



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

MEDIKUNTZA
ETA ERIZAINNTZA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE MEDICINA
Y ENFERMERÍA

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Medicina

Valor pronóstico de las mutaciones del gen POLE en el cáncer de endometrio

Autor:

Nerea Bastardo Gordejuela

Director/a:

Irene Ruiz Díaz

Codirector/a

Maialen Arruti Martin

© 2021, Nerea Bastardo Gordejuela

Donostia, 22 de abril de 2021

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	CARCINOMA DE ENDOMETRIO.....	1
1.2.	ESTADO ACTUAL.....	3
2.	HIPÓTESIS.....	5
3.	OBJETIVOS.....	5
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
4.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	6
4.2.	ANÁLISIS DE MUTACIONES POLE.....	6
4.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	8
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
6.	REFERENCIAS.....	14

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARCINOMA DE ENDOMETRIO

El cáncer de endometrio (CE) es la neoplasia ginecológica más frecuente en países desarrollados, con una prevalencia de 34.7% a los 5 años. Se estima que en el año 2018 alrededor de 121.578 mujeres fueron diagnosticadas en Europa con 29.638 muertes.⁽¹⁾ La incidencia ha ido aumentando en las últimas décadas debido al envejecimiento y el aumento de la prevalencia de la obesidad.^(1,2) Más del 90% de los casos son diagnosticados entre los 60 y 70 años, con una incidencia del 2-5% antes de los 40, la mayoría de las pacientes presenta un sangrado uterino anormal como síntoma principal.

Ante la sospecha clínica, se debe realizar una ecografía transvaginal para descartar patología orgánica, en caso de que ésta sea sospechosa o la clínica persista se deberá realizar una biopsia endometrial o histerectomía diagnóstica. El tratamiento de la enfermedad requiere estadificación quirúrgica según los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, para lo cual debe realizarse histerectomía total con doble anexectomía con o sin radioterapia y/o quimioterapia como tratamiento adyuvante.⁽²⁾ Los gestágenos pueden ser una opción de tratamiento en pacientes inoperables o que no deseen tratamiento quirúrgico, y en el tratamiento de la recidiva cuando el tumor es bien diferenciado y /o expresa receptores hormonales.

En los últimos años la utilización de perfiles moleculares ha definido nuevos grupos de perfil pronóstico. Uno de ellos corresponde a las pacientes con mutación somática del gen POLE. Estas pacientes presentan un pronóstico muy favorable.

Endometrial Cancer (EC) is the most frequent gynecological neoplasm in developed countries, with a prevalence of 34.7% in 5 years. In Europe, it is estimated that in 2018 around 121,578 women received a diagnosis of EC; of these, 29,638 died. The incidence has been increasing in recent decades due to an aging population and the increasing prevalence of obesity. More than 90% of cases are diagnosed between 60 and 70 years of age, with an incidence of 2-5% before 40. Most of the patients present with abnormal uterine bleeding as the main symptom. Upon clinical suspicion, a transvaginal ultrasound should be performed to

rule out organic pathology. If this is suspicious or the symptoms persist, an endometrial biopsy or diagnostic hysterectomy should be performed.

Treatment of the disease requires surgical staging according to the criteria of the International Federation of Gynecology and Obstetrics. For this a total hysterectomy with double adnexectomy, with or without radiotherapy and/or chemotherapy as adjuvant treatment, must be performed. Progestins can be a treatment option for inoperable patients or for those who do not want surgical treatment. They can also be used in the treatment of a relapse when the tumor is well-differentiated and/or expresses hormone receptors.

In the last years, the use of molecular profiles have defined new prognostic profile groups. One of them, corresponds to patients with somatic mutation of POLE gene. These patients have a favorable prognosis.

1.2 ESTADO ACTUAL

Clásicamente, los carcinomas de endometrio se han dividido desde el punto de vista clínico-patológico en dos grandes grupos (Bokhman⁽³⁾): tipo I y tipo II. Los de tipo I (65%), en su mayoría endometrioides, se relacionan con la exposición a estrógenos. Suelen ser de bajo grado, presentan una evolución lenta y un pronóstico favorable con >85% de tasa de supervivencia a los 5 años. Los de tipo II (10-20%) incluyen un grupo de tumores con distintas histologías, que a menudo se desarrollan sobre endometrios atróficos, suelen diagnosticarse en estadios más avanzados, y presentan peor pronóstico.

