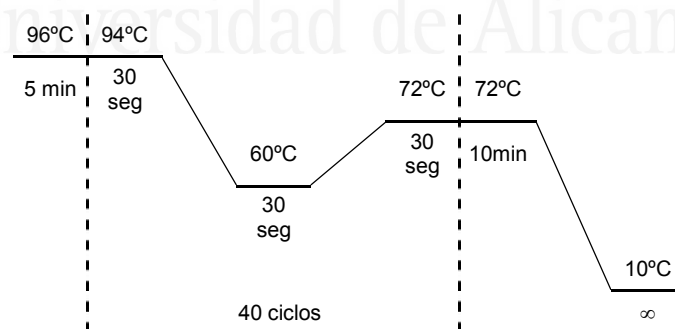






- Análisis de mutación V600E del gen *BRAF* en tejido tumoral.** En los casos con pérdida de expresión inmunohistoquímica de MLH1 también se estudió la mutación *BRAF*. Para detectar la mutación *BRAF* V600E, se amplificó el ADN tumoral mediante PCR con una pareja de cebadores que cubría el exón 15 del gen *BRAF*<sup>203</sup>. Las condiciones de PCR fueron de 96°C durante 5 min; 40 ciclos de 94 ° C durante 30 s; 60 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72 ° C durante 10 min (Figura 10). Se utilizaron los siguientes cebadores para *BRAF* 15F (5'-TGC TTG CTC TGA GAA AAT GA-3 ') y 15R (5'-TGG ATC CAG ACA ATC GTT CAA A-3')<sup>204</sup>. Analizamos la mutación *BRAF* mediante secuenciación directa de los productos de PCR usando los terminadores de color BigDye versión 3.1 y el Analizador Genético (ABI 3130, Applied Biosystems).

**FIGURA 10.** Condiciones de PCR para *BRAF* V600E.



## **6. Análisis de mutación en línea germinal.**

Se realizaron estudios de mutación de la línea germinal sobre ADN genómico aislado de leucocitos de sangre periférica o de tejido endometrial no tumoral.

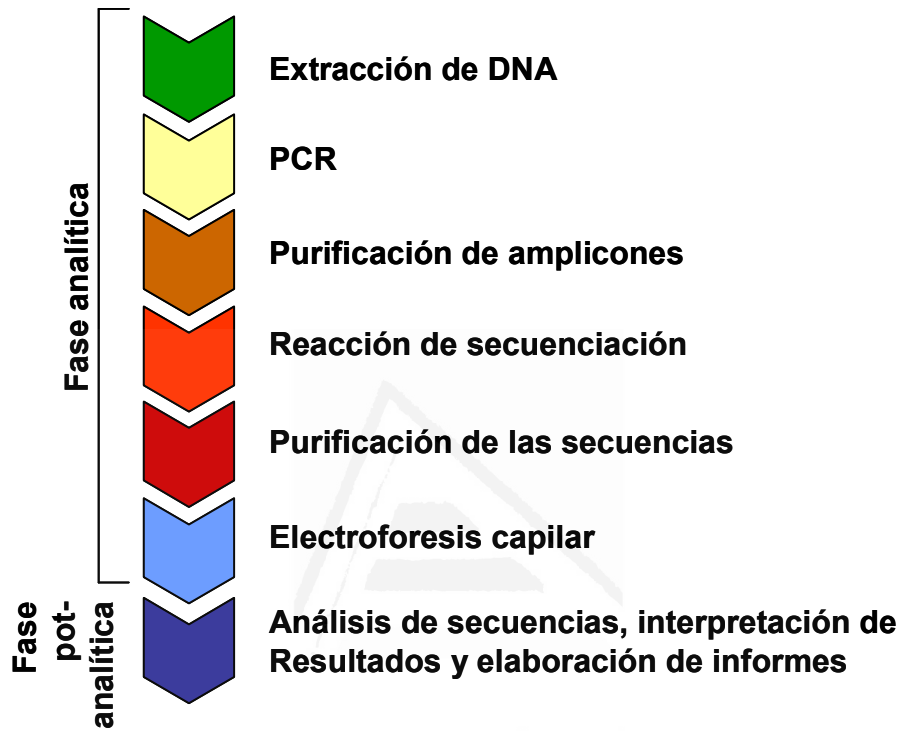
Para el análisis se obtuvieron 10 mL de sangre periférica en tubos con EDTA de las pacientes con sospecha de SL remitidos a la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche (HGUE). La extracción de la sangre se realizó en dicha UCGC.

A partir de los 10 mL de sangre periférica en EDTA se extrajo la capa leucoplaquetaria que sirvió para extraer ADN genómico. Se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen Valencia, CA, USA). Se utilizó el sistema automático QiaCube (Qiagen, Valencia, CA, USA) para aislar el ADN según el protocolo del fabricante. El ADN remanente fue tratado de acuerdo al protocolo establecido para su incorporación en el Biobanco del HGUE. A continuación, se comprobó y cuantificó el ADN en el Nanodrop (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) como se describe previamente.

### **Análisis de mutaciones puntuales**

La detección de mutaciones puntuales se realizó mediante PCR y secuenciación directa Sanger de toda la secuencia codificante y las uniones intrón-exón del gen o genes de sospecha.<sup>196</sup> Para el análisis de mutaciones puntuales en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se utilizó ADN de línea germinal siguiendo la secuencia que se muestra en la figura 11.

**FIGURA 11.** Procedimiento a seguir para el análisis genético de *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*:



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Los productos de amplificación de los genes *MLH1* y *MSH2* fueron generados con cebadores diseñados por Wahlberg *et al.* <sup>205</sup> a partir de unos previamente descritos <sup>124,206,207</sup>, extendiéndose en los lados de cada gen aproximadamente 50 pares de bases a partir del borde intrón/exón respectivo evitando amplificar un solo alelo y perder potenciales mutaciones. La secuenciación de *MLH1* y *MSH2* cubre exones de la región promotora, y regiones intrónicas adyacentes al sitio de corte (splice). Los productos de amplificación para el gen *MSH6* fue generados con cebadores diseñados por Chadwick RB *et al.* 2001<sup>206</sup> y Kolodner RD *et al.* 1999<sup>208</sup>.

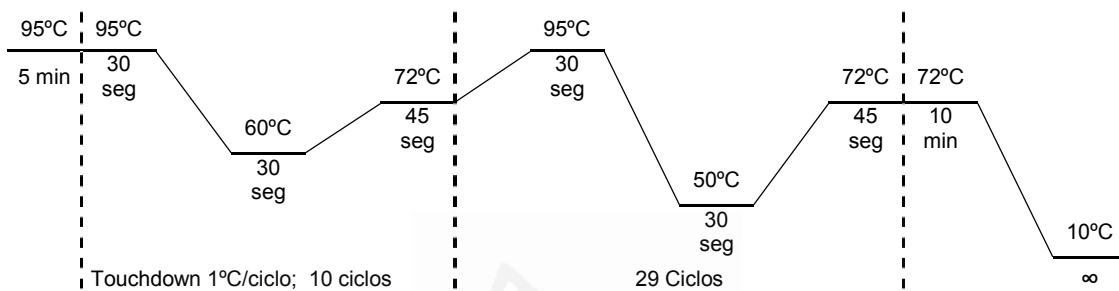
- *MLH1*. Cada uno de los 19 exones que tiene este gen corresponde a un amplicón, excepto el exón 12 que se amplifica en dos fragmentos (exón 12.1 y exón 12.2), los cebadores se describen en el Anexo 3<sup>205</sup>.
- *MSH2*. Cada uno de los 16 exones que tiene este gen corresponde a un amplicón, los cebadores se describen en el Anexo 4<sup>205</sup>

Las reacciones de PCR se realizaron en volumen final 15  $\mu\text{L}$ . Se prepara una pre-mezcla según sea el caso y luego se dispensan 14  $\mu\text{L}$  de pre-mezcla en tubos de reacción de 0,2  $\mu\text{L}$  convenientemente rotulados y se añade 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (*forward* y *reverse*) a una concentración 20 picomoles/ $\mu\text{L}$ .

*Para todos los exones excepto exón 12.1 de MLH1 y todos los exones de MSH2.* Se realizó una pre-mezcla de reacción para cada caso a analizar que contiene los reactivos comunes, excepto los cebadores: 7,5  $\mu\text{L}$  de Amplitaq Gold 360 Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2  $\mu\text{L}$  (~100ng) de ADN genómico (~ 50ng/  $\mu\text{L}$ ) y 4,5  $\mu\text{L}$  de Agua desionizada.

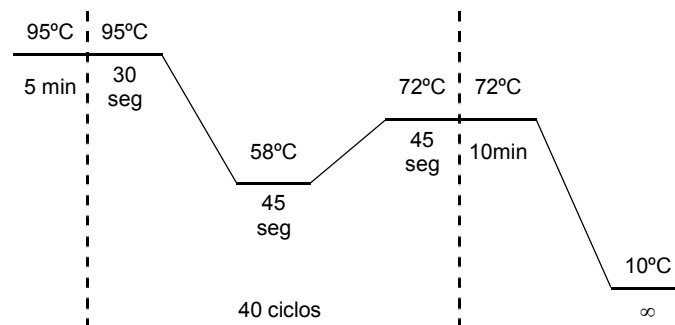
Las condiciones de PCR para la amplificación de exones de *MLH1* excepto exón 12.1 y todos los exones de *MSH2* fueron:

**FIGURA 12.** Condiciones de PCR para *MLH1* todos los exones excepto 12.1 y *MSH2* todos los exones



Para el exón 12.1 del *MLH1* se prepara una mezcla de reacción: 12,5  $\mu\text{L}$  de Amplitaq Gold 360 Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2 (~100ng) $\mu\text{L}$  de ADN genómico (~ 50ng/  $\mu\text{L}$ ), 8,5  $\mu\text{L}$  de Agua desionizada, 2,0  $\mu\text{L}$  de cebadores (*forward* y *reverse*) a una concentración 20 picomoles/ $\mu\text{L}$ . Las condiciones de PCR para la amplificación del exón 12.1 del *MLH1* fueron:

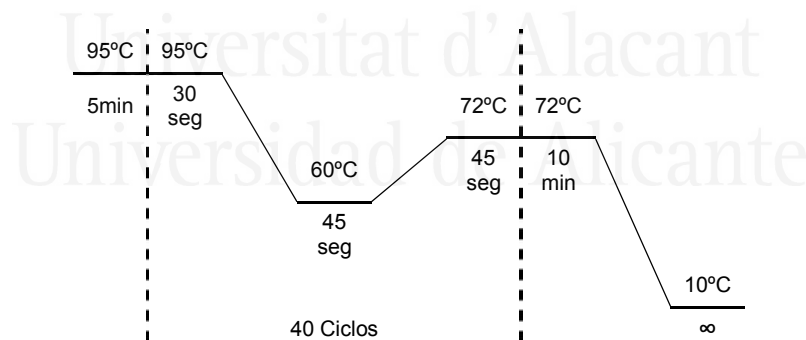
**FIGURA 13.** Condiciones de PCR para *MLH1* exón 12.1.



- *MSH6*. Cada uno de los 10 exones que tiene este gen corresponde a un amplicón, excepto el exón 4 que debido a su gran tamaño se amplifica en 10 fragmentos o amplicones solapantes. Los exones 8 y 9 se amplifican en la misma reacción de PCR debido a que el intrón que los separa es pequeño. Los cebadores se describen en el Anexo 5<sup>206 208</sup>.

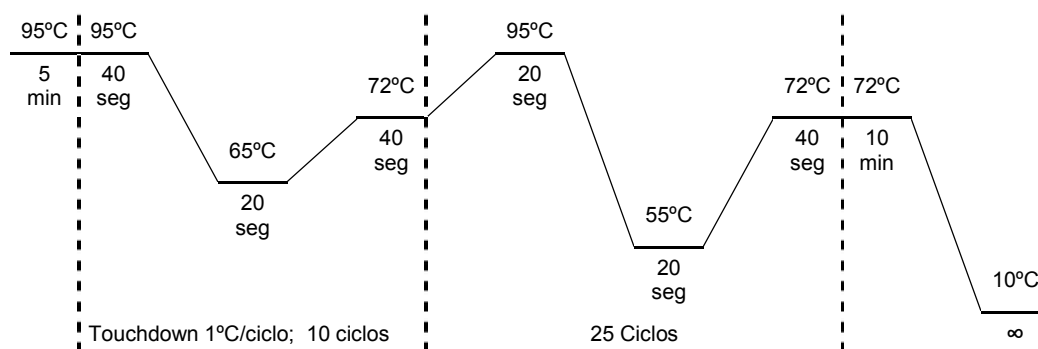
Para el Exón 1-7 y 10 del *MSH6*. Se prepara una pre-mezcla de reacción: 7,5 µL de Amplitaq Gold 360 Master Mix 2X (Applied Biosystems), 3 µL de Betaine 5M, 2 µL (~100ng) ADN genómico (~ 50ng/ µL), 1,5 µL de Agua desionizada. Las condiciones de PCR para la amplificación de exones del exones del *MSH6* fueron:

**FIGURA 14.** Condiciones de PCR para *MSH6* exón 1



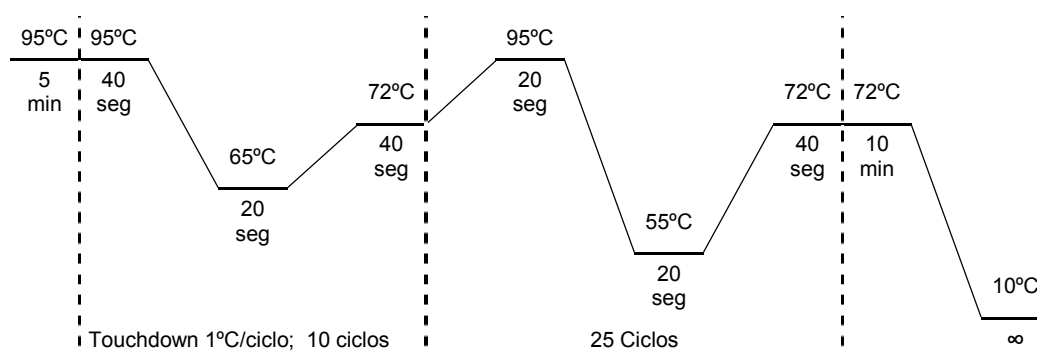


**FIGURA 15.** Condiciones de PCR para *MSH6* exones 2-7 y exón 10



Para los exones 8 y 9 del *MSH6*. Se prepara una pre-mezcla de reacción para cada caso a analizar que contiene los reactivos comunes, excepto los cebadores: 7,5  $\mu\text{L}$  de Amplitaq Gold 360 Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2  $\mu\text{L}$  (~100ng) de ADN genómico (~ 50ng/  $\mu\text{L}$ ) y 4,5  $\mu\text{L}$  de Agua desionizada. Las condiciones de PCR para la amplificación de exones 8 y 9 del *MSH6* fueron:

**FIGURA 16.** Condiciones de PCR para *MSH6* exones 8 y 9.

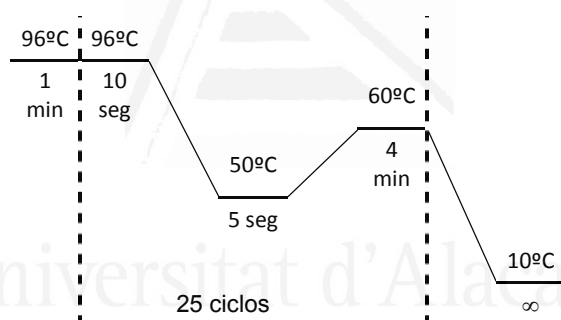


El producto de PCR se purificó con el reactivo Exosap-it (usb-Affymetrix) para eliminar los reactivos sobrantes de la reacción de PCR (dNTP, deoxinucleósidos trifosfato) y cebadores no utilizados.

Después de la purificación y según el protocolo del fabricante, se utilizó 1.5µL del producto de PCR como ADN molde para la reacción de secuencia usando el BigDye® Terminator Sequencing kit V3.1 (Applied Biosystems).

Las condiciones de PCR para la secuenciación fueron:

**FIGURA 17.** Condiciones de PCR para secuenciación.



El análisis de los productos generados durante la reacción de secuenciación se realiza mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN: Analizador Genético (ABI 3130, Applied Biosystems) usando cebadores fluorescentes de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Para el análisis de las secuencias en primer lugar, se revisó visualmente el electroferograma del gen secuenciado, generado con el programa *DNA Sequencing Analysis*, con objeto de detectar e identificar posibles variantes en heterocigosis. Si se detectó alguna variante en heterocigosis, se hizo una

revisión sobre su posible significado clínico. Si la variante genética era considerada patogénica, probablemente patogénica o de significado clínico desconocido, se procedió a la confirmación por secuenciación en ambas direcciones con nueva reacción de PCR partiendo de una nueva extracción de ADN.

### **Estudio de grandes reordenamientos**

Para el estudio reordenamientos grandes (deleciones y / o inserciones) en los genes MMR fueron seleccionadas por MLPA de acuerdo con los protocolos del fabricante (Kit de Salsa MLPA P003, P072 B1 y P008; MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos). El análisis de deleciones en el locus *EPCAM* se realizó también usando MLPA (kit Salsa MLPA P072-B1)

- El kit de Salsa MLPA P003 contiene sondas para cada uno de los 19 exones del *MLH1* que se extiende 100kb en el cromosoma 3p22.1 y los 16 exones *MSH2* que cubre 73kb en el cromosoma 2p21. Está diseñado para detectar deleciones / duplicaciones de una o más secuencias en los genes *referidos* en una muestra de ADN. Las deleciones heterocigóticas deberían dar un área de pico relativa reducida del 35-50% del producto de amplificación de dicha sonda. También puede causar una reducción del pico, una mutación o polimorfismo en la secuencia analizada.
- El kit de Salsa MLPA P072 B1 contiene sondas para cada uno de los 10 exones del gen *MSH6*. Contiene más de una sonda para varios exones. Además, se han incluido tres sondas para el gen *MUTYH*, tres sondas para el exón 1 de *MLH1* y siete sondas aguas arriba, de *MSH2*. Estas

sondas pueden ser útiles para confirmar y además caracterizar deleciones que implican el exón 1 de estos genes. También contiene varias sondas de *EPCAM* incluyendo dos sondas del exón 9, para detectar el silenciamiento de *MSH2*.

El análisis del gen *PMS2* es muy complicado por su longitud y presencia de pseudogenes. En los exones 13, 14, 15, no existen diferencias de secuencia fiable entre *PMS2* y su pseudogen *PMS2CL*<sup>209</sup>.

Como consecuencia, no fue posible diseñar sondas MLPA que sean 100% específicas para estos exones *PMS2*.

- El kit de Salsa MLPA P008 contiene sondas para cada uno de los 10 exones *MSH6* así como para 13 de los 15 exones *PMS2*. Dado que algunos exones *PMS2* tienen identidad de secuencia del 100% con uno o más pseudogenes, algunas sondas *PMS2* no son 100% específicas. Cinco sondas están presentes para el gen *MUTYH* y seis sondas se incluyen para *MLH3*. Además, se incluye una sonda para el exón 1 de *MSH2*, dos sondas para el gen *EPCAM*, dos sondas para el exón 1 de *MLH1*. Finalmente, está presente una única sonda para *APC*.

Los productos de ligación se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa usando un cebador marcado fluorescentemente y se analizaron en un secuenciador genético (ABI 3130, Applied Biosystems) usando el software Genemapper v4.0 (Applied Biosystems). La altura de pico de cada fragmento se comparó con las mediciones de una muestra de control y se sospecharon deleciones cuando la altura del pico era 60% o menos de controles sanos. Se

incluyeron muestras de ADN de control con reordenamientos genómicos conocidos de *MSH2* o *MLH1* en cada lote de experimentos.

Se confirmaron resultados de amplificación de sonda de ligación múltiple por reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa que abarca exones contiguos del fragmento suprimido sospechado.

También se realizó la prueba de confirmación usando MLPA con una combinación diferente de sondas (Salsa MLPA kit P248, MRC-Holland). La interpretación de los resultados del análisis genético se basó en las normas para la interpretación de las variaciones de secuencia del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG)<sup>84</sup> y la base de datos InSiGHT<sup>210</sup>, las referencias en el mismo se revisaron para clasificar las variantes genéticas. Las mutaciones que generan un codón de parada prematuro y como consecuencia una proteína truncada y no funcional fueron consideradas claramente deletéreas y diagnósticas de Síndrome de Lynch. Estos incluían; *frameshift*, *nonsense*, y *splice site*, así como grandes deleciones.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 7. Variables de resultado.

Las variables de resultado se han obtenido tras seguir con el algoritmo diseñado para éste estudio (Figura 18).

La sospecha de SL se basó en el estado MMR determinado únicamente por IHQ. En los casos en que los tumores mostraron pérdida de la expresión proteica de MLH1 se estudió previamente la presencia de la mutación *BRAF* en los tumores CCR y el estado de metilación del CE; si *MLH1* no estaba metilado y/o no se detectaba mutación en *BRAF*, se estudió la mutación del gen *MLH1*. El análisis de mutación del gen *MSH2* se realizó en aquellos casos con tumores sin expresión de *MSH2*<sup>211</sup>.

EL análisis del gen *MSH6* se realizó en pacientes con una falta de expresión de la proteína MSH6, pero con expresión normal de MSH2. Los tumores con una combinación de la falta de proteínas MSH2 y MSH6 con una mutación no detectada en *MSH2* también fueron estudiados para alteraciones genéticas de *MSH6*. En los casos estudiados para *MSH2* y *MSH6* sin mutación detectada también se analizaron para grandes reordenamientos en el locus *EPCAM*. Las pruebas genéticas para *PMS2* se realizaron sólo en aquellas pacientes con tumores que mostraron pérdida de expresión de *PMS2* y expresión normal de *MLH1* (Figura 18).

Las pacientes en las que sospechamos SL y eran candidatas para pruebas genéticas fueron remitidas a la Unidad de Consejo Genético en Cáncer (UCGC), donde brindó asesoramiento genético pre-test y en caso de aceptar el

estudio genético se tomó una muestra de sangre periférica para enviar al laboratorio.