Con el avance de los conocimientos de las bases genéticas del cáncer, en el año 2013 el Atlas Genómico del Cáncer (ATCG)⁽⁴⁾ propuso un nuevo sistema de clasificación, combinando características moleculares e histopatológicas, para mejorar la estratificación del riesgo y el manejo clínico de las pacientes con cáncer de endometrio (CE). Esta reclasificación se basa en la distinción de cuatro grandes grupos, tumores con POLE-mutado/ultramutado (12%), con inestabilidad de microsatélites o MSI (40%), con número de copias bajo/p53 wild type (30%) y con número de copias alto/p53-mutado (18%).⁽⁵⁾

El grupo POLE ultramutado se define por la presencia de > 100 mutaciones /Mb, característica que conduce a una mayor generación de neoantígenos y activación del sistema inmunológico del paciente.^(5,6,7,8) Presenta alteración del número de copias somáticas muy bajo y estabilidad de microsatélites. A menudo estos tumores presentan un fenotipo de alto grado y morfología ambigua, con células tumorales gigantes dispersas y presencia de celularidad linfoide asociada al tumor.⁽⁵⁾ Se han identificado numerosas mutaciones en este gen, considerando cinco de ellas las más comunes y clasificadas como patógenas en base a datos previos, todas ellas ubicadas en el dominio de la exonucleasa: p.Pro286Arg (exón 9), p.Val411Leu (exón 13), p.Ser297Phe (exón 9), p.Ala456Pro(exón 14), y p.Ser459Phe (exón 14).^(5,9)

El grupo MSI hipermutado (pérdida de proteínas MLH-1, MSH2, MSH6 y/o PMS2) se caracteriza por presentar 10-100 mutaciones/Mb y baja cantidad de alteraciones del número de copias somáticas. Con frecuencia muestra un fenotipo de alto grado, con diferenciación mucinosa y celularidad linfoide asociada, siendo habitual la invasión del espacio linfovascular. Este grupo se relaciona con el Síndrome de Lynch, presentando un pronóstico intermedio.^(5,10,11)

El grupo definido como bajo número de copias, viene definido por < 10 mutaciones/Mb, baja alteración del número de copias somáticas y estabilidad de microsatélites. El 30-40% de los tumores presentan mutaciones en el gen CTNNB1. La mayoría se asocian a un fenotipo de bajo grado (1-2) con diferenciación escamosa y ausencia de celularidad linfoide asociada a tumor. Se relacionan con un índice de masa corporal elevado y cursan con pronóstico favorable.^(5,10,11)

Por último, el grupo p53 mutado presenta <10 mutaciones /Mb, incremento del número de copias somáticas y estabilidad de microsatélites. En su mayoría, muestran un fenotipo de alto grado con patrones sólido-glandulares y atipia citológica difusa. Estos tumores en general se diagnostican en estadios avanzados y, son de mal pronóstico.^(5,10,11)

En estudios realizados se ha demostrado la relación de estos subgrupos con el pronóstico de los pacientes con carcinoma de endometrio, siendo el grupo p53 mutado el de peor pronóstico, mientras que los tumores con mutaciones en el dominio de exonucleasa de POLE se asocian con un pronóstico favorable y una mejor supervivencia libre de progresión de enfermedad en comparación con otros tumores de tipo, grado y estadio similares.^(10,11,12) La importancia del gen POLE, implicado en la replicación del ADN, se ha descrito recientemente en un 7-12% de cáncer de endometrio, así como en el 1-2% cánceres colorrectales. También se han descrito mutaciones en tumores adrenocorticales, de estómago, páncreas, próstata, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, riñón, vejiga, melanoma y tumores cerebrales y cuello.^(8,13)

Las características clínicas de los pacientes cuyos tumores muestran mutación en el gen POLE no están claramente definidas, pero tienden a ser más jóvenes, y con una histología endometrioide de grado 3.^(13,14,15)

2. HIPÓTESIS

La clasificación molecular ha demostrado que hay un grupo de pacientes con carcinoma de endometrio morfológicamente de alto grado y con mutaciones POLE que muestran muy buen pronóstico.

En la actualidad el pronóstico de los pacientes con cáncer de endometrio se basa en criterios histológicos. La determinación de mutaciones del gen POLE permitirá seleccionar un grupo de pacientes con cáncer de endometrio con histología de alto grado en los que no será necesario el uso de tratamientos adyuvantes de quimio o radioterapia dado su excelente pronóstico, lo que mejoraría su calidad de vida, evitando el sobretratamiento.

3. OBJETIVOS

Identificar mutaciones del dominio exonucleasa del gen POLE en muestras tumorales obtenidas durante el periodo 2001-2007 en el Hospital Universitario Donostia y pertenecientes a un estudio previo.

Correlacionar el estado mutacional del gen POLE con la evolución clínica de estas pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para el estudio realizado se han utilizado 212 biopsias de adenocarcinoma de endometrio tipo endometriode fijadas en formol e incluidas en parafina, recolectadas durante el período 2001–2007 en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Donostia. Se obtuvo la aprobación del comité ético para el uso de dichas muestras para el proyecto BIOEF.⁽¹⁹⁾ BIO 07/CA/021 sobre factores pronósticos en el carcinoma endometriode endometrial.

Los datos clínicos y patológicos de las pacientes se obtuvieron de la base de datos generada en el proyecto mencionado y cuyos resultados ya han sido publicados.⁽¹⁹⁾ Dicha base incluía, la edad, el grado histológico, el estadio FIGO, la infiltración miometrial, la invasión linfática y el seguimiento. A todas las pacientes se les practicó una histerectomía, seguida de linfadenectomía en aquellas con una infiltración miometrial mayor del 50%. Posteriormente, se administró radioterapia y quimioterapia en los casos indicados, según el estadio tumoral.

4.2 ANÁLISIS DE MUTACIONES POLE

El estudio de mutaciones de POLE se realizó en ADN extraído a partir de cortes de 5 μ m del tejido fijado en formol e incluido en parafina utilizando el método de fenol-cloroformo (Sanbrook y cols, 2001).⁽¹⁶⁾

Los exones 9, 13 y 14 se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores descritos en la **Tabla 1**, que fueron diseñados con el programa primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). La mezcla y las condiciones de la PCR se describen en las **Tablas 2 y 3**. En cada PCR se incluyó un control sin muestra de ADN como control de contaminación. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR Safe (Live Technologies), y se visualizaron bajo luz ultravioleta en el documentador de geles E-Box (Vilber) (**Figura 1**).

Los productos de PCR fueron secuenciados en la plataforma de genómica del Instituto Biodonostia con el secuenciador ABI PRISM 3130. Los resultados se analizaron con el programa Chromas Lite 2.1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones 9, 13 y 14 del gen POLE.

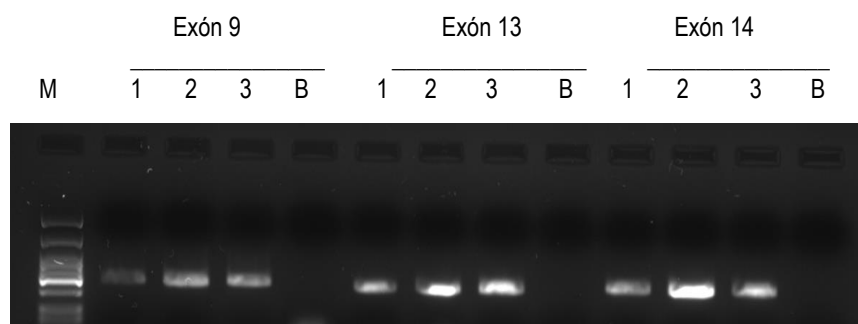
	Secuencia (5'...3')	Tamaño (pb)
Exon 9 Fordwar	GGTGTTCAGGGAGGCCTAAT	196
Exon 9 Reverse	TACTTCCCAGAAGCCACCTG	
Exon 13 Fordwar	GTTTTGCCAGTTCTCAGGGG	182
Exon 13 Reverse	CACATGTCCTCCGGGTCTAG	
Exon 14 Fordwar	CCGGTCTCCTTACTGTGTGT	188
Exon 14 Reverse	TGGGTGGACGTACTTCATGT	

Tabla 2. Mezcla de PCR.