Para el análisis de los resultados de estudiaron a los pacientes según:

a. Estado de la vía reparadora:

Para investigar la asociación entre el status MMR y las características clinicopatológicas y moleculares, clasificamos a los pacientes como:

- i. MMR deficiente: Si la paciente presenta un tumor con IMS y/o pérdida de expresión de alguna proteína del sistema MMR.
- ii. MMR normal: Si la paciente presenta un tumor MSS y conservación de la expresión de las proteínas del sistema MMR

b. Síndrome de Lynch:

Tras el estudio de la metilación en *MLH1*, *BRAF* y genes MMR clasificamos a los pacientes en

- i. Confirmado SL
  1. Mutación en línea germinal identificada
- ii. Sospechoso
  1. MMR deficiente y no metilado en *MLH1*
- iii. No SL
  1. MMR deficiente y metilado en *MLH1*
  2. MMR normal

## **8. Variables del estudio familiar.**

Una vez detectado el caso índice con la mutación patogénica, se informó a la UCGC, a través de los médicos responsables del proyecto, así las pacientes entraron en el circuito asistencial normal de la UCGC donde se recogió la información que permitió elaborar el árbol genealógico de cada paciente, a través de la unidad se realizó el estudio de portadores de la mutación en los familiares de primer grado, principalmente descendientes y en algunos casos también familiares de segundo grado según el algoritmo del circuito asistencial de las UCGC (Figura 19).

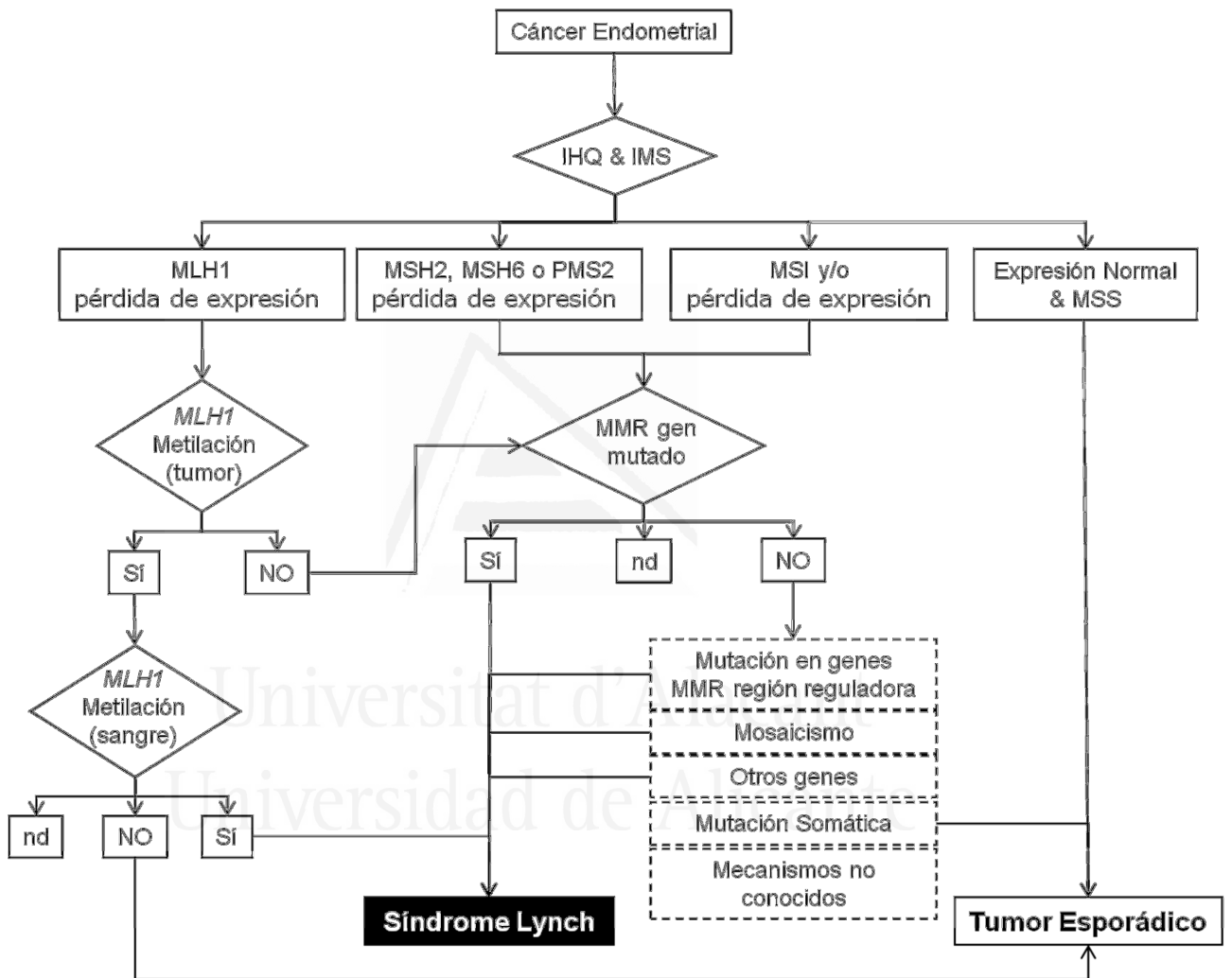


Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





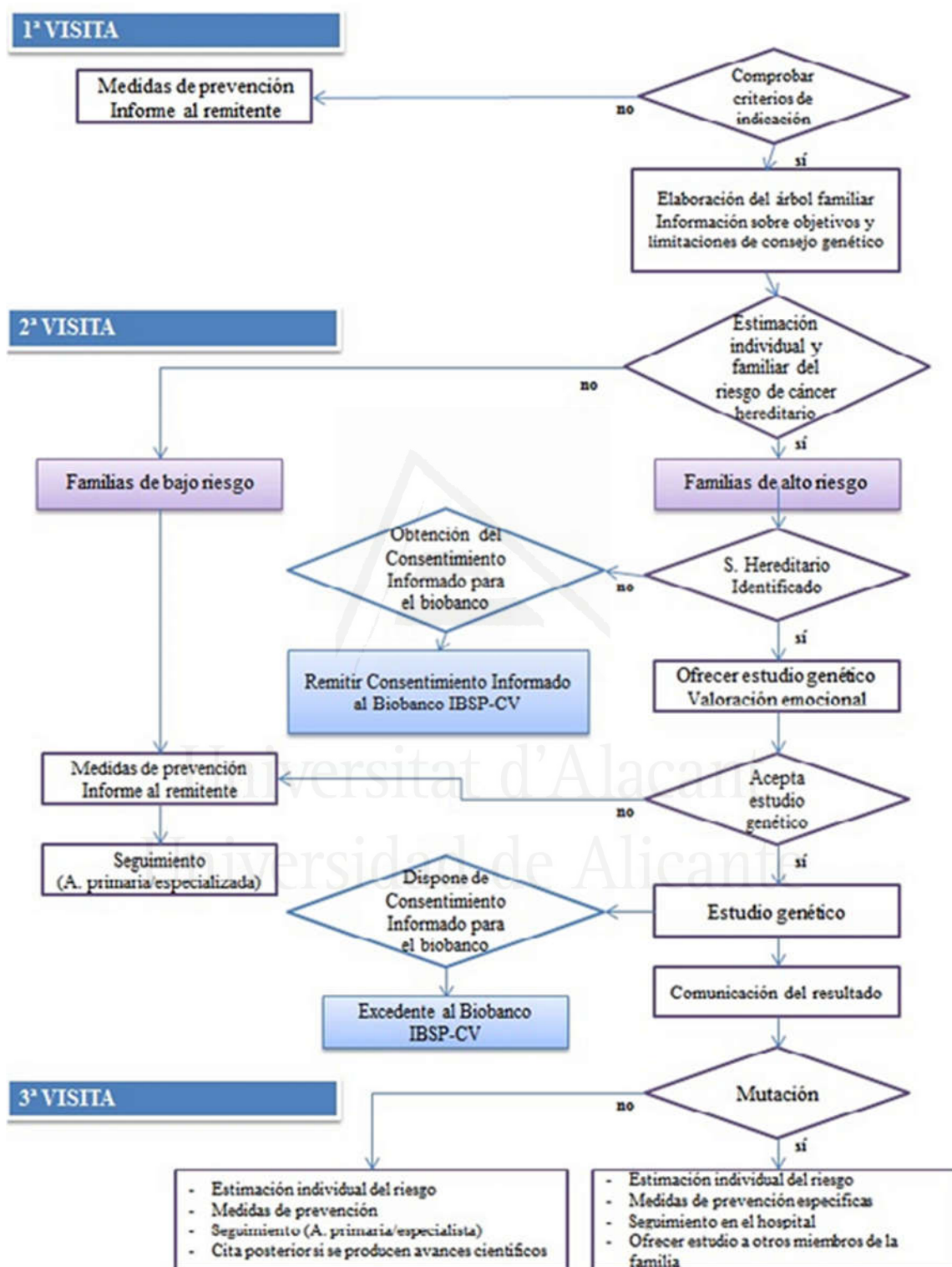
**FIGURA 18.** Algoritmo de trabajo para la identificación de pacientes con Síndrome de Lynch.



Adaptado de Egoavil *et al*, 2013<sup>211</sup>



**FIGURA 19.** Algoritmo del circuito asistencial de las Unidad de Consejo Genético en Cáncer.



Extraído de la Guía de Práctica Clínica en Cáncer Hereditario de la Comunitat Valenciana,

2017<sup>195</sup>.



## **5.5 ASPECTOS ÉTICOS**

El estudio realizado ha sido revisado y evaluado por la Comisión de Investigación y el Comité de Ética de Investigación Clínica del HGUA en el contexto de los proyectos financiados que se mencionan al principio del presente trabajo y cumple con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki.

Los pacientes firmaron el respectivo Consentimiento Informado (CI) para conservar el excedente de diagnóstico en el Biobanco. Para aquellos casos en los que no se pudo contactar con los pacientes o familiares para recabar el CI a posteriori, el Comité de Ética de Investigación Clínica aprobó la utilización de las muestras biológicas con los condicionamientos que exige la Ley 14/2007, del 3 de julio, de Investigación Biomédica, (Anexo 2)

La recogida de datos a partir de la Historia Clínica y de entrevistas a los pacientes se realizó posterior a la autorización del Comité de Ética del HGUA.

## **5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo inicial mediante medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas y de distribución de frecuencia para las variables cualitativas. Se graficaron los resultados de la manera más adecuada según correspondía.

En segundo término, se realizó un análisis bivariado, para las variables cuantitativas se probó la normalidad de su distribución mediante la prueba de

Kolmogorov-Smirnov y posteriormente se realizó la prueba de ANOVA o T de Student según correspondió.

El análisis bi-variado de variables cualitativas se hizo mediante la prueba de Chi cuadrado de independencia. El nivel de significación para todas las pruebas de hipótesis fue de 0.05. Los resultados se presentaron como odds ratio (OR) y 95% de intervalo de confianza. Así se obtuvo:

- Análisis estratificado de variables categóricas
- Análisis de varianza una vía (ANOVA) o T de Student entre variables continuas (edad) y variables categóricas como localización, variante histológica, inmunorreactividad, IMS etc.

El análisis se realizó con el programa estadístico *R* version 3.1.1 (The R Project for Statistical Computing. Available: [http:// www.r-project.org](http://www.r-project.org). Acceso, marzo 2017)<sup>126</sup>.

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**RESULTADOS**

---





## 6 RESULTADOS

Durante el período 1 Enero del 2004 al 31 de Diciembre 2009 se registraron 177 diagnósticos nuevos de CE, en el Servicio de Patología Quirúrgica y Necropsias del HGUA. De ellos 173 ingresaron al estudio de debido a que el material biológico de los 4 restantes no cumplía los requisitos para estudio. Las 173 pacientes presentaron material disponible para el estudio en de IHQ y estudio molecular provenientes de biopsias o pieza de histerectomía.

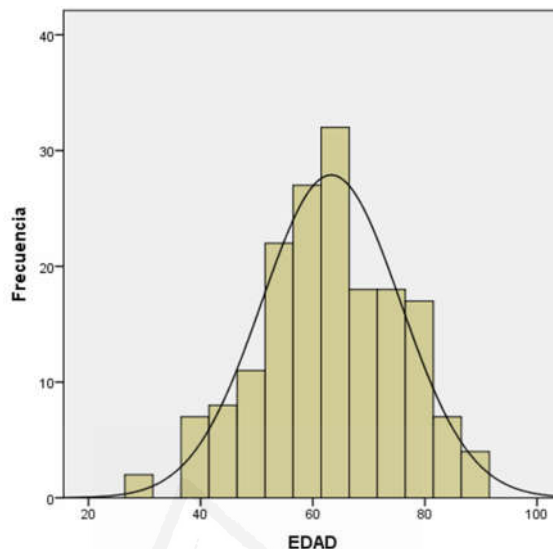
### 6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE ENDOMETRIO

La edad de las pacientes con CE estuvo en el rango 29-90 años con edad media 63.3 años (SD 12.47), siendo el 86.71% (150 pacientes) mayores de 50 años (Tabla 10 y Figura 20).

**TABLA 10.** Distribución por Grupo etario de los pacientes con cáncer de endometrio.

	<i>Frecuencia (n)</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
20-29	1	0,58
30-39	3	1,73
40-49	19	10,98
50-59	41	23,70
60-69	56	32,37
70-79	34	19,65
80-89	18	10,40
+90	1	0,58
Total	173	100

**FIGURA 20.** Distribución por Grupo etario de los pacientes cáncer de endometrio.



## 6.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se pudo establecer en el estadio clínico de 158 pacientes. La mayoría 119 (75.3%) fueron diagnosticados en estadio I, en estadio II y III 37 (23.4%) y sólo 2 casos (1.2%) tenían estadio IV.

El carcinoma endometriode fue la variante histológica más frecuente 137(79.2%), también se identificaron algunos Papilar Seroso (7.5%, 13/173), Células Claras (6.4%, 11/173) Pobremente diferenciado (4.6%, 8/473) y Tumor Mixto Múleriano (2.3%, 4/173). El grado tumoral según la FIGO más frecuente, fue el Grado1 (54.9%, 95/173). No se encontró invasión de miometrio en 10.3% (15/146) de pacientes y 63.7%(93/146) invadían menos del 50% del miometrio. Se identificó infiltrado intratumoral en 29.4% (47/160) de tumores y 17.9%. (24/134) presentaron Invasión vascular.

Veintiséis pacientes (17.1% 26/152) tuvieron cáncer de ovario sincrónico al momento del diagnóstico (Tabla 11).

**TABLA 11.** Características Clínico-patológicas en pacientes con cáncer de endometrio.

Variable	N	%
<b>Estadio al diagnóstico (N=158)</b>		
I	119	75,3
II	6	3,8
III	31	19,6
IV	2	1,3
<b>Tipo Histológico (N=173)</b>		
Endometroide	137	79,2
Pobremente Diferenciado	8	4,6
Papilar Seroso	13	7,5
Células Claras	11	6,4
MMMT	4	2,3
<b>Grade (FIGO)</b>		
Grado 1	95	54,9
Grado 2	29	16,8
Grado 3	49	28,3
<b>Invasión Miometrial (N=146)</b>		
Ninguno	15	10,3
≤50%	93	63,7
>50%	38	26,0
<b>Linfocitosis intratumoral (N=160)</b>		
Ausente	113	70,6
Presente	47	29,4
<b>Invasión vascular (N=134)</b>		
Ausente	110	82,1
Presente	24	17,9
<b>Segmento Uterino bajo</b>		
Ausente	157	90,8
Presente	16	9,2
<b>Cáncer de Ovario Sincrónico (N=152)</b>		
Ausente	125	82,2
Presente	27	17,8

MMMT: Tumor Mixto Múleriano, FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

### **6.3 CARACTERÍSTICAS RELACIONAS CON EL SÍNDROME DE LYNCH**

Del total de la serie de pacientes incluidos, solamente ocho pacientes (4.6%) tenían antecedentes de lesiones en colon o recto y 10 (5.8%) tenían antecedentes de cáncer de mama y otras neoplasias.

El antecedente familiar de cáncer estuvo disponible en 50.2% (87/173) de casos de ellos 48.3% (42/87) cumplían los criterios de Bethesda y cuatro (4.6% 4/87) cumplían con los criterios de Amsterdam II.

La historia familiar de cáncer de los 86 casos restantes no estuvo disponible debido a historia familiar no confirmada, pérdidas en el seguimiento o fallecimiento.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**TABLA 12.** Características relativas al Síndrome de Lynch en pacientes con cáncer de endometrio

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Criterios de síndrome Lynch</b>	<b>87</b>	
Criterios Bethesda Revisado	38	43.68
Criterios Amsterdam II	4	4.60
Sin Criterios para SL	45	51.72
<b>Historia Personal de Lesiones colorrectales</b>	<b>8</b>	
Cancer Colon	6	3.47*
Polipos	2	1.16*
<b>Historia Personal Otros Tumores</b>	<b>15</b>	
Cancer Mama	10	5.78*
Cáncer Pulmón	2	1.16*
Cáncer Pleura	1	0.58*
Cáncer de tiroides (Medular)	1	0.58*
Cáncer Urotelial	1	0.58*
<b>Expresión de proteínas por IHQ:</b>	<b>173</b>	
<b>Pérdida de MLH1/MSH2/MSH6/PMS2</b>		
No	115	66.47
Sí	58	33.53
<b>Inestabilidad de Microsatélites</b>	<b>173</b>	
MSS	126	72.83
IMS	47	27.17
<b>Alteración de la Vía Reparadora (MMR)</b>	<b>173</b>	
Normal	112	64.74
Deficiente	61	35.26

\* Porcentaje calculado sobre la serie total (n=173)

#### 6.4 ALTERACIONES DE LA VÍA REPARADORA

Se encontró alteración de la Vía de reparación MMR (pérdida de la expresión de la proteína MMR y / o IMS) en 61 pacientes (35.3%).

La pérdida de expresión de MLH1 se encontró en 44 pacientes (25.4%). De éstos, 34 (77.3%) mostraron hipermetilación de *MLH1* en el tumor, sólo en nueve de estos casos se tenía disponible ADN de las células sanguíneas, para el análisis de hipermetilación de *MLH1* en sangre como prueba de epimutación constitutiva de *MLH1*. Los nueve casos analizados en sangre resultaron negativos. Por lo tanto, todos los tumores con *MLH1* hipermetilado se consideraron CE esporádicos. Se realizaron 34 estudios de mutación en *BRAF* y ninguno de los CE tenía la mutación.

La pérdida de expresión proteica de MSH2 / MSH6 se detectó en cinco pacientes (2.9%), mientras que la pérdida de expresión de sólo MSH6, o sólo PMS2, se observó en ocho (4.6%). Se encontró un caso, con ambas pérdidas de MSH6 y PMS2 (Tabla 13).

**TABLA 13.** Descripción de las alteraciones de la Vía Reparadora en los pacientes con cáncer de endometrio.

<b>Patrón de expresión de IHQ</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Expresión Normal	115	66.47
Pérdida de expresión de sólo MSH6	7	4.05
Pérdida de expresión de sólo PMS2	1	0.58
Pérdida de expresión de MLH1/PMS2	42	24.28
Pérdida de expresión de MSH2/MSH6	5	2.89
Pérdida de expresión de MSH6/PMS2	1	0.58
Pérdida de expresión de MLH1/PMS2/MSH6	2	1.16

<b>MMR IHQ y análisis de IMS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Expresión Normal y MSS	112	64.74
Pérdida de expresión de MMR y IMS	44	25.43
Expresión Normal y IMS	3	1.73
Pérdida de expresión de MMR y MSS	14	8.09

<b>Análisis de Metilación</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Pérdida de expresión de MLH1 y Metilado	34	77.27
Pérdida de expresión de MLH1, no Metilado	10	22.73

Todos estos casos, junto con otros 10 casos con pérdida de MLH1 expresión y la ausencia de *MLH1* metilación se consideraron sospechosas de SL y candidatos para las pruebas genéticas.

Se encontró una asociación significativa entre los resultados de IHQ y IMS ( $p < 0,0001$ ) mostrando concordancia en el 90,2% de los casos (156/173). Ocurrieron 17 casos (9.8%, 17/173) de discordancias entre IHQ e IMS con pérdida de expresión de las proteínas MMR y MSS en 14 de ellos y 3 con expresión normal de proteínas MMR y IMS. No teníamos evidencia de un



origen esporádico de estos tumores por lo que también se consideraron como sospecha de SL.

Al analizar el estado de metilación con la edad encontramos que la media de edad en los casos metilados fue de 65.15 años (DE 11.22) y para los casos no metilados fue de 58.7 años (DE 11.61) sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.12$ ).

Finalmente, un total de 27 (15.6%) casos se incluyeron en el análisis genético para la detección de mutaciones en la línea germinal en los genes MMR.

## **6.5 DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES CON SOSPECHA DE SL Y CE ESPORÁDICO**

El análisis comparativo entre los casos sospechosos de SL y los casos con CE estables (MMR normal) demostró que la condición de sospecha hereditaria era más frecuentemente en mujeres menores de 50 años (OR 2.84; IC del 95%: 1.04-7.77). No se encontraron diferencias significativas en ninguna otra variable clínica o patológica (Tabla 14).

**TABLA 14.** Análisis comparativo de los factores asociados con el riesgo de Síndrome de Lynch y cáncer de endometrio esporádico.

	Riesgo de SL		MMR normal			p
Nº de parientes	27		146			
Media edad (SD)	57.70	(12.45)	64.31	(12.12)		<b>0.01</b>
	N	%	N	%	OR (IC 95%)	p
<b>Edad</b>						
<50 años	7	25.93	16	10.96	2.84 (1.04-7.77)	<b>0.04</b>
≥50 años	20	74.07	130	89.04		
<b>Tipo Histológico</b>						
Endometroide (tipo I)	22	81.48	123	84.25	0.82 (0.28-2.39)	0.72
Especial (tipo II)	5	18.52	23	15.75		
<b>Grado (FIGO)</b>						
Alto	9	33.33	40	27.40	1.32 (0.5-3.19)	0.53
Bajo	18	66.67	106	72.60		
<b>Invasión Miometrial (n=146)</b>						
>50%	6	25.00	32	26.23	0.93 (0.34-2.57)	0.90
≤50%	18	75.00	90	73.77		
<b>Linfocitosis intratumoral (n=160)</b>						
Presente	9	33.33	38	28.57	1.25 (0.52-3.03)	0.62
Ausente	18	66.67	95	71.43		
<b>Invasión vascular (n=134)</b>						
Presente	7	30.43	17	15.32	2.42 (0.87-6.76)	0.09
Ausente	16	69.57	94	84.68		
<b>Segmento Uterino bajo</b>						
Presente	4	14.81	12	8.22	1.94 (0.57-6.54)	0.28
Ausente	23	85.19	134	91.78		
<b>Cáncer de Ovario Sincrónico (n=152)</b>						
Presente	5	18.52	22	17.60	1.06 (0.36-3.11)	0.91
Ausente	22	81.48	103	82.40		
<b>Criterios de Bethesda revisados (n=86)</b>						
Cumple	14	60.87	28	44.44	1.94 (0.73-5.14)	0.18
No Cumple	9	39.13	35	55.56		
<b>Criterios de Amsterdam II (n=17)</b>						
Cumple	3	33.33	1	12.50	3.50 (0.28-43.16)	0.31
No Cumple	6	66.67	7	87.50		

Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon los pacientes que presentaban MMR deficiente con aquellos con MMR normal (Tabla 15), con la excepción de TIL y LIV, fuertemente asociados con tumores MMR anormales (OR 5.8; IC del 95% (2.8-12.3) y OR 3.03; IC del 95%: (1.2-7.5) respectivamente).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**TABLA 15.** Análisis comparativo de los factores asociados con MMR alterado y normal en Tumores de endometrio.