Reactivo (stock)	Concentración final
ADN (100 ng/μl)	100 ng
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
Buffer (10 X)	1 x
Primer F (10 μM)	0,1 μM
Primer R (10 μM)	0,1 μM
Enzima (Inmolasa 5 U/μl)	0,5 U
H ₂ O _{bd}	-

Tabla 3. Condiciones de PCR.

	Tiempo	Temperatura	Nº de ciclos
Preactivación	2 min	95°C	
Denaturalización	30 s	95°C	
Anillamiento	30 s	60°C	35
Extensión	1 min	72°C	
Extensión final	2 min	72°C	

**Figura 1.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa al 2% de las PCRs de los exones 9, 13 y 14 del gen POLE en tres muestras. M: marcador de peso molecular; B: blanco de la PCR.

4.3 ANÁLISIS DE ESTUDIO

No se llevó a cabo análisis estadístico para determinar la relación entre la mutación POLE y los parámetros clínicos, debido al bajo número de muestras con mutación, y por consiguiente con poco poder estadístico. Para el análisis de la supervivencia, en cada individuo se especificó la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP) en un periodo de 5 años.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos clínicos para las 212 pacientes con cáncer de endometrio tipo endometrioides se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los casos.

Característica	N (%)
Edad	
≤ 65 años	133 (55)
> 65 años	109 (45)
Grado	
I	103 (42.7)
II	114 (47.3)
III	24 (10)
Estadio	
IA	45 (19.2)
IB	110 (48.5)
II	33 (14.5)
IIIA	4 (1.8)
IIIB	10 (4.4)
IIIC1	6 (2.6)
IIIC2	0 (0)
IVA	13 (5.7)
IVB	6 (2.6)
Infiltración miometrial	
Ausente o < 50%	175 (72.6)
> 50%	66 (27.4)

De las 212 muestras con cáncer de endometrio tipo endometriode, 133 muestras fueron secuenciadas para los exones 9, 13 y 14 del gen POLE. Se identificaron 5 (3,75%) mutaciones somáticas de POLE, de las cuales 4 se encontraron en las regiones hotspot POLE (**Tabla 5**); 2 de las 5 mutaciones se detectaron en el exón 9 (p.P286R) (**Figura 2**) y otras 2 de 5 en el exón 13 (p.V411L). Una de las cinco mutaciones mostró una mutación en el exón 14, identificada como c.1375_1377del (p.459del), situada sobre la región hotspot. Como consecuencia de este último hallazgo, se da la pérdida del codón TCT que corresponde al aminoácido serina (**Figura 3**).

La edad media de los pacientes con mutación POLE (59 años) fue menor de la de los pacientes que no presentaron la mutación (64 años). Aunque estudios anteriores han demostrado que los casos con mutación POLE son en su mayoría carcinomas endometrioides grado 3, en el análisis realizado la mayoría presentaban grado 2, no habiendo diferencia con pacientes POLE no mutados. En cuanto al estadio, sólo 2 de los pacientes presentaron estadio IB, mientras que el resto presentaron II, IVB y IIIC 1. Únicamente 2 de los pacientes con mutación POLE mostraban infiltración miometrial en más del 50%.

Pese a la variedad de características clínico-patológicas de las muestras POLE mutadas sin un patrón común concreto, la mayoría presentaba una SG y SLE de 5 años. En nuestro estudio una paciente de 54 años con fenotipo de bajo riesgo (grado I y estadio IB) falleció a consecuencia del tumor. Esta paciente presentaba la mutación patogénica más común, que pertenece al exón 9 (p.P286R). Por otra parte, otra paciente de 54 años, grado 3, estadio IVB con infiltración miometrial >50% presentaba una mutación en el exón 14 identificada como c.1375_1377del (p.459del). Esta mutación no ha sido descrita anteriormente, ya que no está presente en ninguna de las bases de datos de mutaciones que se han revisado. Esta paciente mostró un pronóstico excelente con SG y SLE de 60 meses(**Tabla 6**).