	MMR deficiente		MMR Normal			p
Nº de parientes	61		112			
Media edad (SD)	61.85	(12.26)	64.05	(12.42)		0.26
	N	%	N	%	OR (IC 95%)	p
<b>Edad</b>						
<50 años	10	16.39	13	11.61	1.49 (0.61-3.63)	0.38
≥50 años	51	83.61	99	88.39		
<b>Tipo Histológico</b>						
Endometroide (tipo I)	53	86.89	92	82.14	1.44 (0.59-3.49)	0.42
Especial (tipo II)	8	13.11	20	17.86		
<b>Grado (FIGO)</b>						
Alto	21	34.43	28	25	1.57 (0.79-3.10)	0.19
Bajo	40	65.57	84	75		
<b>Invasión Miometrial (n=146)</b>						
>50%	13	22.81	25	28.09	0.76 (0.34-1.63)	0.48
≤50%	44	77.19	64	71.91		
<b>Linfocitosis intratumoral (n=160)</b>						
Presente	31	52.54	16	15.84	5.88 (2.80-12.31)	<0.001
Ausente	28	47.46	85	84.16		
<b>Invasión vascular (n=134)</b>						
Presente	15	27.78	9	11.25	3.03 (1.22-7.56)	0.01
Ausente	39	72.22	71	88.75		
<b>Segmento Uterino bajo</b>						
Presente	7	11.48	9	8.04	1.48 (0.52-4.2)	0.46
Ausente	54	88.52	103	91.96		
<b>Cáncer de Ovario Sincrónico (n=152)</b>						
Presente	11	18.33	16	17.39	1.06 (0.46-2.48)	0.88
Ausente	49	81.67	76	82.61		
<b>Criterios de Bethesda revisados (n=86)</b>						
Cumple	22	56.41	20	42.55	1.74 (0.74-4.11)	0.20
No Cumple	17	43.59	27	57.45		
<b>Criterios de Amsterdam II (n=17)</b>						
Cumple	4	30.77	0	0	1.44 (1.0-2.07)	0.20
No Cumple	9	69.23	4	100		

## 6.6 ANÁLISIS EN LÍNEA GERMINAL DE MUTACIONES EN GENES DE LA VIA REPARADORA

Se estudió las mutaciones en línea germinal de 19 pacientes del grupo sospechoso de SL (19/27, 70.4%). No se realizó el estudio en ocho pacientes porque tres (3/27, 11.1%) rechazaron las pruebas, tres (3 / 27, 11.1%) se perdieron en el seguimiento y dos fallecieron (2/27, 7.4%).

Encontramos ocho pacientes con mutaciones patógenas (8/19, 42.1%) que representan el 4,6% de la serie completa; Uno en *MLH1*, tres en *MSH2*, tres en *MSH6* y uno en *PMS2* genes (Tabla 16).

**TABLA 16.** Patrón de expresión proteica por IHQ pacientes con sospecha de SL.

Patrón de expresión de IHQ	Riesgo de Síndrome Lynch	Mutación Línea Germinal / Casos Analizados
Pérdida de expresión de MLH1 no Metilado	10	1/6
Pérdida de expresión de MSH2/MSH6	5	3/4
Pérdida de expresión de MSH6	7	2/5
Pérdida de expresión de PMS2	1	1/1
Pérdida de expresión de MSH6/PMS2	1	0/1
IMS + normal IHQ	3	1/2
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>8/19</b>

La edad media de estos pacientes fue 48.75 años, significativamente menor que en el grupo con CE sin SL (CE esporádico). (Tabla 17).

Veinticinco por ciento de ellos (2/8) no cumplieron con los criterios Bethesda y un caso mostró IMS negativo (con pérdida aislada de expresión proteica en MSH6) (Tabla 17 y 18).

Dos pacientes tenían cánceres ováricos sincrónicos y uno tenía un cáncer de colon sincrónico (Tabla 18). La presencia de cáncer de ovario sincrónico y linfocitos infiltrantes de tumores se asoció a casos de SL confirmados en comparación con CE sin SL (Tabla 17).

El estudio de asociación entre los casos mutados y los no mutados sólo la edad tuvo una asociación estadísticamente significativa, las mutaciones se encontraron con mayor frecuencia entre las mujeres con CE diagnosticadas antes de los 50 años, (OR 16.67; 95% CI 1.01–588.03;  $p = 0.048$ ).

Once casos deficientes en MMR no metilados (6,4% de la cohorte total 11/173), sin mutación en los genes analizados corresponden se les puede clasificar como Síndrome Lynch-Like.

**TABLA 17.** Estudio comparativo de pacientes con CE asociado a SL vs CE esporádico

	SL		No-SL			p
Número de pacientes	8		165			
Edad, media (SD)	48.75	(8.31)	63.98	(12.12)		<b>0.001</b>
	N	%	N	%	OR (IC 95%)	p
<b>Edad</b>						
<50 años	5	62.50	18	10.91	13.61(2.99,61.78)	<b>0.0001</b>
≥50 años	3	37.50	147	89.09		
<b>Tipo Histológico</b>						
Endometroide (tipo I)	7	87.50	138	83.64	1.37(0.16,11.58)	0.77
Especial (tipo II)	1	12.50	27	16.36		
<b>Grado (FIGO)</b>						
Alto	3	37.50	46	27.88	1.55 (0.36, 6.76)	0.55
Bajo	5	62.50	119	72.12		
<b>Invasión Miometrial (n=146)</b>						
>50%	1	14.29	37	26.62	0.46(0.05, 3.96)	0.47
≤50%	6	85.71	102	73.38		
<b>Linfocitosis intratumoral (n=160)</b>						
Presente	5	62.50	42	27.63	4.37 (0.99, 19.08)	<b>0.035</b>
Ausente	3	37.50	110	72.37		
<b>Invasión vascular (n=134)</b>						
Presente	3	37.50	21	16.67	3.0 (0.67, 13.53)	0.14
Ausente	5	62.50	105	83.33		
<b>Segmento Uterino bajo</b>						
Presente	2	25.00	14	8.48	3.60 (0.66, 19.51)	0.12
Ausente	6	75.00	151	91.52		
<b>Cáncer de Ovario Sincrónico (n=152)</b>						
Presente	4	50.00	23	15.97	5.26(1.23, 22.56)	<b>0.014</b>
Ausente	4	50.00	121	84.03		
<b>Historia Familiar (rBG + AmlI)(n=87)</b>						
Cumple	6	75.00	36	45.57	3.58 (0.68, 18.85)	0.11
No Cumple	2	25.00	43	54.43		
<b>Inestabilidad de Microsatélites (n=173)</b>						
IMS	7	88.00	42	25.00	20.5 (2.5,171.5)	<b>0.005</b>
MSS	1	13.00	123	75.00		

**TABLA 18.** Características de los pacientes con mutación en línea germinal de Síndrome de Lynch con Cáncer de endometrio.

Caso	rBG	Edad	IMS	Pérdida IHQ	Gen	Nomenclatura Nucleótido	Figura	Nomenclatura Proteína	Síncronos tumor/lesión	Tipo de mutación
End131	Yes	41	IMS	MLH1/PMS2	<i>MLH1</i>	c.2154_2157insAACA #	Figura 21	p.His718Glnfs*5	Polipo Colonico	<i>frameshift</i>
End111	Yes	45	IMS	MSH2/MSH6	<i>MSH2</i>	c.1-?_645+?del Delección del exón 1-3	Figura 22	p?	Cáncer Colon	Grandes deleciones
End091	Yes	40	IMS	MSH2/MSH6	<i>MSH2</i>	c.1226_1227delAG	Figura 23	p.Gln409Argfs*7	Cáncer Ovario	<i>frameshift</i>
End003	Yes	60	IMS	MSH2/MSH6	<i>MSH2</i>	c.1387-?_1661del Delección del exón 9-10	Figura 24	p?	Ninguna	Grandes deleciones
End014	No	61	IMS	MSH6	<i>MSH6</i>	c.2731C>T <sup>£</sup>	Figura 25	p.Arg911*	Ninguna	<i>nonsense</i>
End088	Yes	45	MSS	MSH6	<i>MSH6</i>	c.1367G>A #	Figura 26	p.Trp456*	Cáncer Ovario	<i>nonsense</i>
End137	No	56	IMS	No loss	<i>MSH6</i>	c.1367G>A #	Figura 26	p.Trp456*	Ninguna	<i>nonsense</i>
End034	Yes	44	IMS	PMS2	<i>PMS2</i>	c.538-?_705+? Delección del exón 6 #	Figura 27- 29	p?	Ninguna	Grandes deleciones

# No descritos en la base de datos InSiGHT





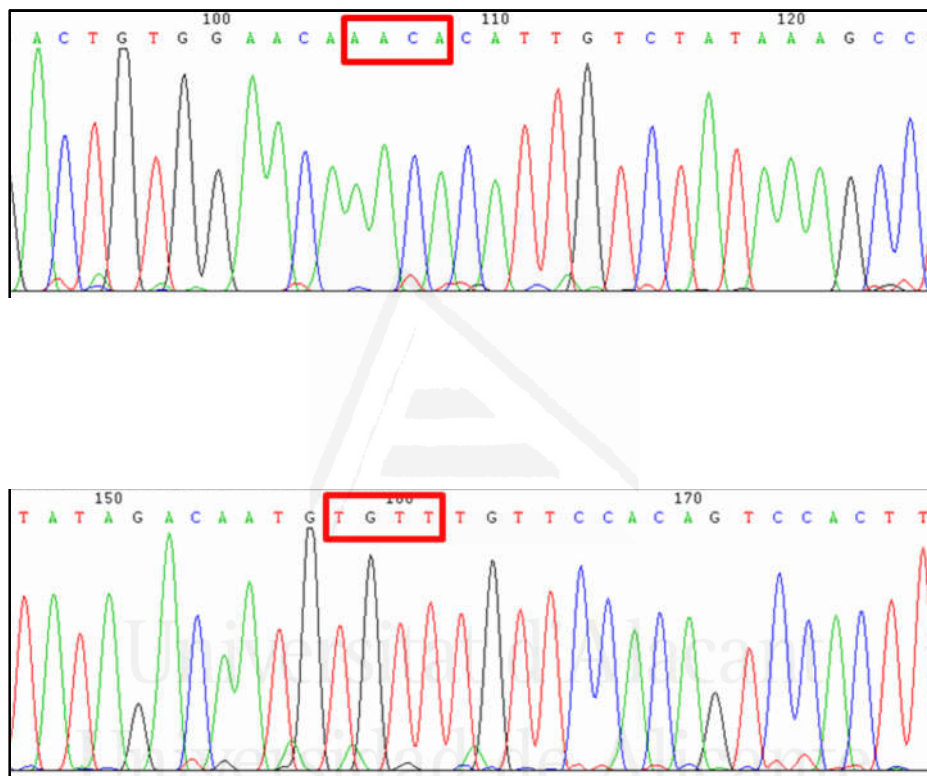
## 6.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES

Tres de las mutaciones (37.5%, 3/8) fueron grandes deleciones (dos en *MSH2* y una en *PMS2*), otras tres (37.5%, 3/8) fueron mutaciones *nonsense* (todas en el gen *MSH6*) y dos (25%, 2/8) fueron mutaciones de *frameshift* (una inserción en *MLH1* y una deleción en *MSH2*). Tres de las siete mutaciones encontradas en este trabajo no habían sido descritas previamente en las bases de datos de InSiGHT y fueron consideradas patogénicas porque generan codones de parada prematura y en consecuencia generan una pérdida de funcionalidad del alelo.

Grandes deleciones similares a las encontradas en *MSH2* (deleción de los exones 1-3 y 9-10) habían sido previamente publicadas y recogidas en bases de datos como responsables del síndrome de Lynch (ClinVar, InSiGHT).

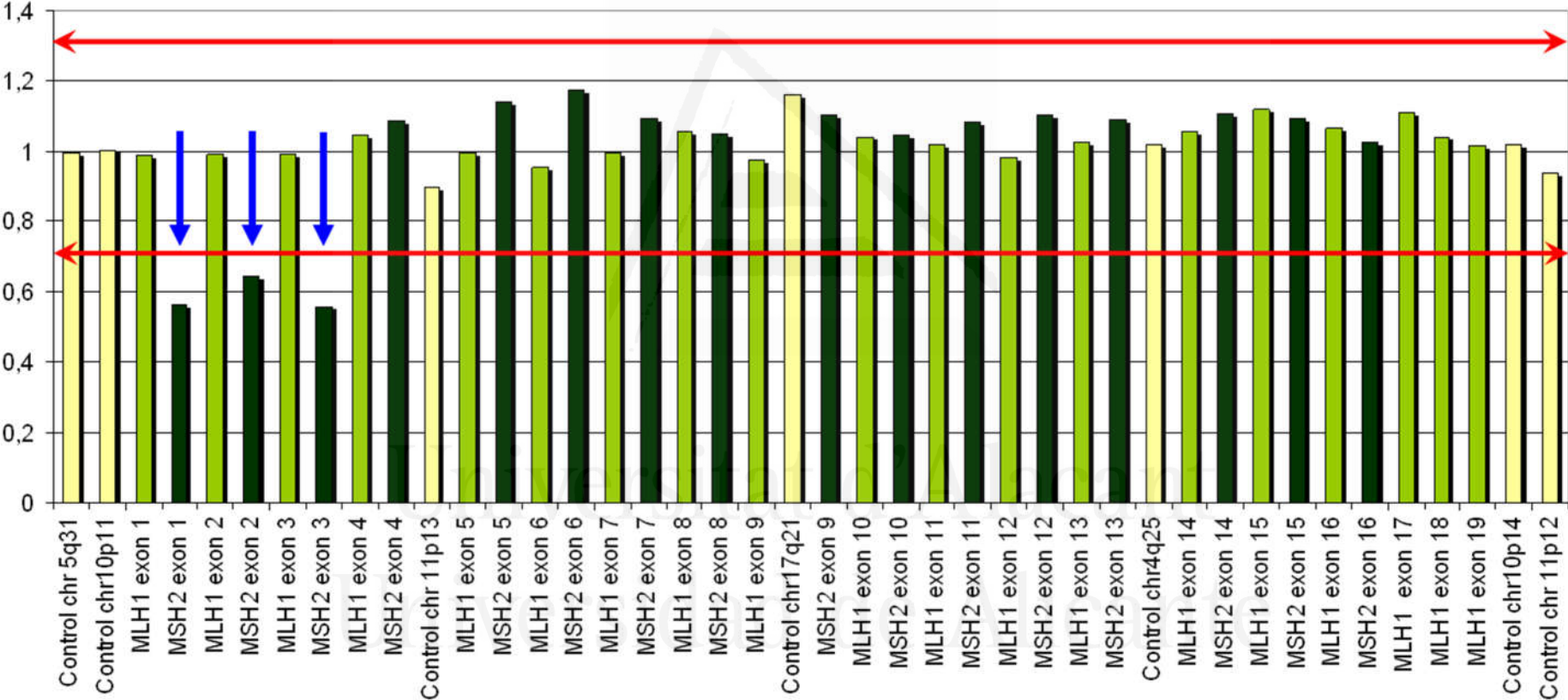


**FIGURA 21.** Cromatografía de la secuencia genética del gen *MLH1*. Se muestra la mutación *frameshift* encontrada c.2154\_2157insAACA no descrita en InSiGHT, detectada en el caso End 131.



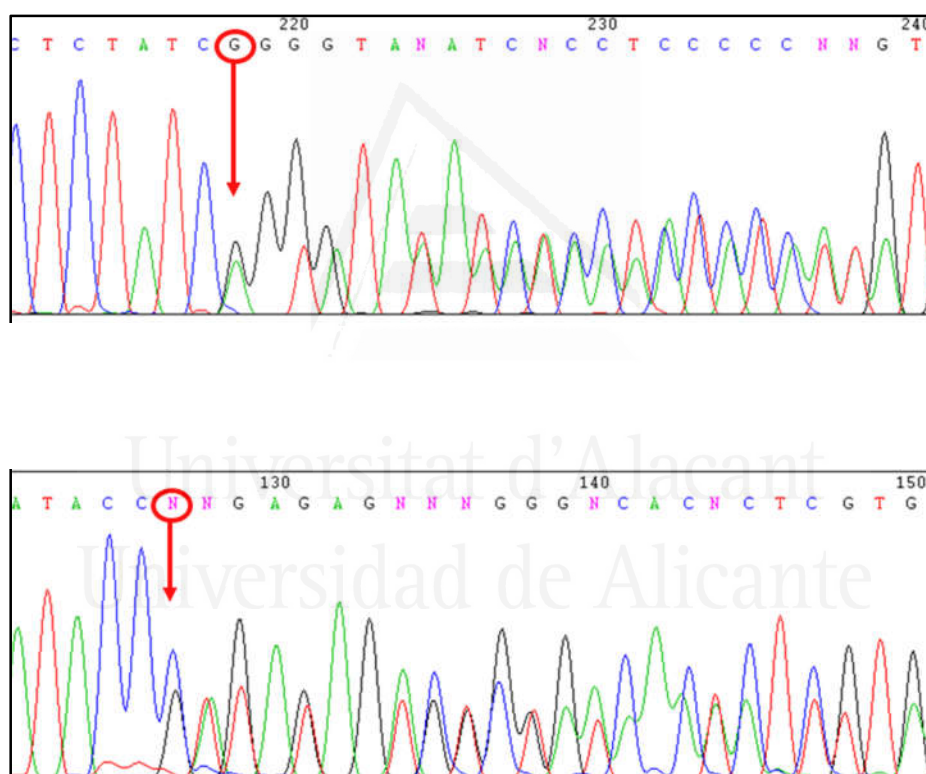


**FIGURA 22.** Resultado del estudio de MLPA *MLH1-MSH2* del caso End 111. Se observa una deleción del exón 1 al 3 afectando a las tres sondas de sendos exones que incluye el kit de Salsa MLPA P003.





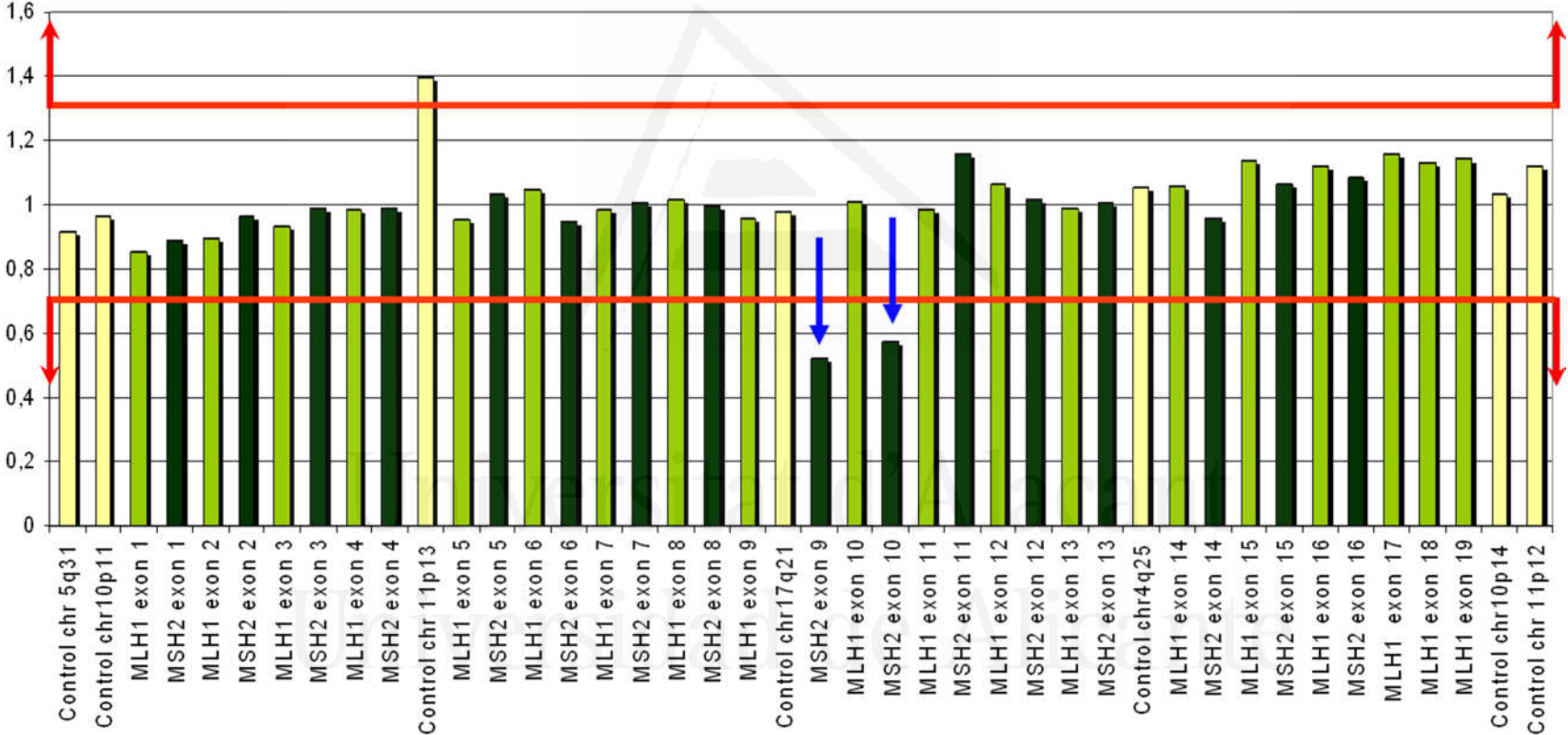
**FIGURA 23.** Cromatografía de la secuencia genética del gen *MSH2*. Se muestra la mutación *frameshift* encontrada c.1226\_1227delAG. Detectada en el caso End 091.





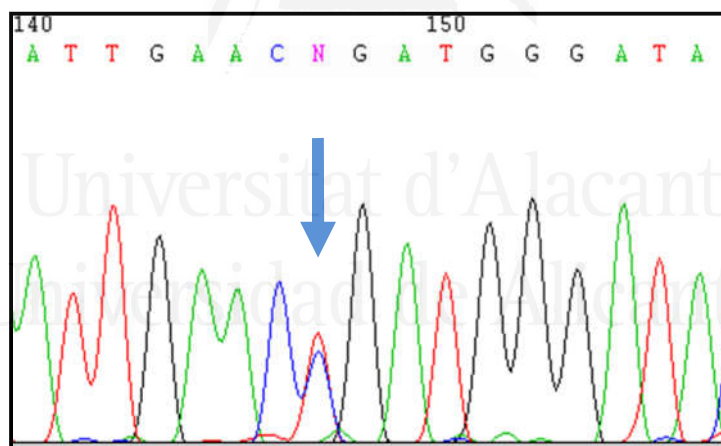


**FIGURA 24.** Resultado del estudio de MLPA *MLH1-MSH2* del caso End 03. Se observa una delección del exón 9 y 10 afectando a las dos sondas de dicho exón que incluye el kit de Salsa MLPA P003.



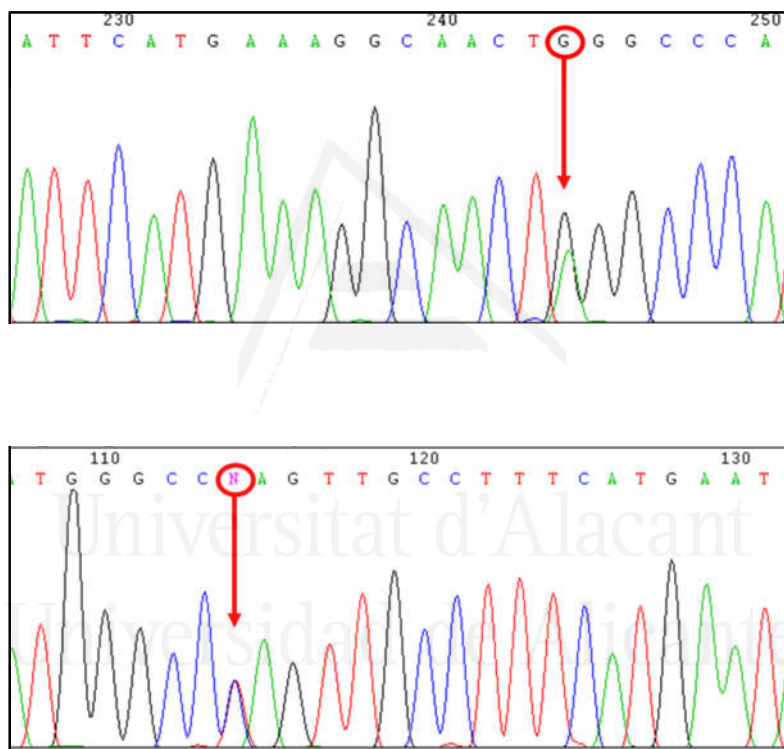


**FIGURA 25.** Cromatografía de la secuencia genética del gen *MSH6* exón 4. Se muestra la mutación encontrada c.2731C>T heterocigosis. Detectada en el caso End 14.





**FIGURA 26.** Cromatografía de la secuencia genética del gen MSH6. Se muestra la mutación nonsense encontrada c.1367G>A no descrita en InSiGHT. Detectada en los casos End 88 y End 137.





La deleción en el exón 6 de *PMS2* (c.538-?\_705+?) no se había descrito previamente. De forma consistente se observó una pérdida de señal en los sitios de reconocimiento de las dos parejas de sondas de MLPA correspondientes al exón 6, mientras que la señal de las sondas correspondientes a los exones 5 y 7 era completamente normal (Figura 24). En consecuencia, podemos establecer que el tamaño mínimo y máximo de la deleción está entre XX y 5.200 bp (Figura 25). La deleción afectaría a dominios funcionales importantes de la proteína *PMS2* como son la actividad MMR y dominio ATPasa (Figura 26).

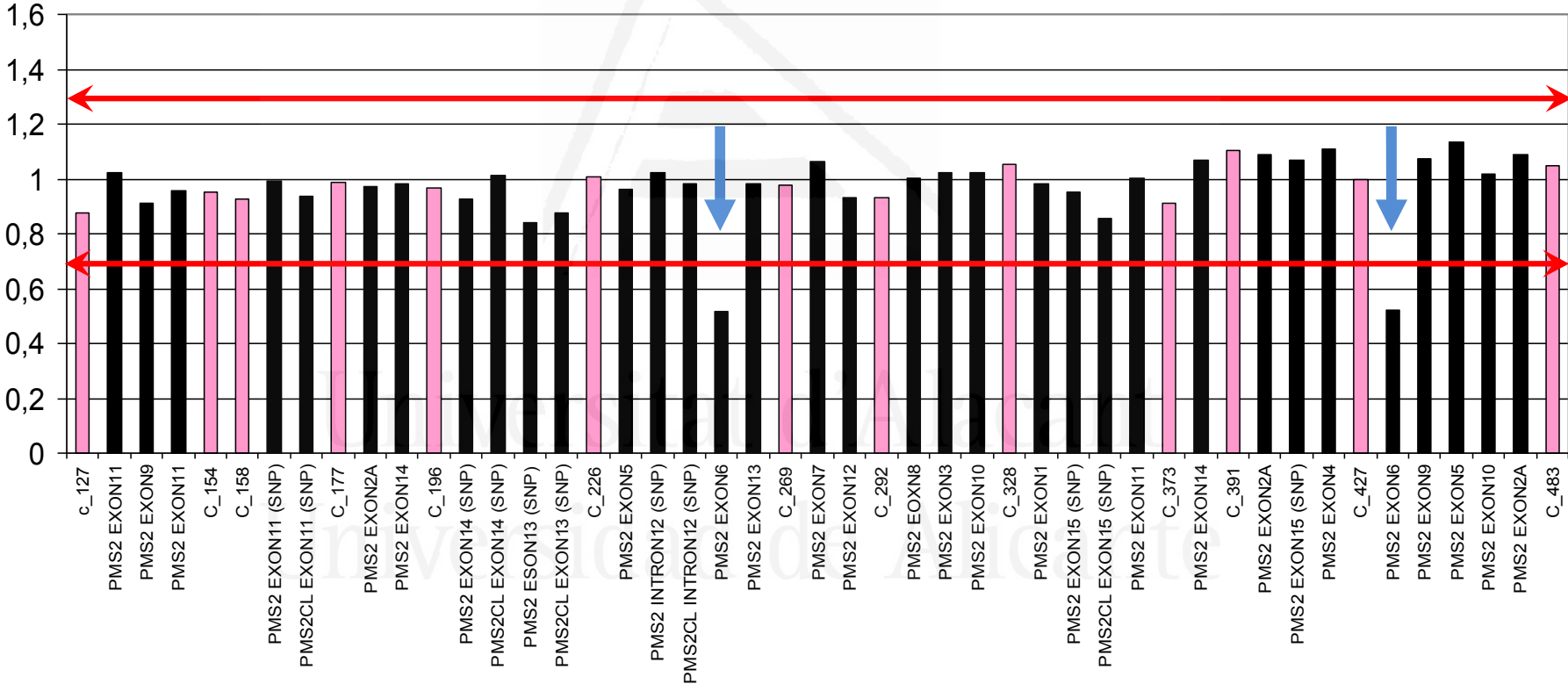


Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





**FIGURA 27.** Resultado del estudio de MLPA de *PMS2* del caso End 034. Se observa una delección del exón 6 afectando a las dos sondas de dicho exón que incluye el kit MLPA PMS2 P008-B1 *PMS2* exón 6 heterocigoto.





**FIGURA 28.** Esquema de la localización de la deleción y estimación del tamaño de la región del exón 6 del *PMS2*.

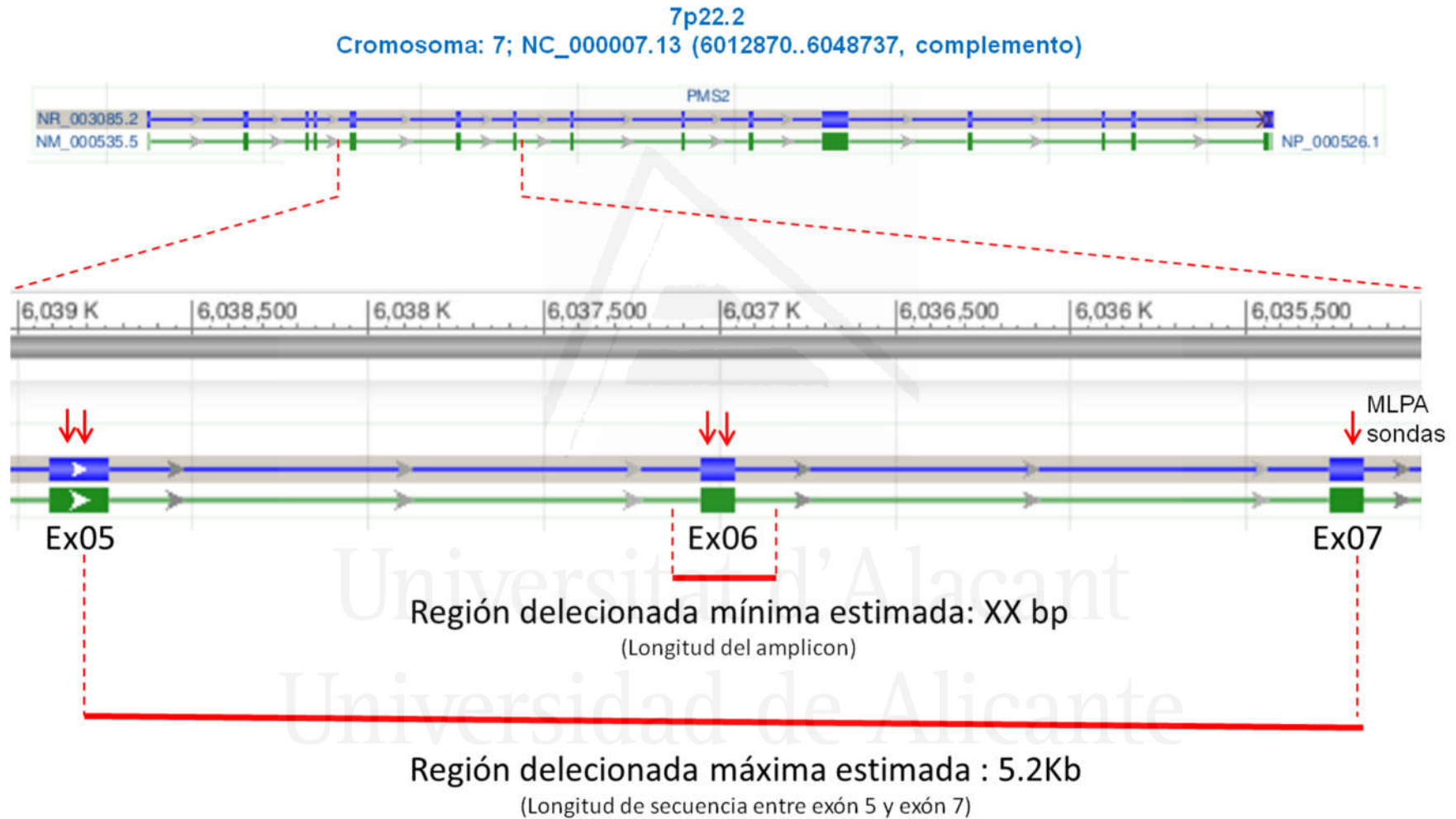
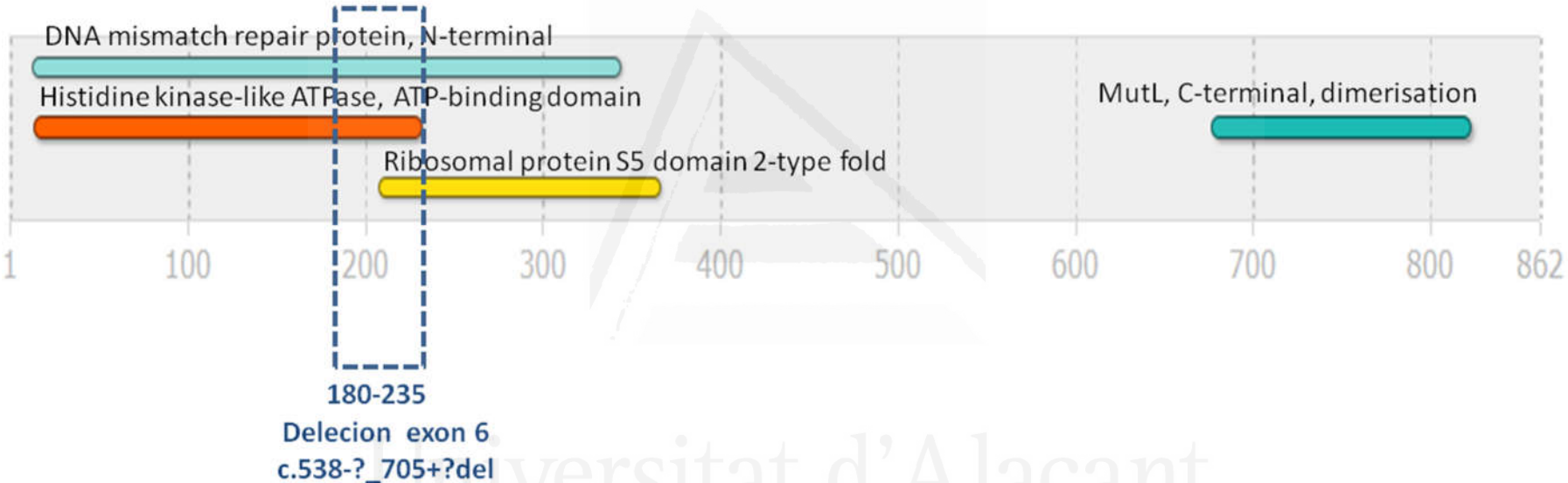




FIGURA 29. Esquema de la Endonucleasa PMS2 (P54278) y la localización de los dominios de la proteína. Se señala la localización de la zona de ledeción del exón 6 c.538-?\_705+?del

### Dominios



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Inicialmente, otros dos pacientes mostraron variantes genéticas *missense* consideradas de significado clínico desconocido, ambos en *MSH6*. (c.116GA, p.Gly39Glu<sup>212</sup> y c.1109TC, p.Leu370Ser<sup>213</sup>). La predicción usando Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) clasificó ambas variantes como probablemente patógenas. Además, ambos tumores mostraron pérdida de expresión de *MSH6* con expresión conservada de *MSH2*, y ausencia de IMS. No obstante, posteriormente nuevas evidencias acumuladas en el estudio de clasificación de variantes de síndrome de Lynch permitió clasificar la variante *MSH6*: c.116GA; p(.Gly39Glu) como no patogénica o benigna<sup>85,212</sup>

## 6.8 CRITERIOS DE BETHESDA

En relación a los criterios de Bethesda, seis de los 8 casos mutados habrían sido identificados por los rBG. En el análisis comparativo entre las pacientes que cumplen o no los criterios de Bethesda se encontró asociación con la expresión de proteínas por IHQ, ni el status IMS, ni La sospecha de SL o la presencia de mutación (Tabla 19).



**TABLA 19.** Síndrome de Lynch en relación a los criterios de Bethesda.

Variable	rBG Cumple		rBG No cumple		OR (95% CI)	p
	N	%	N	%		
<b>IHQ</b>						
Pérdida de expresión	22	52.38	14	31.82	2.35 (0.98-5.67)	0.053
Expresión Normal	20	47.62	30	68.18		
<b>Vía Reparadora</b>						
IMS	16	38.10	16	36.36	1.08 (0.45-2.58)	0.868
MSS	26	61.90	28	63.64		
<b>Sospecha de Síndrome de Lynch</b>						
Presente	14	33.33	9	20.45	1.94 (0.73-5.14)	0.177
Ausente	28	66.67	35	79.55		
<b>Mutación</b>						
Presente	6	50	2	28.57	2.00 (0.26-5.38)	0.502
Ausente	6	50	5	71.43		

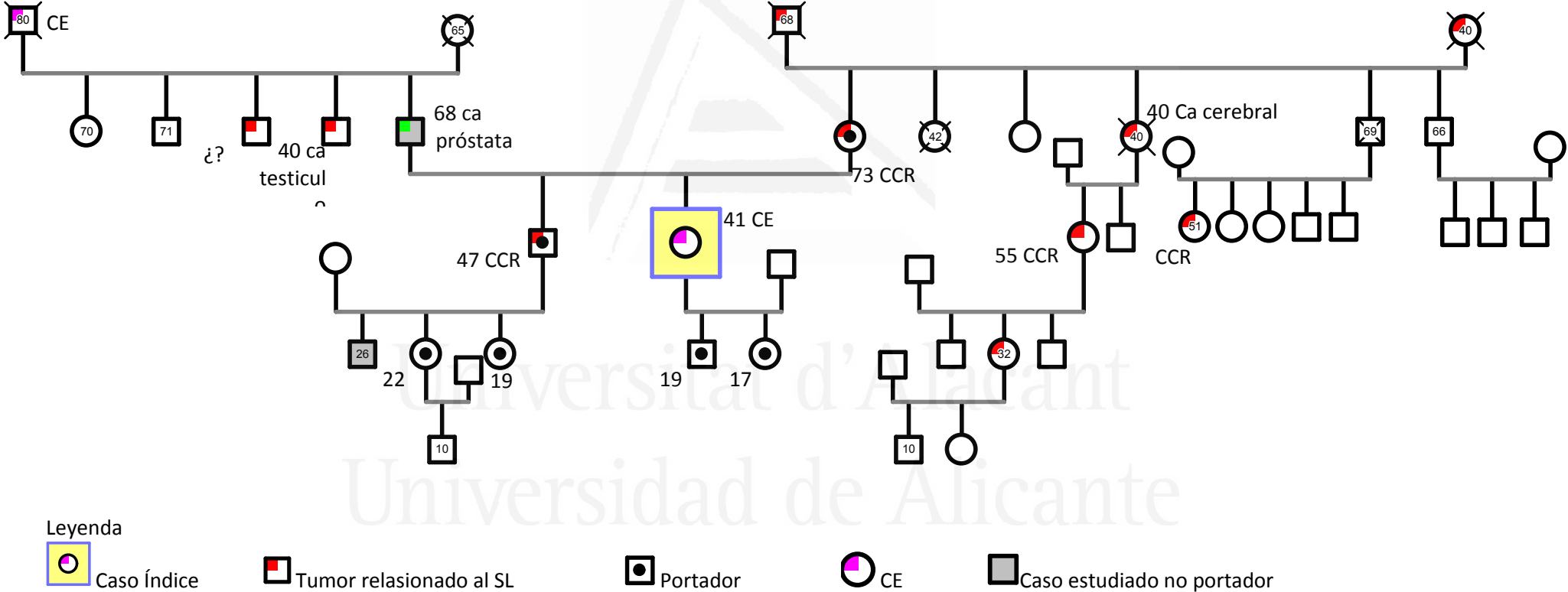
## 6.7 ESTUDIO FAMILIAR

Las 27 pacientes en las que sospechamos SL y eran candidatas para pruebas genéticas fueron remitidas a la UCGC.

En el caso de las pacientes con mutación, del asesoramiento genético encontramos que dos pacientes con mutación pertenecían a la misma familia, un caso se perdió en el seguimiento, por lo que se estudiaron 6 familias. En ellas se identificaron a 25 individuos en quienes se realizó estudios directos según la mutación del caso índice, 11 varones y 14 mujeres con una edad promedio de 40.32 años. 68% (17/25) resultaron portadores con una edad promedio de 39.64 años, en cuatro de ellos encontramos una neoplasia asociada al SL, se identificó un familiar con una mutación en homocigosis.

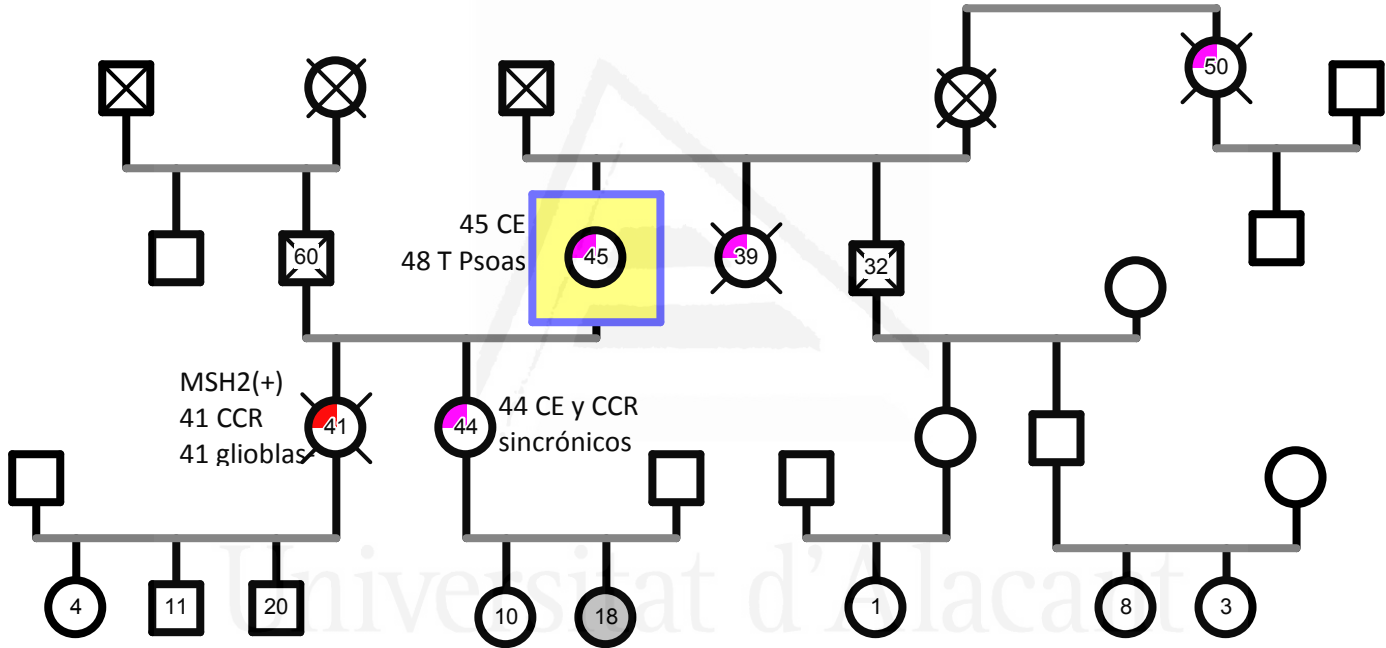


**FIGURA 30.** Pedigree familiar para una mujer de 41 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MLH1* (Caso # End 131). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.