Tabla 5. Resultados de los tipos de mutaciones identificadas.

Tipo de mutación	Muestras mutadas
p.P286R	2
p.V411L	2
p.459del	1

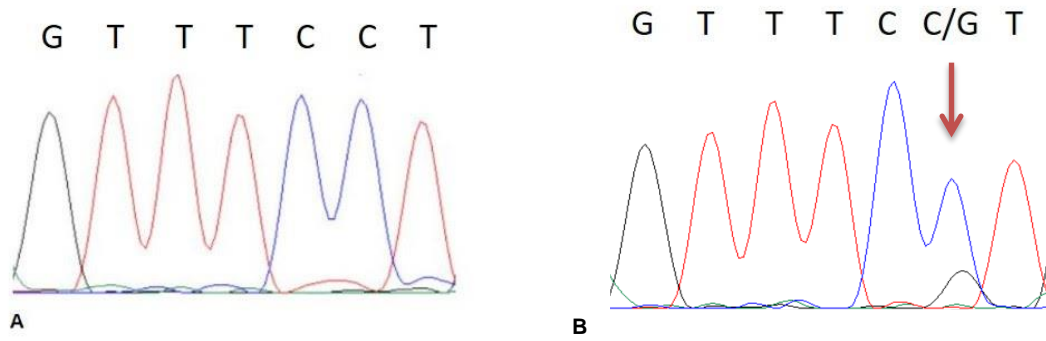


Figura 2. Imágenes representativas del exón 9 no mutado (A) y con mutación p.P286R C>G (B).

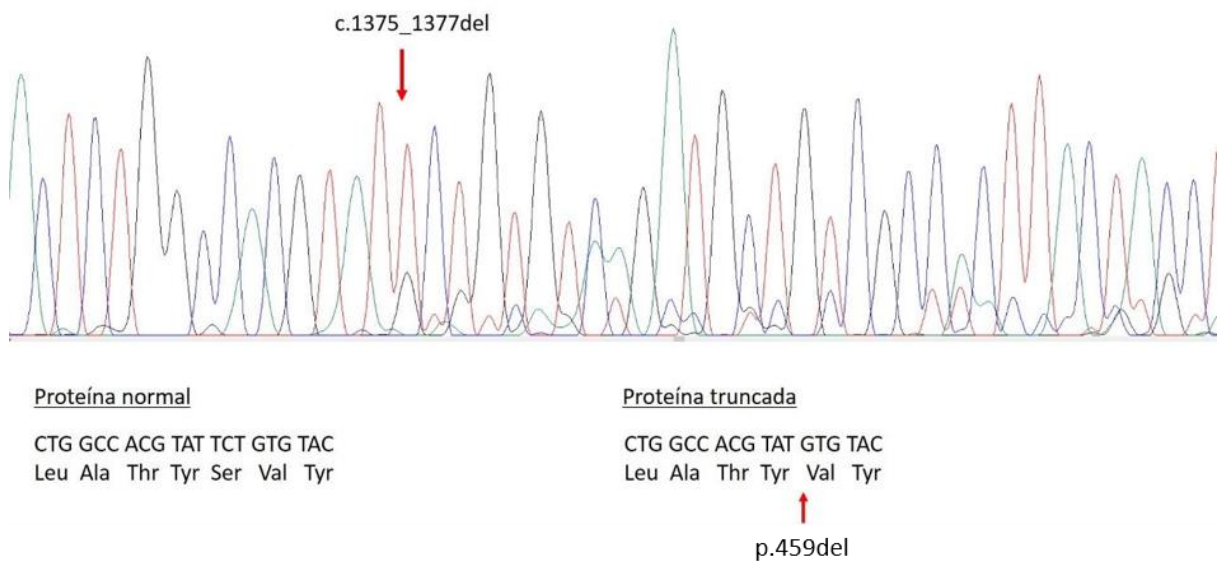


Figura 3. Electroferograma de la mutación c.1375_1377del (p.459del) detectada en una de las muestras en el exón 14 de POLE y su efecto en la síntesis de la proteína.

Tabla 6. Relación entre el tipo de mutaciones y parámetros clínico patológicos.