**FIGURA 31.** Pedigree familiar para una mujer de 44 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MSH2* (Caso # End 111). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch. Presenta CE.

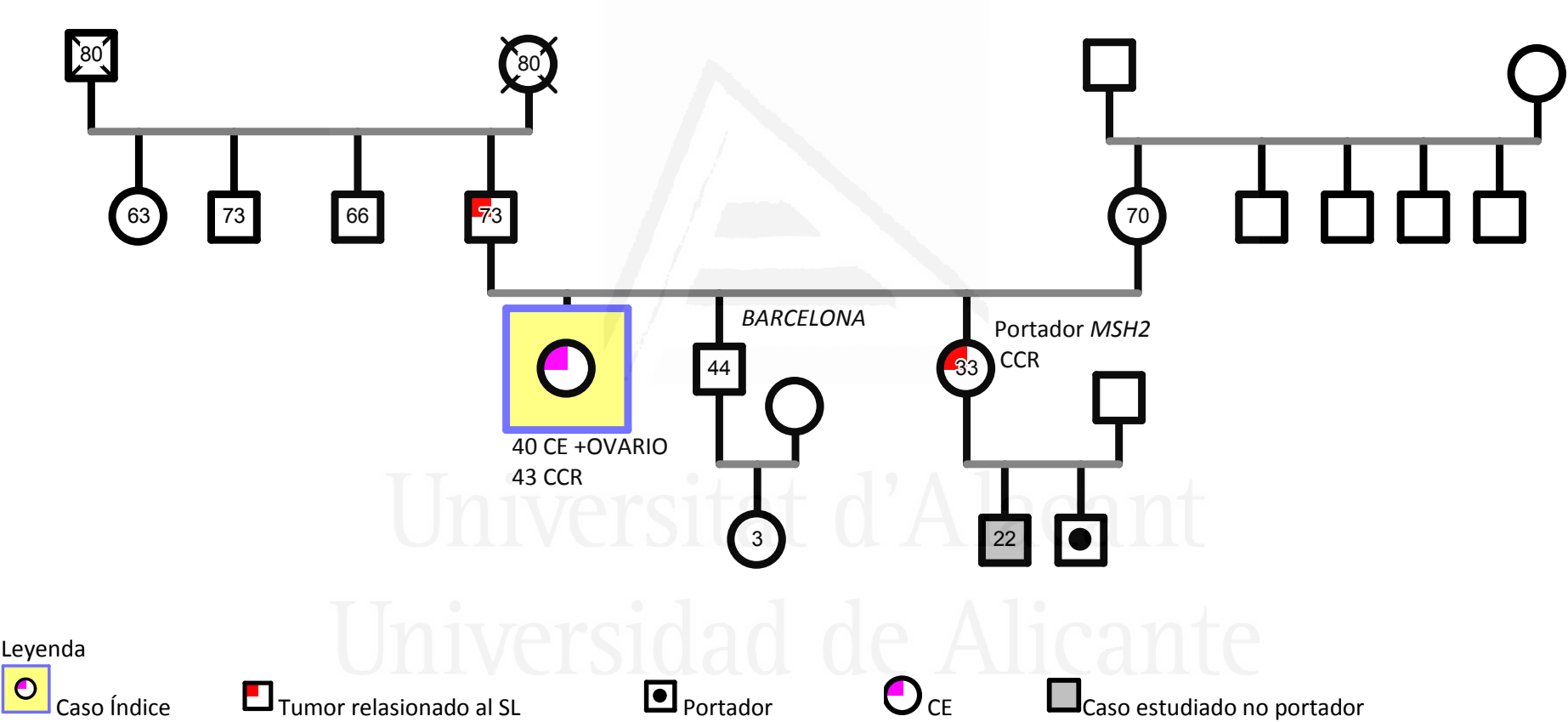


Leyenda

- Caso Índice
- Tumor relacionado al SL
- Portador
- CE
- Caso estudiado no portador



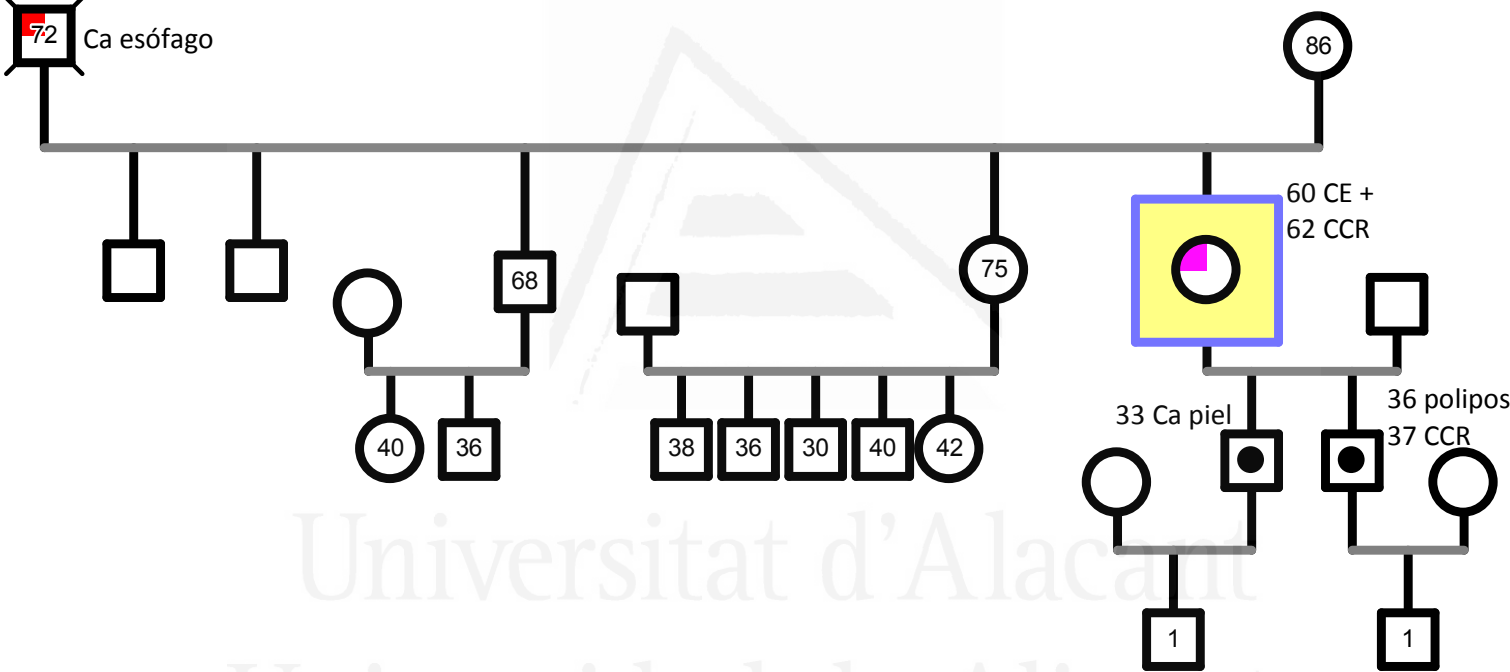
**FIGURA 32.** Pedigree familiar para una mujer de 40 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MHS2* (Caso # End 91). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch. Los estudios realizados en la familia no se realizaron en nuestra UCGC.







**FIGURA 33.** Pedigree familiar para una mujer de 44 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MHS2* (Caso # End 03). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.

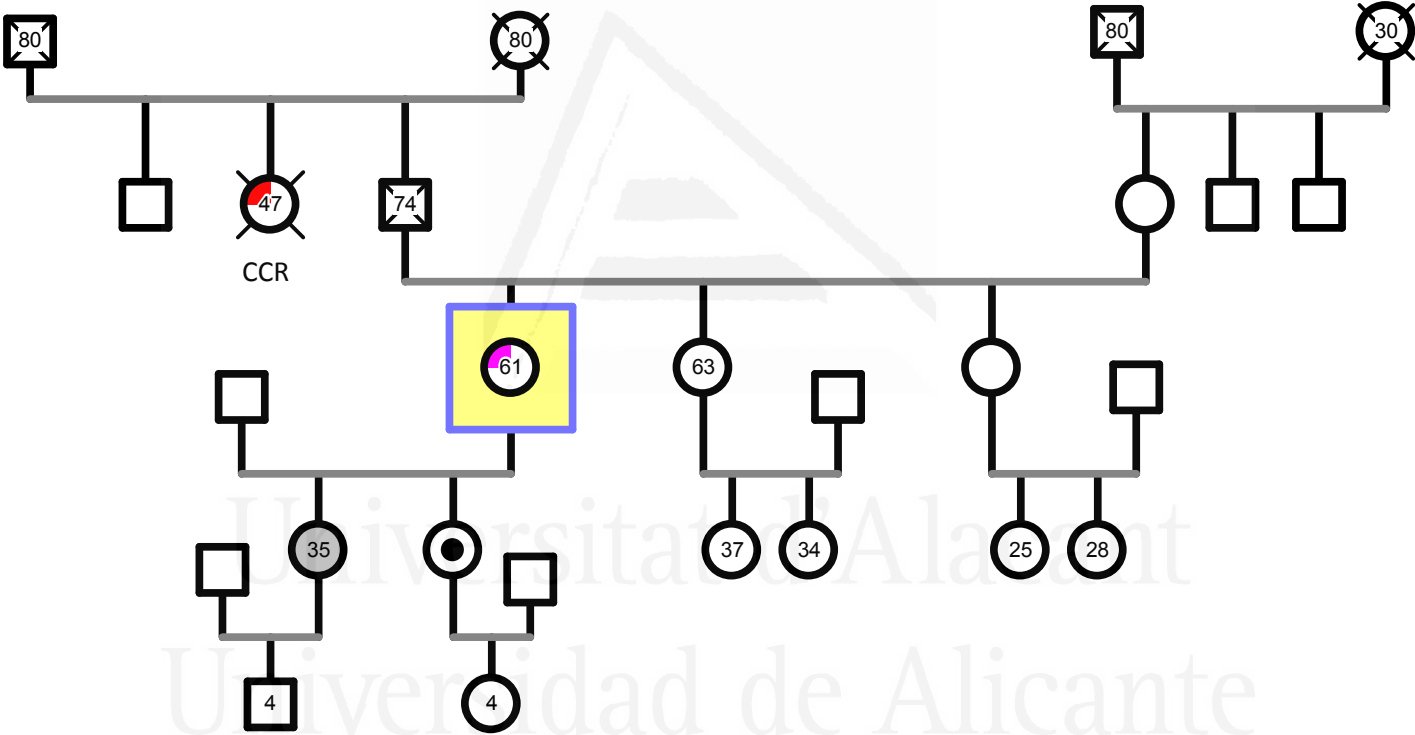


Leyenda

-  Caso Índice
-  Tumor relacionado al SL
-  Portador
-  CE
-  Caso estudiado no portador



**FIGURA 34.** Pedigree familiar para una mujer de 61 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MHS6* (Caso # End 14). Este paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.



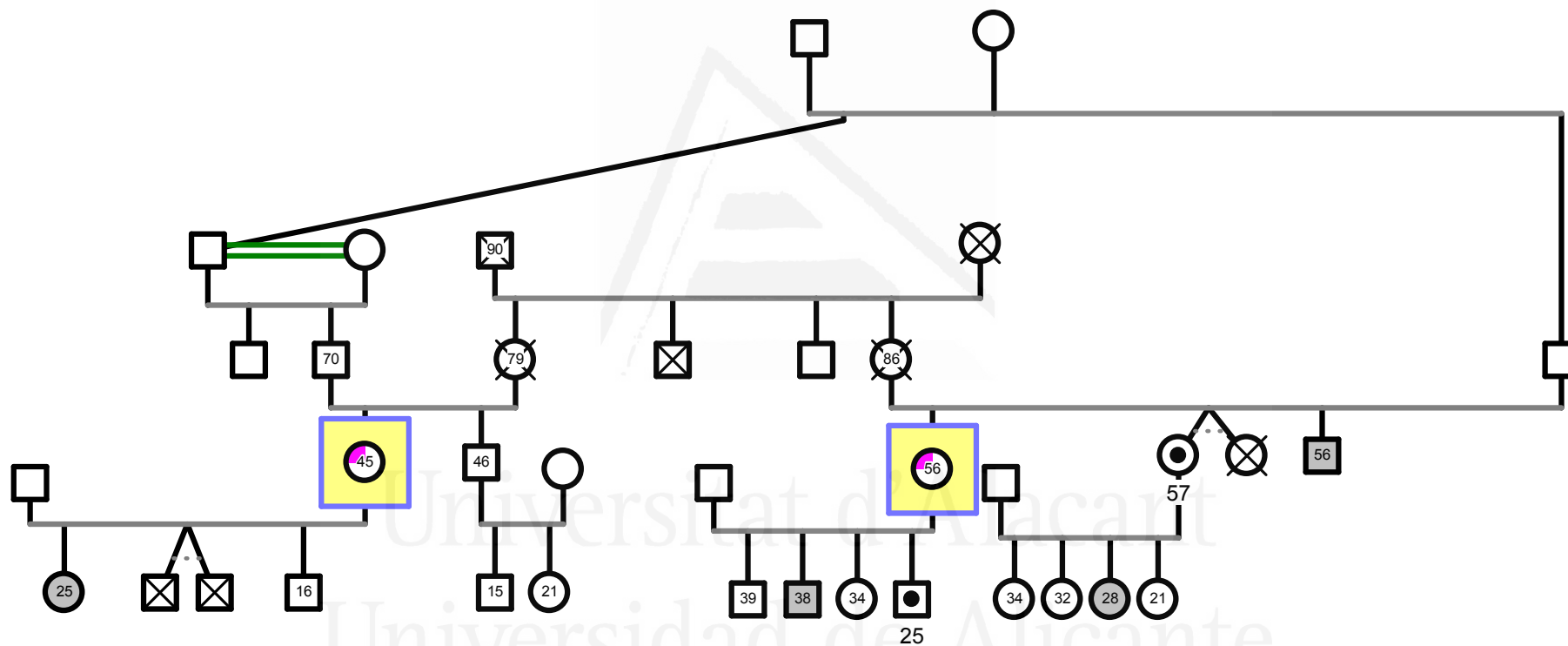
Leyenda

- Caso Índice
- ◻ Tumor relacionado al SL
- ◻ Portador
- CE
- ◻ Caso estudiado no portador



**FIGURA 35.** Pedigree familiar para una mujer de 60 años de edad con una mutación en la línea germinal en *MSH6* (Caso # End 88 Y 137).

Esta paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.

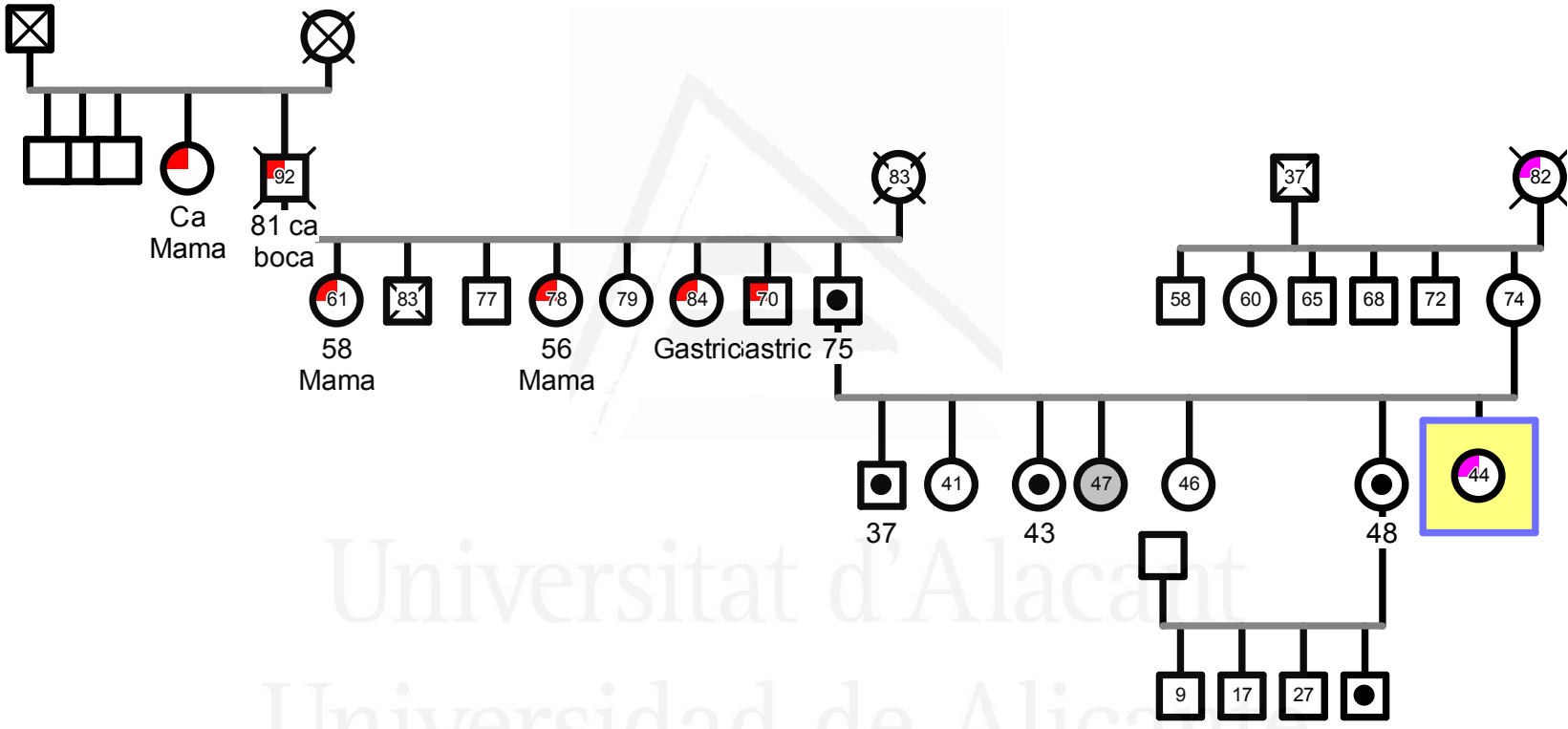


Leyenda

- Caso Índice
- Tumor relacionado al SL
- Portador
- CE
- Caso estudiado no portador.



**FIGURA 36.** Pedigree familiar para un mujer de 60 años de edad con una mutación en la línea germinal en PMS2 (Caso # End 34). Esta paciente cumplió con los rBG para la detección de Lynch.



Leyenda

-  Caso índice
-  Tumor relacionado al SL
-  Portador
-  CE
-  Caso estudiado no portador







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**DISCUSIÓN**

---



## 7 DISCUSIÓN

El cáncer de endometrio es una neoplasia ginecológica común en España, representando alrededor del 6% de todas las neoplasias malignas en mujeres. Una pequeña parte de estas neoplasias pueden tener un componente hereditario.

Gruber y Thompson<sup>91</sup> describieron en un estudio caso control de base poblacional que aproximadamente un 5% de los CE incidentes podrían atribuirse al antecedente familiar de CE, y que los casos tuvieron más probabilidad de tener antecedentes familiares de CCR, relacionando este antecedente con un 2% de los casos. Esta pequeña proporción podría ser el resultado de una condición de riesgo genético.

El SL es el síndrome principal que participa en estos casos<sup>3,108</sup>, aunque se ha sugerido la existencia de una entidad familiar genética específica separada de SL<sup>214</sup>. Los datos actuales sobre la prevalencia de SL entre los pacientes con CE son limitados y restringidos a las poblaciones de los Estados Unidos<sup>12,117,215</sup>.

Las diferencias de prevalencia de enfermedades genéticas se observan con frecuencia entre diferentes poblaciones, especialmente en síndromes donde la penetrancia es incompleta, en los que otros factores genéticos y ambientales pueden actuar como modificadores de penetrancia.

Nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de SL entre los pacientes con CE en nuestra población española, con el fin de obtener información para planificación de estrategias de cribado e identificación de individuos con predisposiciones genéticas a otros tumores y en consecuencia, identificar a los

familiares en riesgo y establecer recomendaciones personalizadas de seguimiento.

La prevalencia de SL que encontramos entre los pacientes con CE fue de 4.6% (8/173); con una frecuencia estimada del 6.6% para la población española. Esta estimación se realizó extrapolando la frecuencia encontrada de casos mutados y considerando la posible ausencia de casos perdidos. Es importante destacar que el presente trabajo es un estudio de prevalencia realizado en un hospital único de España, por lo que la extrapolación de datos a toda la población española puede estar sesgada. A este aspecto, la información disponible en población española sobre cáncer de endometrio y SL se reduce a dos trabajos. En el primero de ellos, el de Elena Aguirre en su tesis (2016)<sup>216</sup> se estudia una población de 76 mujeres con CE menores de 60 años, y encuentra una frecuencia de SL de 18.4% (14/76). En la misma línea Rubio *et al* 2016<sup>217</sup> estudia a una población seleccionada mixta de mujeres españolas con CE menores de 50 años sin factores de riesgo y mujeres con factores de riesgo para Lynch de cualquier edad y encuentra una frecuencia de SL de 13.59% (14/103). Aunque estos estudios sugieren a la edad como punto de corte para el cribado universal no nos permite establecer la prevalencia del síndrome en la población española.