Edad	Grado	Infiltración miometrial	Estadio	SG (meses)	SLE(meses)	Tipo de mutación
61	2	-	IB	60	60	p.V411L
55	2	> 50%	II	60	60	p.P286R
72	2	-	IB	60	60	p.V411L
54	3	> 50%	IVB	60	60	p.459del
54	1	-	IIIC 1	16	2	p.P286R

La presencia de diferentes tipos de carcinoma de endometrio con características histológicas y moleculares específicas, aumentan la necesidad de la utilización de nuevos marcadores pronósticos que puedan estratificar correctamente los tumores, mejorando el manejo clínico de las pacientes.

Concretamente los CE ultramutados con mutación del gen POLE se han asociado con una mayor respuesta inmune y un pronóstico clínico excelente.^(6,7,8) En este estudio identificamos la presencia de las mutaciones hotspot más comunes para las que la patogenicidad está establecida, en un 3,75 % de los 133 carcinomas de endometrio tipo endometrioides estudiados. Se valoró la asociación con parámetros clínico-patológicos y su impacto pronóstico, para estudiar en nuestro grupo de pacientes los resultados previamente publicados.^(2,4,13,14,15)

En nuestra serie la media de edad de las pacientes con mutación fue menor (59 años) comparando con las muestras no mutadas (64 años). Este hecho confirma lo que McConechy et al.⁽¹⁴⁾ o Imboden S et al.⁽¹³⁾ muestran, planteando la posibilidad que diferencias en la edad pueden tener una relación estrecha con diferencias en el desarrollo del carcinoma, ya que padecer una mutación POLE hace que un tumor sea más susceptible a la adquisición de mutaciones adicionales. De igual modo, se estudiaron otros parámetros clínico-patológicos como el grado, estadio, histología e infiltración miometrial, sin poder establecer asociación con la presencia esta mutación. En el estudio de McConechy et al.⁽¹⁴⁾ tampoco pudo demostrarse relación entre grado, histología y el estado mutacional de POLE, pero sí que pudo confirmar que los carcinomas endometriales POLE mutados grados 3 tienen un excelente pronóstico.⁽¹⁴⁾ En nuestro estudio, una paciente de 54 años que mostró grado 3, estadio IVB con unas características clínicas desfavorables, presentó un pronóstico favorable

con SG y SLE excelentes. Se revisó la mutación que presentaba la paciente, corroborando una delección sobre una mutación descrita como hotspot, en el exón 14. Dada la ausencia de este hallazgo en estudios previos, se hizo uso del programa Mutation Taster para conocer su causa y según los datos obtenidos, se observa un cambio en la secuencia de los aminoácidos, con la pérdida de una serina. Como consecuencia de ello, las características de la proteína obtenida se ven afectadas y se percibe un cambio en el splicing. Pese a que se haya descrito esta alteración teniendo en cuenta las características clínico-patológicas de la paciente y su buena evolución, podría tratarse de otra mutación POLE patogénica no descrita.

Por lo contrario, una de las pacientes con mutación p.P286R y parámetros clínico-patológicos de bajo riesgo (grado 1 y estadio IB), presentó una recurrencia a los dos meses con una supervivencia global de 16 meses. Mc Conechy et al.⁽¹⁴⁾ también describe casos aislados de recurrencia y fallecimiento con esta misma mutación en el exón 9, la más común de todas. En relación con la recurrencia, describe dos pacientes con carcinoma de endometrio tipo endometriode de 52 años y 73 años y estadio IB fallecidas, que también presentaban características similares como el tipo histológico endometriode, y un grado 2. Otros estudios como el publicado por Imboden et al.⁽¹³⁾ confirman que la mayoría de los tumores POLE mutados son de tipo endometriode y de alto grado, afirmación que no se pudo demostrar en este estudio. Esta controversia podría ser consecuencia de los diferentes criterios de inclusión establecidos en cada estudio, ya que por ejemplo PORTEC⁽¹⁸⁾ incluye principalmente casos de riesgo intermedio a intermedio-alto o el estudio TCGA⁽⁴⁾ que incluye casos de alto riesgo. No obstante, este estudio se llevó a cabo con una muestra pequeña, lo que hace que su poder estadístico se vea limitado. La mayoría de estudios realizados demuestran una asociación entre CE de alto riesgo y mutaciones POLE. No obstante, se han descrito otros biomarcadores que pueden ser potencialmente útiles sobre todo, en el grupo de carcinoma endometriode de bajo grado, como la expresión de LICAM o mutaciones en CTNNB1. Por esa razón, aunque la clasificación molecular sea válida en todos los carcinomas de endometrio, su uso se recomienda sobre todo, en los casos de alto grado, pudiéndose omitir el análisis de la mutación POLE en CE de bajo y riesgo intermedio con histología de bajo grado.⁽¹⁾