Estudios previos de las poblaciones de América del Norte mostraron tasas de prevalencia que van desde 1.8% a 4.5%<sup>12,117,215</sup>. En nuestra población, se encontró que la prevalencia de SL entre los pacientes con CE fue seis veces más alta que la prevalencia de SL entre los pacientes con CCR (4.6% vs 0.7%)<sup>196</sup>.

Se realizó un estudio de prevalencia empleando las recomendaciones establecidas y algoritmos de consenso para la detección y mutación de análisis<sup>14</sup>. Para maximizar nuestra sensibilidad de detección de mutaciones, no se consideró límite de edad en el momento del diagnóstico. Los análisis de IHQ y de IMS se realizaron para todos los tumores. La metilación de *MLH1* se estudió en tumores y también en sangre cuando se requirió, y se realizó un análisis mutacional para los cuatro genes comunes MMR y *EPCAM*.

Nuestro rastreo con IHQ e IMS detectó un 35.3% (61/173) de tumores con deficiencia de MMR, proporción que fue superior a los 22.8% (124/543) y 25.3% (62/245) encontrados por Hampel *et al*, 2006<sup>12</sup> y Moline *et al*, 2013<sup>215</sup>, respectivamente.

Encontramos una expresión IHQ normal de proteínas MMR junto con IMS en 3/61 casos (4.9%). Resultados similares fueron obtenidos por Hampel *et al*. 2006 (6.3%, 6/96)<sup>12</sup>. Además, se encontró que aproximadamente el 23% (14/61) de los tumores tenía pérdida de expresión de una proteína del sistema MMR e IMS. El porcentaje esperado de pérdida de expresión y de IMS en el estudio de Hampel *et al*, 2006<sup>12</sup> sería de alrededor del 15%.

Nuestros datos muestran que en pacientes con CE, hasta el 27.9% de los casos con deficiencia de MMR podrían tener resultados normales de IHQ o de IMS, lo cual refuerza la necesidad de implementar el cribado con ambas técnicas.

En el análisis comparativo de casos deficientes de proteínas del sistema MMR frente a los casos con expresión proteica de nuestra serie, mostró una asociación significativa con LVI y TILs, como se ha descrito

previamente<sup>107,218,219</sup> (Tabla 17). Sin embargo concluimos de manera similar a otros<sup>107,220,221</sup>, que las características histomorfológicas no son lo suficientemente confiables para diagnosticar CE asociada a SL o para servir como un triage independiente para pruebas adicionales.

Tampoco se encontró asociación entre la edad en el diagnóstico y los criterios rBG o AmII. Estos resultados podrían explicarse por la frecuente aparición de tumores endometriales con deficiencia en el sistema MMR de tipo esporádico, como consecuencia de alteraciones somáticas de tipo genético o epigenético<sup>12</sup>.

La desregulación de la metilación como consecuencia del envejecimiento puede afectar de forma especial al útero, hipermetilando y silenciando un buen número de genes, entre ellos *MLH1*. La metilación *MLH1* y los análisis de mutaciones en *BRAF* permiten identificar formas esporádicas de CCR entre los tumores deficientes en MMR. En nuestra serie no se encontró ningún caso con mutación en *BRAF*, por lo tanto, parece ser que este gen no tiene un papel importante en la CE y no debe ser incluido en el algoritmo de cribado<sup>215</sup>.

Por el contrario, la metilación del promotor *MLH1* estaba presente en la mayoría de los tumores junto con la pérdida de expresión de *MLH1* (77.3%, 34/44). Esta proporción fue significativamente menor que el 94% (79/84) encontrado por Hampel *et al*, 2006<sup>12</sup>. Las características diferentes entre las dos cohortes y las diferentes metodologías para el análisis de metilación (MS-MLPA vs MS-PCR) podrían haber contribuido a esta aparente discordancia.

Hay que resaltar que en nuestro estudio la media de edad entre los pacientes, con tumores metilados tienen mayor edad en promedio que los no metilados, aunque no encontramos significancia estadísticamente, se espera que la

metilación sea más frecuente a mayor edad, ésta diferencia puede deberse al tamaño muestral, o a las diferencias en las técnicas de detección. Sin embargo el tejido endometrial tiene una alta tasa de recambio celular lo que podría aumentar la exposición del ADN a la metilación.

Las epimutaciones constitucionales del gen *MLH1* en casos de CE son muy raras<sup>58</sup>. Ninguno de los nueve casos analizados con metilación tumoral tuvo metilación de *MLH1* en el ADN de la sangre, por lo tanto, es poco probable que un tumor con metilación de *MLH1* esté asociado a SL. Por el contrario, un tumor que muestra la pérdida de *MLH1* y *PMS2* por IHQ, sin evidencia de metilación, es probable que se asocie con SL<sup>1</sup>.

Después del cribado inicial, se seleccionaron 27 pacientes (15.6%) sospechosos de SL. La edad media en este grupo fue de 57.7 años y los pacientes menores de 50 años fueron más frecuentes que en el grupo de CE sin sospecha de SL (Tabla 14). No se ha encontrado ninguna otra característica patológica o clínica asociada con casos sospechosos de SL. En la actualidad, aún hay intentos de identificar factores patológicos en SL asociado a CE, algunos autores han identificado la localización del tumor, informando una prevalencia significativamente mayor de los tumores del segmento uterino inferior en pacientes con SL<sup>123,222</sup>. Westin *et al.* 2008 concluyeron que la detección de SL debería considerarse en casos con CE que se originan del segmento uterino inferior<sup>123</sup>. Esta ubicación puede ser una fuente de confusión diagnóstica, ya que puede albergar tanto a carcinomas endometriales como endocervicales, lo que resultaría en una mala clasificación del tumor<sup>223</sup>.



Se encontraron mutaciones en ocho pacientes (42,1%) con una edad media de 49 años. *MSH6* y *MSH2* estuvieron mutados en seis casos (Tabla 17 y 18). Dos casos con mutaciones *MSH6* (edades 56 y 61 años) no cumplieron con los criterios de rBG. Por lo tanto, alrededor del 25% de los pacientes con CE asociado con SL podrían simular a un tumor esporádico y no ser diagnosticados cuando se utilizan los criterios de rBG para probar una sospecha de SL.

Por otro lado varios estudios sugieren que las mutaciones en *MSH6* son más comunes en pacientes con tumores estables (MSS) o inestabilidad baja<sup>124,116,215,224</sup>, en la misma línea, en nuestro estudio encontramos que de los siete casos con SL confirmado uno resultó estable y presentó mutación en *MSH6*.

En nuestro estudio, las mutaciones se encontraron más frecuentemente en pacientes con CE diagnosticados antes de los 50 años de edad y no se encontró asociación con los criterios de rBG, IHQ o IMS, histopatología y la presencia de tumores sincrónicos. Sin embargo, es posible que el tamaño limitado de la muestra pudiera ocultar cualquier otra asociación.

La estrategia de estudio y los métodos de análisis para la detección de mutaciones germinales responsables del alto riesgo a CE y otros tienen una alta sensibilidad pero no absoluta. La posibilidad de falsos negativos, o casos realmente hereditarios en los que no se ha encontrado mutación causal puede deberse en primer lugar a la presencia de mutaciones en las regiones reguladoras que están fuera del alcance de los estudios realizados en este trabajo; segundo, el mosaicismo genético; en tercer lugar, las mutaciones de la

línea germinal en otros genes implicados directa o indirectamente con la función MMR, como *SETD2*<sup>225</sup>, *POLE* y *POLD1*<sup>226</sup>; en cuarto lugar la presencia de otros mecanismos desconocidos, genéticos o epigenéticos (metilación, acetilación de histonas, miRNAs etc) que pueden estar inactivando la funcionalidad MMR y finalmente una deficiencia de MMR causada por la inactivación bialélica, que puede ser puramente somática o ser consecuencia secundaria de alteraciones hereditarias en otros genes.

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS) ha revolucionado la genómica de la CE al permitir avances importantes en el perfil molecular de los tumores sólidos. A través de una secuenciación masiva, se han descubierto alteraciones genómicas no reconocidas en enfermedades malignas, incluyendo cánceres ginecológicos, ampliando así el repertorio potencial para el uso de terapias dirigidas. NGS ha ampliado la comprensión de la base genómica de las neoplasias y ha permitido la identificación en línea germinal de mutaciones somáticas asociadas al desarrollo del cáncer, y que podrían servir como biomarcadores potenciales para el pronóstico y desarrollo de fármacos, y determinar los mecanismos de resistencia al tratamiento.<sup>227,228</sup> En consecuencia, los algoritmos diagnósticos están comenzando una fase de adaptación, redefinición reclasificación de los tumores que van a permitir, una mayor eficiencia en la predicción de riesgo genético y las medidas de prevención personalizada en base a dichos riesgo.

Muchas instituciones y administraciones sanitarias están considerando implementar el cribado para pacientes con SL entre pacientes con CE<sup>229,230</sup>. Diferentes estrategias de cribado para las mujeres con CE han demostrado ser costo-efectivas<sup>230,231,219</sup>. El triaje por IHQ de todos los casos de CE puede

identificar la mayoría de los portadores de mutación, pero a un costo considerable. La inclusión de al menos un pariente de primer grado con un cáncer relacionado a SL asociado a cualquier edad podría resultar costo-efectivo<sup>230,219</sup>. Sin embargo, es importante resaltar que múltiples factores locales pueden interferir en la eficiencia de cualquier proceso. Se están llevando a cabo nuevos enfoques para hacer que el cribado universal de pacientes con CE por IHQ sea más costo efectivo. Algunos datos sugieren que un panel de dos anticuerpos de prueba de PMS2 y MSH6 es tan eficaz como el panel de cuatro anticuerpos para la detección de anomalías MMR<sup>218,232</sup>.

Existe evidencia de que el estudio de las proteínas y genes del sistema MMR por IMS e IHQ son técnicas de buena sensibilidad y especificidad para identificar a pacientes con SL. En algunos estudios de mujeres con CE encontraron una concordancia de 97% a 100% entre ambas técnicas<sup>233,234</sup>. En contraste, nosotros encontramos una concordancia menos fuerte, (90,2%), esto podría estar en relación a que la conservación del tejido tumoral endometrial es técnicamente más difícil por ser un tejido friable, y de rápida descomposición, respecto al CCR, además se ha estudiado en muestras de un archivo de anatomía patológica con más de 5 años en parafina, que podría afectar la conservación del ADN, haciéndolas menos efectiva.

Observamos que para aumentar la sensibilidad en diagnóstico de SL, un análisis de IMS combinado con IHQ debe ser considerado ya que alrededor del 5% (3/61) de los pacientes con sospecha de SL y un octavo de casos confirmados de SL en nuestro estudio tenía IMS con IHQ intacto.

En relación al estudio de familiares de los casos confirmados con SL hay que resaltar que el estudio se realizó en los tumores rescatados del archivo de Anatomía Patológica, y que ante la sospecha de SL o su confirmación las pacientes tuvieron acceso a la UCGC *de novo*, es decir, que de otro modo no habrían sido identificadas, situación que debe valorarse a la hora de considerar el despistaje universal.

Del asesoramiento genético encontramos que el 68% (17/25) resultaron portadores de una mutación que se estudió en todos los familiares de primer grado mayores de edad que se benefician de un seguimiento que permita la detección precoz de una neoplasia asociada al SL.

Reconocemos dos limitaciones a nuestro estudio. La primera es que los casos con expresión conservada de las proteínas MMR por IHQ no se someten a pruebas de la línea germinal o pruebas de inestabilidad de microsatélites. Por lo tanto, sólo podemos hablar de la especificidad esperada de la selección universal de SL, pero no podemos comentar sobre la sensibilidad general. En segundo lugar, ocho de nuestras pacientes que resultaron con pérdida de expresión en la IHQ y/o IMS no tuvieron seguimiento de la prueba de la línea germinal. Sin embargo, nuestra institución en realidad tenía la mayor tasa de seguimiento de la línea germinal de pruebas al momento del estudio en España y anterior a la mayoría de los estudios publicados sobre universal de cribado (Tabla 20).

Hay que mencionar, que es difícil obtener conclusiones sobre la rentabilidad y la utilidad general del cribado universal basado en estudios con datos incompletos. Además, en nuestra experiencia los estudios de la línea germinal

en sí misma no está estandarizada, y algunos pacientes reciben una selección limitada (por ejemplo, sólo se están probando mutaciones en 1 ó 2 genes MMR, o se establece diferentes edades de corte limitante al cribado universal).

Es esencial que los médicos sean conscientes de la participación de tumores ginecológicos en SL y el riesgo de nuevas neoplasias malignas en mujeres con CE. La identificación de SL podría conducir a una reducción de la morbilidad y la mortalidad por cáncer de colon en ellos y sus familiares a través de la aplicación de la vigilancia del CCR. Por lo tanto, es crucial desarrollar e implementar estrategias que permitan el reconocimiento de SL entre los pacientes con CE

No obstante, estamos asistiendo a una rápida evolución de los conocimientos en el ámbito de la Medicina de Precisión que permiten ofrecer a los pacientes una mejora asistencial a nivel global. La adaptación en el ámbito clínico a todo este nuevo conocimiento debería abordarse dentro de un plan estratégico a nivel europeo y nacional. La búsqueda de una mayor precisión en la predicción de riesgo genético y los diagnósticos de las patologías en base a marcadores moleculares son las claves para una personalización más eficaz de la Medicina.

**TABLA 20.** Resumen de los estudios de detección universales del Síndrome de Lynch en el Cáncer Endometrial.

Referencia	Nº de Casos	Tipo de cribado	% MMR-d No metilado [n/N (%)]	% con estudio en línea germinal	% SL Confirmado	Resumen	Recomendaciones
Egoavil <i>et al</i> (2013) <sup>211</sup>	173	Universal: IHC, IMS, <i>MLH1</i> -PM	27/173 (15.6)	70.4	4.6	1 de 8 casos confirmados de SL mostró IMS sin deficiencia en IHQ, cribado universal modalidad dual; 25% de casos confirmados de SL no cumplían rBG	Universal IHC y IMS
Moline <i>et al</i> , (2013) <sup>215</sup>	245	Selección inicial basado en la edad, Historia clínica de sospecha, morfología de SL; eventual universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM, IMS	42/245 (17.1)	66.7	4.5	Dos pacientes con CE- SL se perdieron con el protocolo de selección. 7 pacientes con CE- SL tuvieron >50 al tiempo de diagnóstico	Universal
Buchanan <i>et al</i> ,(2014) <sup>159</sup>	702	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	63/702 (8.9)	92.9	3.1	VPP del cribado universal = 13% VPP del cribado CE a <60 años = 46%	Cribado Universal a <60 edad
Mills <i>et al</i> , (2014) <sup>220</sup>	605	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	40/605 (6.6)	52.5	2.8	41% de CE- SL no se asocia con <50, rBG, o morfología de SL	Universal
Rabban <i>et al</i> , (2014) <sup>219</sup>	273	Universal <50 y: IHQ, IMS si el tumor muestra déficit en alguna proteína MMR IHQ, <i>MLH1</i> -PM, morfología de SL	—	63.6	0.4*	morfología de SL y/o rBG 100% sensible para <i>MSH2/PMS2</i> anormales; 80% sensible para <i>MSH6</i> anormal	Universal, <i>MSH6</i> y <i>MLH1/MSH2/PMS2</i> para < 50 años, cáncer pedigree,y/o morfología de SL
Ferguson <i>et al</i> , (2014) <sup>221</sup>	118	Universal: IHQ, IMS, morfología de SL	20/118 (16.9)	80	5.9	IHQ en mujeres < 60 tiene sensibilidad de 100%, especificidad de 86.1%, VPP de 58.3%, y a VPN de 100%. Historia familiar con morfología de SL tiene sensibilidad de 71.4%. Sólo morfología Tumoral tiene pobre performance con especificidad del 42.1%.	Universal a <60 edad
Batte <i>et al</i> , (2014) <sup>235</sup>	614	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	63/614 (10.2)	50.8	1.6	El estudio fue diseñado inicialmente para determinar las barreras en el asesoramiento genético; falta de cobertura del asegurado fue la razón más común para declinar el test.	La expectativa del seguimiento genético y el bajo VPP del cribado universal deben tomarse en cuenta antes de implementar protocolos universales

Frolova <i>et al</i> , (2015) <sup>221</sup>	Cohorte 1: 395 Cohorte 2: 242	Cohorte 1: Selección basada en IHQ, SL morfología, historia personal/familiar/ cáncer, edad, <i>MLH1</i> -PM. Cohorte 2: Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	42/637 (6.6)	61.9	1.4	Una paciente con CE-SL se perdió en la cohort 1(seleccionada). La cohorte 2 (Universal) presentó mayor tasa de aceptación del análisis en línea germinal.	Universal
Goodfellow <i>et al</i> , (2015) <sup>236</sup>	1002	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM, IMS	107/1002 (10.7)	43.9	1.9	24% de CE- SLs ocurrieron en mujeres >60. Un CE- SL fue IMS-alto sin MMR-d	Universal IHQ y IMS
Mas-Moya <i>et al</i> , (2015) <sup>237</sup>	215	Universal: IHQ y <i>MLH1</i> -PM	37/215 (17.2)	45.9	5.1	No diferencias morfológicas en los casos con SL y S LL	—
Mills <i>et al</i> , (2016) <sup>238</sup>	210	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	26/210 (12.3)	57.7	3.3	Más del 57.1% de SL confirmados podrían perderse si se selecciona por edad e historia de cáncer.	Universal
Aguirre E. (2016) <sup>216</sup>	73	Universal <60 años.	26/76 (34.2)	100	18.4	El 28% SL confirmados podrían perderse si se selecciona sólo con los criterios clásicos clínicos de cribado. La combinación IHQ e <i>MLH1</i> -PM tiene sensibilidad del 100%, especificidad del 80,6% y VPP de 53,8%.	Universal a < 60 años
Rubio <i>et al</i> , (2016) <sup>217</sup>	103	Cohorte 1: Selección basada en, historia personal/familiar/ cáncer. Cohorte 2: Universal: <50 años	—	Todos los pacientes	13.6	41.66% (5/12) de SL confirmados tenían MSI y 76.92%(10/13) MMR-d. Una paciente con CE-SL presentó MSS y sin MMR-d, Una paciente con <i>MSH6</i> mutado presentó MSS con MMR-d	Universal a <50 años y/o historia familiar. <i>MLH1</i> y <i>MSH2</i> : iniciar con IHQ. <i>MSH6</i> (mutaciones no se correlacionan con IHQ ni IMS) debe analizarse independientemente del status IHQ e IMS
Watkins <i>et al</i> , 2017 <sup>229</sup>	242	Universal: IHQ, <i>MLH1</i> -PM	11/242 (4.5)	90.1	1.7	25% de SL confirmados no reúnen los criterios tradicionales de cribado y más del 42.8% de casos con SL podrían perderse usando las guías tradicionales de cribado	Universal MMR, estudio de <i>PM2</i> , y <i>MSH6</i> sólo si es aceptable

\* El porcentaje informado se basa en una cohorte de mujeres > 50 años de edad. IHQ, inmunohistoquímica; SL, síndrome de Lynch; *MLH1*-PM, metilación del promotor *MLH1*; MMR, proteínas de reparación; IMS, inestabilidad de microsatélites; MMR-d, MMR defectuoso; VPP, valor predictivo positivo; VPP, valor predictivo positivo. CE- SL cáncer endometrial asociado al SL.

Adaptado de Watkins *et al*, 2017<sup>229</sup>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**CONCLUSIONES**

---





## 8 CONCLUSIONES

- En nuestro estudio encontramos una prevalencia de (4.6-6.6%).de Síndrome de Lynch entre los pacientes con Cáncer de endometrio en una población no seleccionada mayor a la descrita entre los pacientes con CCR.
- En nuestro estudio encontramos asociación de la edad en el momento de diagnóstico con el Síndrome de Lynch, en pacientes con Cáncer de endometrio en una población no seleccionada
- Sobre la base de este estudio, no existen criterios clínicos ni histopatológicos que garanticen la detección de todos los CE asociados con las mutaciones de la línea germinal.
- En la actualidad, es razonable un enfoque con un esquema universal de cribado dual basado en IHQ e IMS.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ANEXOS**

---

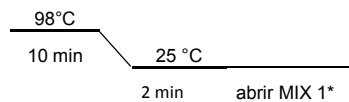


## 9 ANEXOS

**ANEXO 1.** Protocolo empleado para detectar Metilación. (MS-MLPA©DNA Methylation ME011-A1 MMR o ME011-B1)

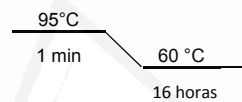
### DIA 1

- 1) **Desnaturalización** (termociclador)  
Preparar DNA 50-200 ng en 5 uL



\*añadir 3 uL del Mix 1 a cada tubo

- 1) **Hibridación** (termociclador)  
Incubar al menos 16 horas y no más de 20



### DIA 2

- 2) **Ligación Digestión**

Muestras a Temperatura de ambiente

Preparar los siguientes 3 mix, según protocolo del fabricante, al mismo tiempo.

Añadir 13 uL de MIX 2 (contiene ligasa 65+BufferA) a cada muestra a temperatura ambiente.

Dividir y transferir 10uL a sendos tubos secundarios .

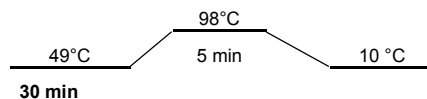
Poner termociclador a 49 °C

Incubar todos los tubos en 49 °C por 1 min

A 49 °C añadir 10uL MIX 3(contiene ligasa 65+BufferB+ Enz Ligas 65) a tubos primarios

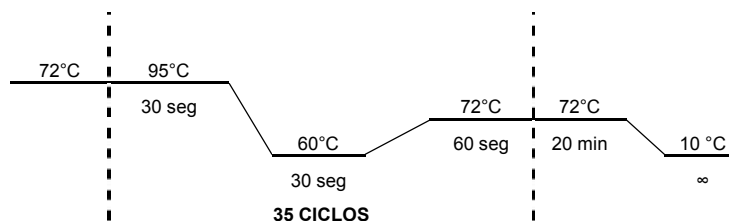
A 49 °C añadir 10uL MIX 4(contiene ligasa 65+BufferB+ Enz Ligas 65+Hha1) a tubos secundarios

Incubar Termociclador : Ligación



- 3) **PCR**

Preparar MIX 5 y MIX 6 juntos en hielo, según protocolo del fabricante







## INFORME DE DISPONIBILIDAD DE MUESTRAS

### BIOBANCO HGUA

**REFERENCIA SOLICITUD:** S10-001

**FECHA SOLICITUD:** 20 de enero de 2010

**TÍTULO DEL PROYECTO:** "IDENTIFICACIÓN DEL SÍNDROME DE LYNCH EN PACIENTES CON CARCINOMA DE ENDOMETRIO EN POBLACIÓN NO SELECCIONADA"

#### **DATOS DE LAS MUESTRAS QUE SE SOLICITAN**

200 carcinomas de endometrio intervenidos en el Hospital General Universitario de Alicante en el período comprendido entre 1 de enero de 2004 y el 31 de diciembre de 2009. Material que se solicita de las muestras:

- 1 µg de ADN procedente de bloque de parafina representativo de tumor obtenido mediante tissuearrayer.
- 4 cortes de 2 µm del bloque de parafina tumoral sobre porta de inmunohistoquímica sin teñir de las mismas muestras

#### **COSTE ASOCIADO A LA GESTIÓN DE LAS MUESTRAS POR EL BIOBANCO**

<b>S10-001</b>			
<b>CÁLCULO PRESUPUESTO</b>	<b>NÚMERO</b>	<b>TIPO MUESTRA</b>	<b>COSTE</b>
Total muestras solicitadas	<b>200</b>		
Tipo muestra	1	µg ADN tumoral	200,00 €
Tipo muestra	4	CORTES PARA IHQ	400,00 €
Gastos envío			- €
<b>COSTE TOTAL</b>			<b>800,00 €</b>

#### **DISPONIBILIDAD DE LAS MUESTRAS**

Las muestras que se solicitan para la realización del proyecto corresponden al excedente de tejido utilizado para diagnóstico. Los bloques de parafina de los que se van a obtener estas muestras están almacenados en el archivo de bloques del Servicio de Patología. Para la realización del presente proyecto existe material excedente de las muestras solicitadas.

#### **REQUISITOS PARA LA CESIÓN DE LAS MUESTRAS**

El Biobanco del HGUA se compromete a ceder estas muestras siempre y cuando se cumplan los siguientes requisitos:

1. Disponibilidad del Consentimiento Informado en muestras posteriores a la publicación de la ley de Investigación Biomédica (2007)
2. Informe del Comité de Ética eximiendo la obtención del CI en casos anteriores a la Ley de Investigación Biomédica.

RED VALENCIANA DE BIOBANCOS  
 BIOBANCO HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE  
 Servicio de Patología  
 C/ Maestro Alonso, 109  
 03010, Alicante  
 España





## INFORME DE DISPONIBILIDAD DE MUESTRAS

### BIOBANCO HGUA


3. Aprobación del proyecto por el Comité de Ética.
4. Aprobación del proyecto por el Comité Científico.
5. Financiación específica para asumir los costes de cesión de material por el Biobanco del HGUA.

#### **COMPROMISOS DEL INVESTIGADOR SOLICITANTE**

En caso de ser finalmente cedidas las muestras, el investigador solicitante se compromete a:

- Hacer uso del material proporcionado por la Red Valenciana de Biobancos en las condiciones de bioseguridad establecidas por la legislación vigente.
- Asegurar la trazabilidad de la muestra en caso de no haber sido anonimizada.
- Garantizar la disponibilidad de la información genética o de los resultados de la investigación que, en su caso, se obtenga del análisis de las muestras.
- No ceder muestras a otros investigadores para proyectos diferentes al mencionado en la solicitud.
- Hacer mención a la procedencia de las muestras en todos los trabajos en los que se difundan los resultados obtenidos de la investigación con las muestras procedentes de la RVB.
- Enviar en el término de 1 año una memoria de la investigación realizada así como una copia de los artículos científicos publicados que se deriven de la investigación de las muestra.
- Destruir o devolver al biobanco el material sobrante una vez finalizado el proyecto.

Alicante, 22 de enero de 2010

  
Fdo: Cristina Alenda González  
Directora Científica Biobanco HGUA

RED VALENCIANA DE BIOBANCOS  
BIOBANCO HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE  
Servicio de Patología  
C/ Maestro Alonso, 109  
03010, Alicante  
España



### ANEXO 3. Cebadores para la amplificación de los exones del gen *MLH1*

<b>Exon 1</b>	N-L1-X1UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-CAC-TGA-GGT-GAT-TGG-CTG-AA</u>
	C-L1-X1LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-TAG-CCC-TTA-AGT-GAG-CCC-G</u>
<b>Exon 2</b>	N-L1-X2UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TAC-ATT-AGA-GTA-GTT-GCA-GA</u>
	C-L1-X2LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CAG-AGA-AAG-GTC-CTG-ACT-C</u>
<b>Exon 3</b>	N-L1-X3UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TTG-GAA-AAT-GAG-TAA-CAT-GAT-T</u>
	C-L1-X3LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-TGT-CAT-CAC-AGG-AGG-ATA-T</u>
<b>Exon 4</b>	N-L1-X4UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-CTT-TCC-CTT-TGG-TGA-GGT-GA</u>
	C-L1-X4LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAT-TAC-TCT-GAG-ACC-GC</u>
<b>Exon 5</b>	N-L1-X5UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TCT-CTT-TTC-CCC-TTG-GGA-TTA-G</u>
	C-L1-X5LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-ACA-AAG-CTT-CAA-CAA-TTT-ACT-CT</u>
<b>Exon 6</b>	N-L1-X6UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GTT-TTA-TTT-TCA-AGT-ACT-TCT-ATG-AAT-T</u>
	C-L1-X6LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CAG-CAA-CTG-TTC-AAT-GTA-TCA-GCA-CT</u>
<b>Exon 7</b>	N-L1-X7UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GTG-TGT-GTT-TTT-GGC-AAC</u>
	C-L1-X7LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CAT-AAC-CTT-ATC-TCC-ACC</u>
<b>Exon 8</b>	N-L1-X8UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-AGC-CAT-GAG-ACA-ATA-AAT-CCT-TG</u>
	C-L1-X8LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GGT-TCC-CAA-ATA-ATG-TGA-TGG</u>
<b>Exon 9</b>	N-L1-X9UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-AAG-CTT-CAG-AAT-CTC-TTT-T</u>
	C-L1-X9LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CTG-TGG-GTG-TTT-CCT-GTG</u>
<b>Exon 10</b>	N-L1-X10UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-ACT-TTG-TGT-GAA-TGT-ACA-CCT-GTG</u>
	C-L1-X10LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAG-AGC-CTG-ATA-GAA-CAT-CT</u>
<b>Exon 11</b>	N-L1-X11UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-CTT-TTT-CTC-CCC-CTC-CCA-CTA</u>
	C-L1-X11LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-AAA-ATC-TGG-GCT-CTC-ACG</u>
<b>Exon 12</b>	N-L1-X12AU-	5' GGG-ACC-TGT-ATA-TCT-ATA-CT
	C-L1-X12ALF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GTT-TGC-TCA-GAG-GCT-GC</u>
	N-L1-X12BUF- C-L1-X12BLR-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-ACA-GAA-TAA-AGG-AGG-TAG-GC</u> 5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAT-GGT-TCG-TAC-AGA-TTC-CCG</u>
<b>Exon 13</b>	N-L1-X13UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-AAC-CCA-CAA-AAT-TTG-GCT-AAG</u>
	C-L1-X13LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CTT-TCT-CCA-TTT-CCA-AAA-CC</u>
<b>Exon 14</b>	N-L1-X14UR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-TGT-CTC-TAG-TTC-TGG-TGC</u>
	C-L1-X14LF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TGT-TGT-AGT-AGC-TCT-GCT-TG</u>
<b>Exon 15</b>	N-L1-X15UR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-ATT-TGT-CCC-AAC-TGG-TTG-TA</u>
	C-L1-X15LF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TCA-GTT-GAA-ATG-TCA-GAA-GTG</u>
<b>Exon 16</b>	N-L1-X16UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TTG-GAT-GCT-CCG-TTA-AAG-CTT-G</u>
	C-L1-X16LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CCG-GCT-GGA-AAT-TTT-ATT-TG</u>
<b>Exon 17</b>	N-L1-X17UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-AGG-CAC-TGG-AGA-AAT-GGG-ATT</u>
	C-L1-X17LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-TCC-AGC-ACA-CAT-GCA-TGT-ACC-GA</u>
<b>Exon 18</b>	N-L1-X18UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GTC-TGT-GAT-CTC-CGT-TTA-GA</u>
	C-L1-X18LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-AGG-TCC-TGT-CCT-AGT-CCT</u>
<b>Exon 19</b>	N-L1-X19UR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAC-ACC-AGT-GTA-TGT-TG</u>
	C-L1-X19LF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-CGG-AAT-ACA-GAG-AAA-GAA-GA</u>

Subrayado: cebadores universales de M13. Todos los cebadores se obtuvieron de Wahlberg SS *et al*, 2002<sup>205</sup>



#### ANEXO 4. Cebadores para la amplificación de los exones del gen *MSH2*

<b>Exon 1</b>	N-S2-X1UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-AGG</u> -CGG-GAA-ACA-GCT-TAG
	C-S2-X1L-	5' AAA-GGA-GCC-GCG-CCA-CAA
<b>Exon 2</b>	N-S2-X2U-	5' GAA-GTC-CAG-CTA-ATA-CAG-TGC
	C-S2-X2LF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -CAC-ATT-TTT-ATT-TTT-CTA-CTC-TTA-A
<b>Exon 3</b>	N-S2-X3UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -TAT-AAA-ATT-TTA-AAG-TAT-GTT-CAA-G
	C-Pr18784-	5' TTT-CCT-AGG-CCT-GGA-ATC-TCC-TCT
<b>Exon 4</b>	N-S2-X4UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -GTA-GGT-GAA-TCT-GTT-ATC-ACT
	C-S2-X4L-	5' CCT-TCT-AAA-AAG-TCA-CTA-TAG-T
<b>Exon 5</b>	N-S2-X5UF2-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -GAT-CCA-GTG-GTA-TAG-AAA-TCT-TCG
	C-S2-X5LR2-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -ATA-GTG-GAG-GAG-GGG-AGA-GAA-A
<b>Exon 6</b>	N-S2-X6UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -TTC-ACT-AAT-GAG-CTT-GCC-ATT-C
	C-S2-X6LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -GTA-TAA-TCA-TGT-GGG-TAA-C
<b>Exon 7</b>	N-S2-X7UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -CTT-ACG-TGC-TTA-GTT-GAT-AA
	C-S2-X7LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -CAA-CCA-CCA-CCA-ACT-TTA-TGA
<b>Exon 8</b>	N-S2-X8UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -TTT-GTA-TTC-TGT-AAA-ATG-ATG-AGA-TCT-TT
	C-S2-X8LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -GGC-CTT-TGC-TTT-TTA-AAA-ATA-AC
<b>Exon 9</b>	N-S2-X9UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -GTG-GGA-GGA-AAT-ATT-TGC-TTT
	C-S2-X9LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -TTG-GGG-ACA-GGG-AAC-TTA-TA
<b>Exon 10</b>	N-S2-X10UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -TAG-TAG-GTA-TTT-ATG-GAA-TAC-TTT-T
	C-S2-X10LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -CTT-GAC-TCT-TAC-CTG-ATG-ACT
<b>Exon 11</b>	N-S2-X11UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -CAT-TGC-TTC-TAG-TAC-ACA-TTT
	C-S2-X11LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -CAG-GTG-ACA-TTC-AGA-ACA-TTA
<b>Exon 12</b>	N-S2-X12UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -ATT-CAG-TAT-TCC-TGT-GTA-CAT
	C-S2-X12L-	5' TTA-CCC-CCA-CAA-AGC-CCA-A
<b>Exon 13</b>	N-S2-X13UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -CGA-TTA-ATC-ATC-AGT-GTA-C
	C-S2-X13LR-	5' <u>CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC</u> -CAG-AGA-CAT-ACA-TTT-CTA-TCT-TC
<b>Exon 14</b>	°	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -TGG-CAT-ATC-CTT-CCC-AAT-GT
	C-S2-X14L-	5' GGT-AGT-AAG-TTT-CCC-ATT-AC
<b>Exon 15</b>	N-S2-X15UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -GCT-GTC-TCT-TCT-CAT-GCT-G
	C-S2-X15L-	5' CAT-CTT-AGT-GTC-CTG-TTT-AT
<b>Exon 16</b>	N-S2-X16UF-	5' <u>TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT</u> -ATT-ACT-CAT-GGG-ACA-TTC-ACA
	C-S2-X16L-	5' CCA-TGG-GCA-CTG-ACA-GTT-A

Subrayado: cebadores universales de M13.

Todos los cebadores se obtuvieron de Wahlberg SS *et al*, 2002 <sup>205</sup>



## ANEXO 5. Cebadores para la amplificación de los exones del gen *MSH6*.

Exón 1:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTCCGTCCGACAGAACGGTTG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCCCAAATGCTCCAGACTCG
Exón 2:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTGCCAGAAGACTTGGAATTG 5'-CAAACACACACACATGGCAG
Exón 3:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGATGGGGTTTGCTATGTTGC 5'-TACACCCTCCCCTTTCTTC
Exón 4.1:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGGCTGCACGGGTACCATTAT 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATCATTCTCTTCCGCTTTTCGAG
Exón 4.2:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGCCAGACACTAAGGAGGAAGG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTAGATGCATCAAAATCGGGG
Exón 4.3:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTGGCTTAAGGAGGAAAAGAGA 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTCTACATCGTGCCTCCATCA
Exón 4.4:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTTCTGGCTTTCCTGAAATTG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTAAATCTCGAACAATGGCGA
Exón 4.5:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTCTGGCCATACTCGTGCATA 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATAGCACCTGGGGTAACATCAC
Exón 4.6:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTCAGGAAGGTCTGATACCCG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGCACCATTCGTTGATAGGCT
Exón 4.7:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTAAGTGAATTGGCCCTCTCTG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTGGTTCTGACTCTTCAGGGG
Exón 4.8:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTTTTGGTAAGCGGCTCCTAA 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTTTCGAGCCTTTTCATGGTC
Exón 4.9:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTTTCTGCTCTGGAAGGATTG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTGTTTACAGCCCTTCTTGG
Exón 4.10:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTGAACAGAGCCTCCTGGAAT 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATCAGCTGGCAAACAGCACTAC
Exón 5:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTCTGATAAAACCCCAAACGA 5'-CTGTGTTTGAAAATGATCACC
Exón 6:	5'- <u>GTA</u> AAACGACGGCCAGTTTGTGAAAGTTGTTTTAGAGTGCC 5'-GCCATTGCACTCCAGCTT 5'-GCCAGCCAATAATTGCATA
Exón 7:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTCTGTGCCACAATGGTGAGT 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGAATTAAGTGAAGTGGCAGC 5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTAATGTCTTACCTAATTCATCCACAA
Exón 8 y 9:	5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTGCTAAGCAGACTCGTGTAG 5'-CAGGAAACAGCTATGACCATTCATAGTCATCATCCCTTCC
Exón 10:	5'-TAAAAGGGGAAGGGATGATG 5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTCTGAATTTACCACCTTTGTCAGA

Subrayado: cebadores universales de M13

Todos los cebadores han sido publicados por Chadwick RB *et al.*, 2001 y Kolodner RD *et al.*, 1999<sup>206,208</sup>







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**REFERENCIA**

---



## 10 REFERENCIAS

1. Folkins, A. K. & Longacre, T. A. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology* **62**, 2–30 (2013).
2. Aaltonen, L., Johns, L., Järvinen, H., Mecklin, J.-P. & Houlston, R. Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin. Cancer Res.* **13**, 356–61 (2007).
3. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919–932 (2003).
4. Lu, K. H. *et al.* Gynecologic cancer as a ‘sentinel cancer’; for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet. Gynecol.* **105**, 569–74 (2005).
5. Lynch, H. T. & Krush, A. J. The cancer family syndrome and cancer control. *Surg. Gynecol. Obstet.* **132**, 247–250 (1971).
6. Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. & Hitchins, M. P. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 181–194 (2015).
7. Boland, C. R. & Troncale, F. J. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann. Intern. Med.* **100**, 700–1 (1984).
8. Tempero, M., Jacobs, M., Lynch, H. T., Graham, C. & Blotcky, A. Serum and Hair Selenium Levels In Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **55**, 51–55 (1984).
9. Vasen, H. F. A. *et al.* Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J. Med. Genet.* **44**, 353–62 (2007).
10. Kalady, M. F., Kravochuck, S., LaGuardia, L., O’Malley, M. & Church, J. M. *Adenomas in Lynch syndrome: don’t be fooled by the ‘non’ in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.* *Fam Cancer* **12**, (2013).
11. Hampel, H. *et al.* Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5783–8 (2008).
12. Hampel, H. *et al.* Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res.* **66**, 7810–7 (2006).
13. Lynch, H. T., Hitchins, M. P., Shaw, T. G., Lynch, J. F. & Roy, H. Hereditary Colorectal Cancer. *Arch. Intern. Med.* **348**, 15–43 (2010).
14. Vasen, H. F. A. *et al.* Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* **62**, 812–23 (2013).

15. Umar, A. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 261–8 (2004).
16. van Oers, J. M. *et al.* PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13384–13389 (2010).
17. Win, A. K. *et al.* Risks of Primary Extracolonic Cancers Following Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 1363–1372 (2012).
18. Buerki, N. *et al.* Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome. *Genes. Chromosomes Cancer* **51**, 83–91 (2012).
19. Scott, R. J. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 118–127 (2001).
20. Grindedal, E. M. *et al.* Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 2460–7 (2009).
21. Win, A. K. *et al.* Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J Clin Oncol* **30**, 958–964 (2012).
22. Jenkins, M. *et al.* Cancer Risks For Mismatch Repair Gene Mutation Carriers: A Population-Based Early Onset Case-Family Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 489–498 (2006).
23. Raymond, V. M., Tayob, N., Kastrinos, F., Sparr, J. & Wang, F. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* (2009).
24. Møller, P. *et al.* Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut* **66**, 464–472 (2017).
25. Hampel, H. *et al.* Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N. Engl. J. Med.* **352**, 1851–60 (2005).
26. Rubenstein, J. H. *et al.* American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology* **149**, 777–82–7 (2015).
27. Vasen, H. F. *et al.* Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J. Med. Genet.* **44**, 353–362 (2007).
28. Vasen HF, B. C. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* **296**, 2028–2030 (2005).

29. Rhees, J., Arnold, M. & Boland, C. R. Inversion of exons 1–7 of the MSH2 gene is a frequent cause of unexplained Lynch syndrome in one local population. *Fam. Cancer* **13**, 219–225 (2014).
30. Liu, Q. *et al.* A cryptic paracentric inversion of *MSH2* exons 2–6 causes Lynch syndrome. *Carcinogenesis* **37**, 10–17 (2016).
31. Blackwell, L. J., Wang, S. & Modrich, P. DNA chain length dependence of formation and dynamics of hMutS $\alpha$ .hMutL $\alpha$ .heteroduplex complexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 33233–40 (2001).
32. Farabaugh, P. J., Schmeissner, U., Hofer, M. & Miller, J. H. Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **126**, 847–57 (1978).
33. Streisinger, G. & Owen, J. Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* **109**, 633–59 (1985).
34. Levinson, G. & Gutman, G. A. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5323–38 (1987).
35. Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M. & Petes, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274–6 (1993).
36. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
37. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–2087.e3 (2010).
38. Leach, F. S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**, 1215–25 (1993).
39. Fishel, R. *et al.* The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027–38 (1993).
40. Papadopoulos, N. *et al.* Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**, 1625–9 (1994).
41. Bronner, C. E. *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**, 258–61 (1994).
42. Miyaki, M. *et al.* Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* **17**, 271–2 (1997).
43. Røyrvik, E. C., Ahlquist, T., Rognes, T. & Lothe, R. A. Slip slidin' away: a duodecennial review of targeted genes in mismatch repair deficient colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **13**, 229–57 (2007).