Como conclusión, son necesarios nuevos estudios moleculares para confirmar la mutación de novo hallada en nuestro estudio y su patogenicidad. El avance del conocimiento profundo de las alteraciones moleculares asociadas al cáncer de endometrio permitirá integrar este tumor en la era de la medicina de precisión.

7. REFERENCIAS:

1. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer* 2021;31:12-39.
2. Church DN, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreeuw J, Haar N Ter, Noske A, Amant F, et al. Prognostic Significance of POLE Proofreading Mutations in Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(1):dju 402.
3. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983;15(1):10.
4. Cancer Genome Atlas Research Network. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 2013, 497:67-73.
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 4).
6. Van Gool IC, Bosse T, Church DN. POLE proofreading mutation, immune response and prognosis in endometrial cancer. *Oncoimmunology.* 2016; 5:e1072675.
7. Veneris JT, Lee EK, Goebel EA, Nucci MR, Lindeman N, Horowitz NS, Lee L, Raut CP, Crotzer D, Matulonis U, et al. Diagnosis and management of a recurrent polymerase-epsilon (POLE)-mutated endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2019;153(3):471-8.
8. Park VS, Pursell ZF. POLE proofreading defects: Contributions to mutagenesis and cancer. *DNA repair (Amst).*2019;76:50-9.
9. León Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommoss S, et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2020; 250:323-335.
10. Raffone A, Travaglino A, Mascolo M, Carbone L, Guida M, Insabato, Zullo F. TCGA molecular groups of endometrial cancer: Pooled data about prognosis. *Gynecol Oncol.* 2019; 155(2): 374-383.
11. Travaglino A, Raffone A, Mollo A, Borrelli G, Alfano P, Zannoni GF, Insabato L, Zullo F. TCGA molecular subgroups and FIGO grade in endometrial endometrioid carcinoma. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2020; 301(5):1117-1125.

12. Travaglino A, Raffone A, Stradella C, Esposito R, Moretta P, Gallo C, Orlandi G, Insabato L, Zullo F. Impact of endometrial carcinoma histotype on the prognostic value of the TCGA molecular subgroups. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2020; 301(6):1355-1363.
13. Imboden S, Nastic D, Ghaderi M, Rydberg F, Rau TT, Mueller MD, Epstein E, Carlson JW. Phenotype of POLE-mutated endometrial cancer. *PLoS ONE*. 2019; 14(3): e0214318.
14. McConechy MK, Talhouk A, Leung S, et al. Endometrial Carcinomas with POLE Exonuclease Domain Mutations Have a Favorable Prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2016; 22:2865-2873.
15. Stasenko M, Tunnage I, Ashley CW, Rubinstein MM, Latham AJ, et al. Clinical outcomes of patients with POLE mutated endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2020;156:194-202.
16. Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Third edition, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
17. Li Y, Bian Y, Wang K, Wan XP. POLE mutations improve the prognosis of endometrial cancer via regulating cellular metabolism through AMF/AMFR signal transduction. *BMC Medical Genetics*. 2019; 20:202.
18. León-Castillo A, Boer SM, Powell ME, Mileskin LR, Mackay HJ, Leary A, et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *J Clin Oncol*. 2020; 38: 3388-3397.
19. Ruiz I, Martín-Arruti M, Lopez-Lopez Elixabet, Garcia-Orad Africa. Lack of association between deficient mismatch repair expression and outcome in endometrial carcinomas of the endometrioid type. *Gynecol Oncol*. 2014; 134: 20-23.