44. Modrich, P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* **281**, 30305–9 (2006).
45. Bridge, G., Rashid, S. & Martin, S. DNA Mismatch Repair and Oxidative DNA Damage: Implications for Cancer Biology and Treatment. *Cancers (Basel)*. **6**, 1597–1614 (2014).
46. Stojic, L., Brun, R. & Jiricny, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1091–101 (2004).
47. Surtees, J. A., Argueso, J. L. & Alani, E. Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet. Genome Res.* **107**, 146–59 (2004).
48. Bak, S. T., Sakellariou, D. & Pena-Diaz, J. The dual nature of mismatch repair as antimutator and mutator: for better or for worse. *Front. Genet.* **5**, 287 (2014).
49. Peltomäki, P. Lynch syndrome genes. *Fam. Cancer* **4**, 227–32 (2005).
50. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
51. Heinen, C. D. & Juel Rasmussen, L. Determining the functional significance of mismatch repair gene missense variants using biochemical and cellular assays. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **10**, 9 (2012).
52. Bonadona, V. *et al.* Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* **305**, 2304–10 (2011).
53. Vasen, H. F. *et al.* MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J. Clin. Oncol.* **19**, 4074–80 (2001).
54. Baglietto, L. *et al.* Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 193–201 (2010).
55. Senter, L. *et al.* The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. *Gastroenterology* **135**, 419–28 (2008).
56. Susan, D. *et al.* NCCN Guidelines Version 2.2016 Panel Members Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal.
57. Provenzale, D. *et al.* Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **14**, 1010–30 (2016).
58. Hitchins, M. P. Constitutional epimutation as a mechanism for cancer causality and heritability? *Nat. Rev. Cancer* **15**, 625–34 (2015).
59. Gazzoli, I., Loda, M., Garber, J., Syngal, S. & Kolodner, R. D. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the

- unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res.* **62**, 3925–8 (2002).
60. Suter, C. M., Martin, D. I. K. & Ward, R. L. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat. Genet.* **36**, 497–501 (2004).
  61. Hitchins, M. *et al.* MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* **129**, 1392–9 (2005).
  62. Chan, T. L. *et al.* Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* **38**, 1178–83 (2006).
  63. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* **41**, 112–7 (2009).
  64. Miyakura, Y. *et al.* Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 147–56 (2004).
  65. Hitchins, M. P. *et al.* Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N. Engl. J. Med.* **356**, 697–705 (2007).
  66. Hitchins, M. P. *et al.* Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'UTR. *Cancer Cell* **20**, 200–13 (2011).
  67. Kwok, C.-T. *et al.* The MLH1 c.-27C>A and c.85G>T variants are linked to dominantly inherited MLH1 epimutation and are borne on a European ancestral haplotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 617–24 (2014).
  68. Morak, M. *et al.* Biallelic MLH1 SNP cDNA expression or constitutional promoter methylation can hide genomic rearrangements causing Lynch syndrome. *J. Med. Genet.* **48**, 513–9 (2011).
  69. Hitchins, M. P. The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **12**, 189–205 (2013).
  70. Goel, A. *et al.* De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int. J. Cancer* **128**, 869–78 (2011).
  71. Pineda, M. *et al.* MLH1 methylation screening is effective in identifying epimutation carriers. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 1256–64 (2012).
  72. van Roon, E. H. J. *et al.* Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, is there a genetic predisposition? *BMC Cancer* **10**, 180 (2010).
  73. Castillejo, A. *et al.* Prevalence of MLH1 constitutional epimutations as a cause of Lynch syndrome in unselected versus selected consecutive series of patients with colorectal cancer. *J. Med. Genet.* **52**, 498–502



- (2015).
74. Guarinos, C. *et al.* EPCAM germ line deletions as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. *J. Mol. Diagn.* **12**, 765–70 (2010).
  75. Tutlewska, K., Lubinski, J. & Kurzawski, G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **11**, 9 (2013).
  76. Kempers, M. J. E. *et al.* Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet. Oncol.* **12**, 49–55 (2011).
  77. Lynch, H. T. *et al.* Lynch syndrome-associated extracolonic tumors are rare in two extended families with the same EPCAM deletion. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 1829–36 (2011).
  78. Morak, M., Laner, A., Scholz, M., Madorf, T. & Holinski-Feder, E. Report on de-novo mutation in the MSH2 gene as a rare event in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 1101–5 (2008).
  79. Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Geurts van Kessel, A. & Hoogerbrugge, N. EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam. Cancer* **12**, 169–74 (2013).
  80. Kuiper, R. P. *et al.* Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Hum. Mutat.* **32**, 407–14 (2011).
  81. Sijmons, R. H., Greenblatt, M. S. & Genuardi, M. Gene variants of unknown clinical significance in Lynch syndrome. An introduction for clinicians. *Fam. Cancer* **12**, 181–7 (2013).
  82. Plon, S. E. *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum. Mutat.* **29**, 1282–91 (2008).
  83. Tavtigian, S. V, Greenblatt, M. S., Goldgar, D. E., Boffetta, P. & IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum. Mutat.* **29**, 1261–4 (2008).
  84. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–24 (2015).
  85. Thompson, B. A. *et al.* Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat. Genet.* **46**, 107–15 (2014).
  86. Spurdle, A. B. *et al.* Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum. Mutat.* **29**, 1304–13 (2008).

87. Plazzer, J. P. *et al.* The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **12**, 175–80 (2013).
88. Peltomäki, P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam. Cancer* **15**, 385–93 (2016).
89. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* **49**, 1374–403 (2013).
90. Malvezzi, M. *et al.* European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, 725–31 (2016).
91. Gruber, S. B. & Thompson, W. D. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**, 411–7 (1996).
92. Olson, S. H. *et al.* Maximizing resources to study an uncommon cancer: E2C2--Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. *Cancer Causes Control* **20**, 491–6 (2009).
93. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. cancer* **136**, E359-86 (2015).
94. Haidopoulos, D. *et al.* Risk factors in women 40 years of age and younger with endometrial carcinoma. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **89**, 1326–30 (2010).
95. Sorosky, J. I. Endometrial cancer. *Obstet. Gynecol.* **120**, 383–97 (2012).
96. Brinton, L. A. *et al.* Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**, 1317–25 (1992).
97. Combination oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. *JAMA* **257**, 796–800 (1987).
98. Lu, K. H. *et al.* Prospective determination of prevalence of lynch syndrome in young women with endometrial cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5158–64 (2007).
99. Connor, E. V., Raker, C. A., Clark, M. A. & Stuckey, A. R. Obesity risk awareness in women with endometrial cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **295**, 965–969 (2017).
100. Bansal, N., Yendluri, V. & Wenham, R. M. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* **16**, 8–13 (2009).
101. Borch, K. B. *et al.* Physical activity and risk of endometrial cancer in the

- Norwegian Women and Cancer (NOWAC) study. *Int. J. cancer* **140**, 1809–1818 (2017).
102. Daniels, M. S. & Lu, K. H. Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Semin. Oncol.* **43**, 543–547 (2016).
  103. Walsh, T. *et al.* Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18032–7 (2011).
  104. Aarnio, M. *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int. J. cancer* **81**, 214–8 (1999).
  105. Hampel, H. *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology* **129**, 415–21 (2005).
  106. Stoffel, E. M. *et al.* Missed adenomas during colonoscopic surveillance in individuals with Lynch Syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **1**, 470–5 (2008).
  107. Ryan, P. *et al.* Comparison of clinical schemas and morphologic features in predicting Lynch syndrome in mutation-positive patients with endometrial cancer encountered in the context of familial gastrointestinal cancer registries. *Cancer* **118**, 681–8 (2012).
  108. Barrow, E., Hill, J. & Evans, D. G. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam. Cancer* **12**, 229–40 (2013).
  109. Wang, Y. *et al.* Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 22 (2013).
  110. Stoffel, E. *et al.* Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* **137**, 1621–7 (2009).
  111. Obermair, A. *et al.* Risk of endometrial cancer for women diagnosed with HNPCC-related colorectal carcinoma. *Int. J. cancer* **127**, 2678–84 (2010).
  112. Mecklin, J. P. & Järvinen, H. J. Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome. *Dis. Colon Rectum* **29**, 160–4 (1986).
  113. Vasen, H. F. *et al.* The epidemiology of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res.* **14**, 1675–8
  114. Hendriks, Y. M. C. *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* **127**, 17–25 (2004).
  115. Aarnio, M., Mecklin, J. P., Aaltonen, L. A., Nyström-Lahti, M. & Järvinen, H. J. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int. J. cancer* **64**, 430–3 (1995).
  116. Resnick, K. E., Hampel, H., Fishel, R. & Cohn, D. E. Current and emerging trends in Lynch syndrome identification in women with

- endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* **114**, 128–34 (2009).
117. Hampel, H. *et al.* Comment on: Screening for Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) among Endometrial Cancer Patients. *Cancer Res.* **67**, 9603–9603 (2007).
  118. Gerritzen, L. H. M. *et al.* Improvement of endometrial biopsy over transvaginal ultrasound alone for endometrial surveillance in women with Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **8**, 391–7 (2009).
  119. Kobayashi, K. *et al.* Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type. *Genes. Chromosomes Cancer* **14**, 128–32 (1995).
  120. Broaddus, R. R. *et al.* Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cancer* **106**, 87–94 (2006).
  121. South, S. A., Hutton, M., Farrell, C., Mhawech-Fauceglia, P. & Rodabaugh, K. J. Uterine carcinosarcoma associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Obstet. Gynecol.* **110**, 543–5 (2007).
  122. Carcangiu, M. L. *et al.* Lynch syndrome--related endometrial carcinomas show a high frequency of nonendometrioid types and of high FIGO grade endometrioid types. *Int. J. Surg. Pathol.* **18**, 21–6 (2010).
  123. Westin, S. N. *et al.* Carcinoma of the Lower Uterine Segment: A Newly Described Association With Lynch Syndrome. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5965–5971 (2008).
  124. Goodfellow, P. J. *et al.* Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5908–13 (2003).
  125. Honoré, L. H., Hanson, J. & Andrew, S. E. Microsatellite instability in endometrioid endometrial carcinoma: correlation with clinically relevant pathologic variables. *Int. J. Gynecol. Cancer* **16**, 1386–92
  126. Team, R Core, R. F. for S. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2014).
  127. Lynch, H. T. *et al.* Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* **104**, 1535–49 (1993).
  128. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.* **36**, 801–18 (1999).
  129. Pearlman, R. *et al.* Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* (2016).  
doi:10.1001/jamaoncol.2016.5194
  130. Parry, S. *et al.* Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair

- gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* **60**, 950–7 (2011).
131. Win, A. K. *et al.* Risk of metachronous colon cancer following surgery for rectal cancer in mismatch repair gene mutation carriers. *Ann. Surg. Oncol.* **20**, 1829–36 (2013).
  132. Smyrk, T. C., Watson, P., Kaul, K. & Lynch, H. T. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* **91**, 2417–22 (2001).
  133. Deschoolmeester, V. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* **11**, 19 (2010).
  134. Alexander, J. *et al.* Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.* **158**, 527–35 (2001).
  135. Hamilton, S. R. in *Cancers of the Colon and Rectum: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management (Current Multidisciplinary Oncology)* (ed. Benson, A. B., Chakravarthy, A., Hamilton, S. R., Sigurdson, E. & Thomas, C.) (Demos medical, 2014).
  136. Bartley, A. N. *et al.* Colorectal adenoma stem-like cell populations: associations with adenoma characteristics and metachronous colorectal neoplasia. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **6**, 1162–70 (2013).
  137. Jass, J. R. & Stewart, S. M. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* **33**, 783–6 (1992).
  138. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–9 (1998).
  139. Jass, J. R. *et al.* Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res.* **14**, 1631–4 (1994).
  140. Watson, P. *et al.* The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. cancer* **123**, 444–9 (2008).
  141. van der Post, R. S. *et al.* Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. *J. Med. Genet.* **47**, 464–70 (2010).
  142. Engel, C. *et al.* Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J. Clin. Oncol.* **30**, 4409–15 (2012).
  143. Giardiello, F. M. *et al.* Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology* **147**, 502–26 (2014).
  144. Liu, J. *et al.* Microsatellite instability and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ovarian endometrioid cancer. *Mod. Pathol.* **17**, 75–80 (2004).

145. Barrow, E. *et al.* Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin. Genet.* **75**, 141–9 (2009).
146. Aarnio, M., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., Mecklin, J. P. & Järvinen, H. J. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int. J. cancer* **74**, 551–5 (1997).
147. Capelle, L. G. *et al.* Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology* **138**, 487–92 (2010).
148. Schulmann, K. *et al.* HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology* **128**, 590–9 (2005).
149. Giardiello, F. M. *et al.* Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the us multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology* **147**, 502–526 (2014).
150. Trimbath, J. D. *et al.* Café-au-lait spots and early onset colorectal neoplasia: a variant of HNPCC? *Fam. Cancer* **1**, 101–5 (2001).
151. Gallinger, S. *et al.* Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* **126**, 576–85 (2004).
152. Bodo, S. *et al.* Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome Based on Microsatellite Instability and Lymphocyte Tolerance to Methylating Agents. *Gastroenterology* **149**, 1017–29.e3 (2015).
153. Wang, Q. *et al.* Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum. Genet.* **112**, 117–23 (2003).
154. Lynch, H. T., Lynch, P. M., Pester, J. & Fusaro, R. M. The cancer family syndrome. Rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch. Intern. Med.* **141**, 607–11 (1981).
155. Entius, M. M. *et al.* Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1784–9 (2000).
156. Kruse, R. & Ruzicka, T. DNA mismatch repair and the significance of a sebaceous skin tumor for visceral cancer prevention. *Trends Mol. Med.* **10**, 136–41 (2004).
157. Katz, L. H. *et al.* Screening adherence and cancer risk perceptions in colorectal cancer survivors with Lynch-like syndrome. *Clin. Genet.* **89**, 392–8 (2016).
158. Carethers, J. M. & Stoffel, E. M. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 9253–61 (2015).
159. Buchanan, D. D. *et al.* Tumor mismatch repair immunohistochemistry and

- DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing. *J. Clin. Oncol.* **32**, 90–100 (2014).
160. Rodríguez-Soler, M. *et al.* Risk of Cancer in Cases of Suspected Lynch Syndrome Without Germline Mutation. *Gastroenterology* **144**, 926–932.e1 (2013).
  161. Mensenkamp, A. R. *et al.* Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* **146**, 643–646.e8 (2014).
  162. Haraldsdottir, S. *et al.* Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* **147**, 1308–1316.e1 (2014).
  163. Kravochuck, S. E. & Church, J. M. Hereditary non-polyposis colorectal cancer/Lynch syndrome in three dimensions. *ANZ J. Surg.* n/a-n/a (2016). doi:10.1111/ans.13483
  164. Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M. & Lynch, H. T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* **34**, 424–5 (1991).
  165. Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P. & Lynch, H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**, 1453–6 (1999).
  166. Tiwari, A. K., Roy, H. K. & Lynch, H. T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM* **109**, 151–8 (2016).
  167. Green, R. C., Parfrey, P. S., Woods, M. O. & Younghusband, H. B. Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 331–40 (2009).
  168. Lindor, N. M. *et al.* Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* **293**, 1979–85 (2005).
  169. Rodriguez-Bigas, M. A. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1758–62 (1997).
  170. Piñol, V. *et al.* Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* **293**, 1986–94 (2005).
  171. Barnetson, R. A. *et al.* Identification and Survival of Carriers of Mutations in DNA Mismatch-Repair Genes in Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2751–2763 (2006).
  172. Kastrinos, F. *et al.* The PREMM1,2,6 Model Predicts Risk of MLH1,

- MSH2, and MSH6 Germline Mutations Based on Cancer History. *Gastroenterology* **140**, 73–81.e5 (2011).
173. Dinh, T. A. *et al.* Health benefits and cost-effectiveness of primary genetic screening for Lynch syndrome in the general population. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **4**, 9–22 (2011).
  174. Mercado, R. C. *et al.* Performance of PREMM(1,2,6), MMRpredict, and MMRpro in detecting Lynch syndrome among endometrial cancer cases. *Genet. Med.* **14**, 670–80 (2012).
  175. Balmaña, J. *et al.* Comparison of predictive models, clinical criteria and molecular tumour screening for the identification of patients with Lynch syndrome in a population-based cohort of colorectal cancer patients. *J. Med. Genet.* **45**, 557–63 (2008).
  176. Palomaki, G. E., McClain, M. R., Melillo, S., Hampel, H. L. & Thibodeau, S. N. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet. Med.* **11**, 42–65 (2009).
  177. Peltomäki, P. & Vasen, H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis. Markers* **20**, 269–76 (2004).
  178. van Riel, E. *et al.* A novel pathogenic MLH1 missense mutation, c.112A &gt; C, p.Asn38His, in six families with Lynch syndrome. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **8**, 7 (2010).
  179. Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N. & Modrich, P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* **126**, 297–308 (2006).
  180. de Jong, A. E. *et al.* Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 972–80 (2004).
  181. Southey, M. C. *et al.* Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6524–32 (2005).
  182. Buecher, B. *et al.* Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Dig. Liver Dis.* **45**, 441–9 (2013).
  183. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 5248–57 (1998).
  184. Buhard, O. *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* **24**, 241–51 (2006).
  185. Buhard, O., Suraweera, N., Lectard, A., Duval, A. & Hamelin, R.



- Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis. Markers* **20**, 251–7 (2004).
186. Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804–11 (2002).
  187. Agostini, M. *et al.* A ten markers panel provides a more accurate and complete microsatellite instability analysis in mismatch repair-deficient colorectal tumors. *Cancer Biomark.* **6**, 49–61 (2010).
  188. Laghi, L., Bianchi, P. & Malesci, A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene* **27**, 6313–6321 (2008).
  189. Teutsch, S. M. *et al.* The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet. Med.* **11**, 3–14 (2009).
  190. Moreira, L. *et al.* Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* **308**, 1555–65 (2012).
  191. Kastrinos, F. *et al.* Development and validation of a colon cancer risk assessment tool for patients undergoing colonoscopy. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 1508–18 (2009).
  192. Monzon, J. G. *et al.* Validation of predictive models for germline mutations in DNA mismatch repair genes in colorectal cancer. *Int. J. cancer* **126**, 930–9 (2010).
  193. Julié, C. *et al.* Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2825–35; quiz 2836 (2008).
  194. Ladabaum, U. *et al.* Strategies to Identify the Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *Ann. Intern. Med.* **155**, 69 (2011).
  195. *Guía de Práctica Clínica en Cáncer Cereeditario de la Comunitat Valenciana.* (2017).
  196. Perez-Carbonell, L. *et al.* Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut* **61**, 865–872 (2012).
  197. Jover, R. *et al.* Defective mismatch-repair colorectal cancer: clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 389–94 (2004).
  198. Goel, A. *et al.* Aberrant DNA Methylation in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Without Mismatch Repair Deficiency. *Gastroenterology* **138**, 1854–1862.e1 (2010).

199. Xicola, R. M. *et al.* Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 244–52 (2007).
200. Jeuken, J. W. M. *et al.* MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab. Invest.* **87**, 1055–65 (2007).
201. Joensuu, E. I. *et al.* Epigenetic signatures of familial cancer are characteristic of tumor type and family category. *Cancer Res.* **68**, 4597–605 (2008).
202. Pérez-Carbonell, L. *et al.* Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J. Mol. Diagn.* **12**, 498–504 (2010).
203. Deng, G. *et al.* BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 191–5 (2004).
204. Nagasaka, T. *et al.* Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* **134**, 1950–60, 1960.e1 (2008).
205. Wahlberg, S. S. *et al.* Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res.* **62**, 3485–92 (2002).
206. Chadwick, R. B. *et al.* Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma. *J. Med. Genet.* **38**, 461–6 (2001).
207. Salovaara, R. *et al.* Population-Based Molecular Detection of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 2193–2200 (2000).
208. Kolodner, R. D. *et al.* Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* **59**, 5068–74 (1999).
209. van der Klift, H. M. *et al.* Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum. Mutat.* **31**, 578–87 (2010).
210. Ou, J. *et al.* A database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. *Hum. Mutat.* **29**, 1337–41 (2008).
211. Egoavil, C. *et al.* Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One* **8**, e79737 (2013).
212. NM\_000179.2(MSH6):c.116G>A (p.Gly39Glu) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36581/>. (Accessed: 7th May 2017)

213. NM\_000088.3(COL1A1):c.2110G>T (p.Gly704Cys) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36581/>. (Accessed: 7th May 2017)
214. Cook, L. S. *et al.* Endometrial cancer and a family history of cancer. *Gynecol. Oncol.* **130**, 334–9 (2013).
215. Moline, J. *et al.* Implementation of tumor testing for lynch syndrome in endometrial cancers at a large academic medical center. *Gynecol. Oncol.* **130**, 121–6 (2013).
216. Aguirre, E. Cribado de Síndrome de Lynch en una cohorte de pacientes diagnosticadas de cáncer de endometrio a edad igual o inferior a 60 años. (Universidad de Zaragoza, 2016).
217. Rubio, I. *et al.* Analysis of Lynch Syndrome Mismatch Repair Genes in Women with Endometrial Cancer. *Oncology* **91**, 171–176 (2016).
218. Shia, J. *et al.* Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 1639–45 (2009).
219. Rabban, J. T. *et al.* Association of Tumor Morphology With Mismatch-repair Protein Status in Older Endometrial Cancer Patients. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 793–800 (2014).
220. Mills, A. M. *et al.* Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 1501–9 (2014).
221. Ferguson, S. E. *et al.* Performance characteristics of screening strategies for Lynch syndrome in unselected women with newly diagnosed endometrial cancer who have undergone universal germline mutation testing. *Cancer* **120**, 3932–3939 (2014).
222. Masuda, K. *et al.* Relationship of lower uterine segment cancer with Lynch syndrome: a novel case with an hMLH1 germline mutation. *Oncol. Rep.* **28**, 1537–43 (2012).
223. Mills, A. M., Liou, S., Kong, C. S. & Longacre, T. A. Are women with endocervical adenocarcinoma at risk for lynch syndrome? Evaluation of 101 cases including unusual subtypes and lower uterine segment tumors. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **31**, 463–9 (2012).
224. Hegde, M. *et al.* ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet. Med.* **16**, 101–16 (2014).
225. Li, F. *et al.* The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . *Cell* **153**, 590–600 (2013).

226. Church, D. N. *et al.* DNA polymerase  $\epsilon$  and  $\delta$  exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2820–8 (2013).
227. Evans, T. & Matulonis, U. Next-Generation Sequencing: Role in Gynecologic Cancers. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **14**, 1165–73 (2016).
228. Suhaimi, S.-S., Ab Mutalib, N.-S. & Jamal, R. Understanding Molecular Landscape of Endometrial Cancer through Next Generation Sequencing: What We Have Learned so Far? *Front. Pharmacol.* **7**, 409 (2016).
229. Watkins, J. C. *et al.* Universal Screening for Mismatch-Repair Deficiency in Endometrial Cancers to Identify Patients With Lynch Syndrome and Lynch-like Syndrome. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **36**, 115–117 (2017).
230. Kwon, J. S. *et al.* Testing women with endometrial cancer to detect Lynch syndrome. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2247–52 (2011).
231. Resnick, K. *et al.* Lynch Syndrome Screening Strategies Among Newly Diagnosed Endometrial Cancer Patients. *Obstet. Gynecol.* **114**, 530–536 (2009).
232. Mojtahed, A., Schrijver, I., Ford, J. M., Longacre, T. A. & Pai, R. K. A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas. *Mod. Pathol.* **24**, 1004–1014 (2011).
233. Walsh, M. D. *et al.* Molecular, pathologic, and clinical features of early-onset endometrial cancer: identifying presumptive Lynch syndrome patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1692–700 (2008).
234. Leenen, C. H. M. *et al.* Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer  $\leq 70$  years. *Gynecol. Oncol.* **125**, 414–20 (2012).
235. Batte, B. A. L. *et al.* Consequences of universal MSI/IHC in screening ENDOMETRIAL cancer patients for lynch syndrome. *Gynecol. Oncol.* **134**, 319–325 (2014).
236. Goodfellow, P. J. *et al.* Combined Microsatellite Instability, MLH1 Methylation Analysis, and Immunohistochemistry for Lynch Syndrome Screening in Endometrial Cancers From GOG210: An NRG Oncology and Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 4301–8 (2015).
237. Mas-Moya, J. *et al.* Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum. Pathol.* **46**, 1616–25 (2015).
238. Mills, A. M. *et al.* Clinicopathologic Comparison of Lynch Syndrome-associated and “Lynch-like” Endometrial Carcinomas Identified on Universal Screening Using Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 155–65 (2016).
239. Anagnostopoulos, A. *et al.* Identifying Lynch Syndrome in Women

Presenting With Endometrial Carcinoma Under the Age of 50 Years. *Int. J. Gynecol. Cancer* 1 (2017). doi:10.1097/IGC.0000000000000962



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante