



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias
Médicas y Quirúrgicas

**“Caracterización genética y clínica de una nueva mutación
fundadora en población alicantina del síndrome de
leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario”**

Ana Beatriz Sánchez Heras

Director de la tesis:

Prof. Emérito Dr. Pere Berbel Navarro

Co-director de la tesis

Prof. Dr. Luís Gómez Pérez

Universidad Miguel Hernández de Elche

-2023-



La presente Tesis Doctoral, titulada “**Caracterización genética y clínica de una nueva mutación fundadora en población alicantina del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario**”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguiente **publicación**:

- **Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome in Spain: Clinical and Genetic Characterization.**

Sánchez-Heras AB, Castillejo A, García-Díaz JD, Robledo M, Teulé A, Sánchez R, Zúñiga Á, Lastra E, Durán M, Llord G, Yagüe C, Ramon Y Cajal T, López San Martín C, López-Fernández A, Balmaña J, Robles L, Mesa-Latorre JM, Chirivella I, Fonfria M, Perea Ibañez R, Castillejo MI, Escandell I, Gomez L, Berbel P, Soto JL.

Cancers (Basel). 2020 Nov 5;12(11):3277. doi: 10.3390/cancers12113277. PMID: 33167498; PMCID: PMC7694543

Factor de Impacto: 6,126

Cuartil: Q1

Puede encontrarse una copia completa del artículo en el Anexo I.



Otra publicación derivada de la presente Tesis Doctoral pendiente de publicación, titulada **“Caracterización genética y clínica de una nueva mutación fundadora en población alicantina del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario”**:

- **“Genetic and clinical characterization of a novel *FH* founder mutation in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome”**

Ana Beatriz Sánchez-Heras, Estela Dámaso, Adela Castillejo, Mercedes Robledo, Alexandre Teulé, Conxi Lázaro, Rosario Sánchez, Ángel Zúñiga, Adrià López-Fernández, Judith Balmaña, Luis Robles, Teresa Ramon y Cajal, M. Isabel Castillejo, Raquel Perea Ibañez, Carmen Martínez Sevilla, Andrea Sánchez-Mira, Inés Escandell, Luís Gómez, Pere Berbel, José Luis Soto.

Remitido a revista de primer cuartil.

Puede encontrarse una copia completa del manuscrito en el Anexo II.



El Dr. D. Pere Berbel Navarro, director, y el Dr. D. Luís Gómez Pérez, codirector de la tesis doctoral titulada **“Caracterización genética y clínica de una nueva mutación fundadora en población alicantina del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario”**

INFORMA/N:

Que Dña. Ana Beatriz Sánchez Heras ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Caracterización genética y clínica de una nueva mutación fundadora en población alicantina del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en a de de 202....

Director de la tesis

Codirector de la tesis

Dr. D. Pere Berbel Navarro

Dr. D. Luís Gómez Pérez



El Dra. Dña. María del Mar Masia Canuto, Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

INFORMA:

Que Dña. Ana Beatriz Sánchez Heras ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Caracterización genética y clínica de una nueva mutación fundadora en población alicantina del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en a de de 202....

Prof. Dra. Dña. María del Mar Masia Canuto

Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Este trabajo ha recibido financiación de la **Fundación de la Sociedad Española de Oncología Médica** mediante la **Beca FSEOM +1 Súmate** para proyectos de investigación, concedida en la convocatoria del año 2019.



Índice

| | |
|--|-----|
| LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS | I |
| RESUMEN | III |
| ABSTRACT | V |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. CÁNCER RENAL Y SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN A CÁNCER RENAL HEREDITARIO. | 1 |
| 1.1. Epidemiología del cáncer renal | 1 |
| 1.2. Patología de los cánceres renales y aspectos moleculares..... | 4 |
| 1.3. Diagnóstico de los cánceres renales | 8 |
| 1.4. Tratamiento de los cánceres renales | 9 |
| 1.5. Síndromes de predisposición genética hereditaria a cáncer renal | 10 |
| 1.5.1. Síndrome de Von Hippel – Lindau | 10 |
| 1.5.2. Síndrome de Birt – Hogg – Dube | 11 |
| 1.5.3. Síndrome de cáncer renal papilar tipo 1 | 12 |
| 1.5.4. Síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario | 12 |
| 2. ASESORAMIENTO Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO | 23 |
| 2.1. Asesoramiento genético en cáncer familiar y hereditario | 23 |
| 2.1.1. Definición | 23 |
| 2.1.2. Marco legal..... | 23 |
| 2.1.3. Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana..... | 24 |
| 2.1.4. Validez y utilidad clínica del estudio genético en el síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario..... | 24 |
| 2.1.5. Inclusión del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario en el Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana..... | 25 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 27 |
| 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 27 |
| 3.1. Justificación | 27 |
| 3.2. Hipótesis planteadas | 28 |
| Hipótesis 1 | 28 |
| Hipótesis 2 | 28 |
| 3.3. Objetivos | 28 |
| Objetivo 1 | 28 |
| Objetivo 2 | 28 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 29 |
| 4. PACIENTES Y RECOGIDA DE DATOS..... | 29 |
| 4.1. Detección de variantes patogénicas en línea germinal..... | 30 |

| | | |
|---|---|-----|
| 4.2. | Estudio carácter fundador de la variante patogénica <i>FH</i> (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) | 31 |
| 4.2.1. | Muestras | 31 |
| 4.2.2. | Análisis de haplotipos | 31 |
| 4.2.3. | Cálculo del tiempo del ancestro común más reciente | 32 |
| 4.3. | Análisis estadístico | 32 |
| 4.4. | Aspectos éticos y legales | 33 |
| RESULTADOS | | 34 |
| 5. | SÍNDROME DE LEIOMIOMATOSIS MÚLTIPLE Y CÁNCER RENAL HEREDITARIO EN ESPAÑA. . | 34 |
| 5.1. | Variantes patogénicas en el gen <i>FH</i> . Objetivo 1. | 34 |
| 5.2. | Manifestaciones clínicas. Objetivo 1. | 37 |
| 5.2.1. | Leiomiomas cutáneos (LMC)..... | 37 |
| 5.2.2. | Leiomiomas uterinos..... | 39 |
| 5.2.3. | Quiistes renales | 40 |
| 5.2.4. | Cánceres renales..... | 42 |
| 5.2.5. | Otros tumores | 45 |
| 6. | VARIANTE PATOGENICA <i>FH</i> (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser)..... | 46 |
| 6.1. | Estudio carácter fundador. Caracterización de haplotipos. Objetivo 2. | 46 |
| 6.2. | Características clínicas..... | 49 |
| 6.2.1. | Leiomiomas cutáneos | 49 |
| 6.2.2. | Leiomiomas uterinos..... | 50 |
| 6.2.3. | Quiistes renales | 50 |
| 6.2.4. | Cáncer renal | 51 |
| DISCUSIÓN | | 52 |
| CONCLUSIONES..... | | 61 |
| Conclusiones correspondientes al objetivo 1 | | 61 |
| Conclusiones correspondientes al objetivo 2 | | 61 |
| REFERENCIAS..... | | 63 |
| ANEXO I | | 72 |
| Artículo 1 del presente compendio: | | 72 |
| ANEXO II | | 92 |
| Artículo 2 derivado de la presente Tesis Doctoral pendiente de publicación..... | | 92 |
| ANEXO III | | 105 |
| Modelo de consentimiento informado para estudio genético utilizado en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche | | 105 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO IV | 109 |
| Modelo de consentimiento informado para donación de muestra de ADN excedente al Biobanco de Cáncer Familiar y Hereditario de la Comunidad Valenciana..... | 109 |
| ANEXO V | 114 |
| Aprobación o informe favorable del Comité Ético de la Investigación, CEIC, del Hospital General Universitario de Elche de realización del estudio | 114 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 117 |



LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| Abreviaturas y acrónimos | Significado |
|--------------------------|--|
| 2SC | S-(2-succinil) cisteína |
| AKT/PKB | Proteínas quinasas B |
| AKT1 | AKT Serina/treonina quinasa 1 |
| AMPK | Proteína-quinasa activada por AMP |
| ARE | Elementos de respuesta antioxidante |
| BAP1 | Gen que codifica para la proteína BAP1 |
| CDKN2A | Gen que codifica para las proteínas p16 y p14 |
| cM | Unidades Marshfield |
| CpG | Pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos |
| CR | Cáncer renal |
| CUL3 | Gen que codifica para la proteína CUL3, culina 3 |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ERK1/2 | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> (MAP kinases) |
| FH | Gen que codifica para la fumarato hidratasa (FH) |
| FLCN | Gen que codifica para la fibrofoliulina (FLCN) |
| GLUT1 | Transportador de glucosa |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| HIF | Factores inducibles por la hipoxia |
| HIF α | Factor inducible por la hipoxia alfa |
| HIF β | Factor inducible por la hipoxia beta |
| HLRCC | <i>Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer</i> , Leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditarios |
| IC | Intervalo de confianza |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| IMC | Índice de masa corporal |
| INI1/SMARCB1 | Gen que codifica para la proteína integrasa interactor 1 (INI1, alias SMARCB1) |
| IQR | Rango intercuartílico |
| KDM5C | Gen que codifica la enzima lisina-demetilasa 5C |
| KEAP1 | <i>Kelch like-ECH-associated protein 1</i> |
| KMT2C | Gen que codifica para las proteínas p16 y p14 |
| LMC | Leiomiomas cutáneos |
| LMU | Leiomiomas uterinos |
| LoF | <i>Loss of function</i> , pérdida de función |
| Mb | Megabases |
| MEK1/2 | <i>dual-specificity kinases</i> MEK1/2 |
| MET | Protooncogen que codifica para el receptor tirosín-quinasa MET |
| MIFT | Gen que codifica para el factor de transcripción asociado con microftalmia (MIFT) |
| mTOR | Diana de rapamicina en mamíferos codificada por <i>MTOR</i> |
| mTORC1 | Complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos, codificado por <i>MTORC1</i> |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NF2 | Gen que codifica para la proteína NF2, merlin |
| NRF2 | Factor nuclear eritroide similar al factor 2 |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| <i>Abreviaturas y acrónimos</i> | <i>Significado</i> |
|---------------------------------|--|
| OR | <i>Odds Ratio</i> . Razón de probabilidades |
| <i>PBRM1</i> | Gen que codifica para la proteína polibromo 1 (PB1) |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PHD | Prolil-hidroxilasa |
| PI3K | Fosfoinositol 3 quinasa |
| <i>PTEN</i> | Gen que codifica para la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) |
| QR | Quiste renal |
| <i>RAF</i> | Gen que codifica las proteínas quinasas RAF (<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>) |
| <i>RAS</i> | Gen que codifica las proteínas fijadoras de nucleótido de Guanina RAS (sarcoma de ratas) |
| REDECAN | Red Española de Registros de Cáncer |
| RM | Resonancia magnética |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SD | Desviación estándar |
| SDH | Complejo enzimático succinato deshidrogenasa |
| <i>SDHA</i> | Gen que codifica para la subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa (SDHA) |
| <i>SDHB</i> | Gen que codifica para la subunidad B del complejo succinato deshidrogenasa (SDHB) |
| <i>SDHC</i> | Gen que codifica para la subunidad C del complejo succinato deshidrogenasa (SDHC) |
| <i>SDHD</i> | Gen que codifica para la subunidad D del complejo succinato deshidrogenasa (SDHD) |
| SEOM | Sociedad Española de Oncología Médica |
| <i>SETD2</i> | Gen que codifica para la proteína SETD2, histona lisina metiltransferasa |
| STK11 | Serina/treonina quinasa 11 |
| TC | Tomografía computerizada |
| <i>TCEB1</i> | Gen que codifica para la elongina C |
| <i>TEFB</i> | Gen que codifica para el factor positivo de elongación de la transcripción (TEFB) |
| <i>TERT</i> | Gen que codifica para la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) |
| <i>TFE3</i> | Gen que codifica para el factor de transcripción E3 (TFE3) |
| TGF α | Factor de crecimiento transformante o tumoral alfa |
| <i>TP53</i> | Gen que codifica para la proteína TP53 |
| <i>TSC1</i> | Gen que codifica para la subunidad 1 del complejo esclerosis tuberosa (TSC1), hamartina |
| <i>TSC2</i> | Gen que codifica para la subunidad 2 del complejo esclerosis tuberosa (TSC2), Tuberina |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| <i>VHL</i> | Gen que codifica para la proteína supresora de tumores de Von Hippel-Lindau (VHL) |
| VP | Variante patogénica |
| VPP | Variante probablemente patogénica |

RESUMEN

Introducción

Los cánceres renales constituyen el octavo grupo de tumores en incidencia en población española. Se estima que un 5% de los casos son hereditarios, la mayoría por mutaciones en genes implicados en vías de señalización metabólicas celulares. El síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario (*Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer*, HLRCC) es un trastorno hereditario muy raro caracterizado por leiomiomas cutáneos (LMC), leiomiomas uterinos (LMU), quistes renales (QR) y cáncer renal (CR) y se debe a mutaciones o variantes patogénicas (VP) en el gen *FH* que codifica para la enzima fumarato hidratasa. No se ha descrito una correlación entre el genotipo y el fenotipo. El riesgo de CR oscila entre 10-16%, a edad más joven que los casos esporádicos y con mal pronóstico. Su identificación y diagnóstico genético tiene especial importancia para establecer medidas de detección precoz. Es un síndrome muy poco frecuente, aunque en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche se han diagnosticado 28 familias, 26 aparentemente no relacionadas entre sí y con la misma VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser). En otras unidades de cáncer familiar y hereditario de España se han diagnosticado a otros individuos portadores de esta misma VP, así como con otras distintas VP.

Objetivos

En primer lugar, analizar las características genéticas y clínicas de individuos con síndrome HLRCC diagnosticados en distintas consultas y unidades de cáncer hereditario de España, junto los factores de riesgo conocidos para CR, y las posibles asociaciones genotipo-fenotipo. En segundo lugar estudiar el posible carácter fundador de la VP recurrente *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser).

Material y métodos

Estudio multicéntrico y retrospectivo de individuos con diagnóstico genético o clínico de HLRCC. Se recogió información de características genéticas, de factores de riesgo para CR y de las manifestaciones clínicas. La construcción de haplotipos se realizó utilizando 38 marcadores polimórficos que flanquean el gen *FH*. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R 3.6.0. (*R Foundation for Statistical Computing*).

Resultados

Se han incluido 197 individuos: 74 casos índice y 123 familiares, con 27 VP y variantes probablemente patogénicas diferentes, 12 (44%) no descritas previamente en bases de datos. Se diagnosticaron LMC en el 65% de los pacientes, LMU en el 90% de las mujeres, QR en el 37% y CR en el 10,9%. Los pacientes con VP *missense* mostraron mayores frecuencias de LMC, LMU y QR que aquellos con VP de tipo *nonsense*, *frameshift*, *splicing* y grandes reordenamientos, con pérdida de función ($p = 0,0380$, $p = 0,001$ y $p = 0,017$, respectivamente). Ciento cuatro individuos, de 31 familias no relacionadas, son portadores de la VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser), presentando LMC el 64,6%, LMU el 98%, y CR el 10,4% de ellos. Se ha realizado análisis de haplotipos en 27 individuos de diferentes familias portadores de la VP recurrente, confirmando que comparten un haplotipo común (32/38 marcadores) y que la VP ha sido heredada de un ancestro fundador.

Conclusiones

En esta serie de pacientes con HLRCC, la más numerosa publicada hasta el momento, la frecuencia de CR es inferior a la previamente descrita. Los individuos portadores de VP y variantes probablemente patogénicas de tipo *missense* presentan mayor frecuencia de LMC, LMU y QR que los portadores de VP de tipo pérdida de función. La VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser), de tipo *missense*, es una variante patogénica con efecto fundador en la provincia de Alicante.

ABSTRACT

Introduction

Renal cancers constitute the eighth group of tumours in incidence in the Spanish population. It is estimated that 5% of cases are hereditary, mostly due to mutations in genes involved in cellular metabolic signalling pathways. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) syndrome is a very rare hereditary disorder characterised by cutaneous leiomyomas (CLM), uterine leiomyomas (ULM), renal cysts (RCyst) and renal cancer (RC) and is due to mutations or pathogenic variants (PV) in the *FH* gene that codes for the enzyme fumarate hydratase. No correlation between genotype and phenotype has been described. The risk of RC ranges between 10-16%, at a younger age than sporadic cases and with a poor prognosis. Its identification and genetic diagnosis is of particular importance to establish early detection measures. It is a very rare syndrome, although in the Cancer Genetic Counselling Unit of the General University Hospital of Elche 28 families have been diagnosed, 26 unrelated to each other and with the same PV *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser). In other hereditary and familial cancer units in Spain, other individuals have been diagnosed with this same PV, as well as with other different PV and probably pathogenic variants (PPV).

Objectives

Firstly, to analyse the genetic and clinical characteristics of individuals with HLRCC syndrome diagnosed in different hereditary cancer units in Spain, together with the known risk factors for RC, and the possible genotype-phenotype associations. Secondly, to study the possible founder character of recurrent PV *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser).

Materials and methods

Multicenter and retrospective study of individuals with a genetic or clinical diagnosis of HLRCC. Information was collected on genetic characteristics, risk factors for RC and clinical manifestations.

Haplotype construction was performed using 38 polymorphic markers flanking the *FH* gene. Statistical analyses were performed using R 3.6.0 software (*R Foundation for Statistical Computing*).

Results

One hundred and ninety-seven individuals were included: 74 index cases and 123 relatives, with 27 different PV and PPV, 12 (44%) not previously described in databases. CLM was diagnosed in 65% of patients, ULM in 90% of women, RCyst in 37% and RC in 10.9%. Patients with missense PV and PPV showed higher frequencies of CLM, ULM and RCyst than those with loss-of-function PV ($p = 0.0380$, $p = 0.001$ and $p = 0.017$, respectively). One hundred and four individuals, from 31 unrelated families, carry the PV *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser), with 64.6% having CLM, 98% having ULM and 10.4% having RC. Haplotype analysis has been performed in 27 individuals from different families carrying the recurrent PV, confirming that they share a common haplotype (32/38 markers) and that PV has been inherited from a founding ancestor.

Conclusions

In this series of patients with HLRCC, the largest published to date, the frequency of RC is lower than previously described. Individuals with missense PV and PPV have a higher frequency of CLM, ULM and RCyst than those with loss-of-function PV. The missense PV *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) is a variant with founder effect in the province of Alicante.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER RENAL Y SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN A CÁNCER RENAL HEREDITARIO.

1.1. Epidemiología del cáncer renal

Los cánceres constituyen uno de los grupos principales de enfermedades que más frecuentemente causan morbilidad y mortalidad en la población. De acuerdo con las últimas estimaciones del proyecto *Global Cancer Observatory*, el número de tumores continúa creciendo, habiendo aumentado desde los 14 millones de casos en el mundo en el año 2012 a los más de 19 millones en 2020 (1,2). Los datos indican que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas, y que alcanzará los 30 millones en 2040. En España se estima que en 2040 la incidencia alcance los 375.000 casos (3).

La Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), que integran todos los registros cáncer poblacionales españoles, ha publicado las estimaciones de la incidencia de los cánceres (excluyendo los de piel no melanoma) en España para el año 2022, que sería de 280.100 casos, 160.065 en hombres y 120.035 en mujeres. La pandemia de la COVID-19 ha afectado a los programas de cribado y diagnóstico precoz poblacionales, por lo que las cifras reales pueden ser algo inferiores. En los próximos años veremos estos casos diagnosticados en estadios más avanzados (4,5).

La edad es principal factor de riesgo para el desarrollo de la mayoría de los cánceres, junto con la exposición a lo largo de la vida a factores de riesgo exógenos, gran parte dependientes de hábitos de vida del individuo como tabaco, alcohol, contaminación, obesidad, sedentarismo, rayos ultravioletas, infecciones, en interacción con características individuales. En mujeres la incidencia de los cánceres ha aumentado en los últimos años ligado a la mayor prevalencia del tabaquismo, que se ha reducido en hombres (6).

REDECAN previó que en 2022 habría 8.078 casos de cánceres de riñón, constituyendo el 8º grupo en incidencia, más frecuentes en hombres (en 6º lugar) que en mujeres (en 13º lugar) (4). La edad media de aparición es los 65 años, aunque cada vez se diagnostican más casos en personas jóvenes. Los factores de riesgo principales son el tabaquismo, la obesidad, la hipertensión arterial y, sin una clara evidencia, la enfermedad renal terminal, así como la dieta y la exposición a factores ocupacionales y ambientales (7,8). Los fumadores activos, así como los exfumadores tienen un riesgo relativo 1,31-1,38 comparado a los no fumadores (9,10). Un aumento del índice de masa corporal (IMC) en 5 kg/m² se asocia a un riesgo relativo de 1,34 (11). Realmente se debe hablar de cánceres renales, ya que son un grupo de diferentes entidades con distintas características histopatológicas y moleculares, así como pronóstico y respuesta a tratamientos.

Los datos de estudios del atlas del genoma del cáncer (*The Cancer Genome Atlas* y el *PanCancer Atlas Germline Group*) muestran que un 3-5% de los cánceres renales se deben a predisposición genética hereditaria (12), la mayoría por mutaciones o variantes patogénicas (VP) que inactivan o alteran genes implicados en vías metabólicas celulares como son *VHL*, *MET*, *FLCN*, *TSC1*, *TSC2*, *FH*, y los genes *SDHs* entre otros (13,14). Estudios de casos en centros de referencia estiman que el 5,5% se debe a VP en los genes asociados a cáncer renal (CR) referidos anteriormente y hasta el 10,5% a VP en otros genes asociados a predisposición a otros cánceres (15). En los últimos años nuevos genes de predisposición a CR han sido identificados, muy infrecuentes, con menos datos sobre su penetrancia y su comportamiento clínico (Tabla 1) (16,17). Los síndromes de predisposición genética a CR, así como a otros tumores, siguen el modelo de Knudson de desarrollo tumoral (18) según el cual deben producirse en los dos alelos del gen eventos mutacionales para que este quede inactivado, siendo el primer evento la variante germinal heredada y el segundo una mutación somática sufrida por una célula.

El asesoramiento y estudio genético ofrece la posibilidad de diagnóstico de la predisposición hereditaria a uno o unos determinados tipos de cáncer e intervenir mediante diagnóstico precoz.

Trasmitir la información a los familiares directos para que, a su vez, sean asesorados y puedan acceder al estudio genético, permite ampliar la prevención al máximo número de personas (19,20).

Tabla 1. Principales síndromes de predisposición hereditaria a cáncer renal

| Síndrome | Riesgo cáncer renal (%) | Genes | Histología | Prevalencia |
|--|-------------------------|----------------------------------|--|-----------------|
| Von Hippel - Lindau | 25-45 | <i>VHL</i> | Células claras | 1/27.000-43.000 |
| Leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario | 10-32 | <i>FH</i> | Tubulocístico, papilar tipo 2, células claras, oncocítico. Cáncer renal asociado LMCRH | 0,5/100.000 |
| Paraganglioma/ Feocromocitoma hereditario | <10 | <i>SDHA, SDHB, SDHC, SDHD</i> | Células claras, variante eosinofílica, no clasificado | 0,3/100.000 |
| Carcinoma renal papilar hereditario | 100 | <i>MET</i> | Papilar tipo 1 | 0,14/100.000 |
| Birt-Hogg-Dube | 30 | <i>FLCN</i> | Oncocítico, híbrido, cromóforo, mixto, oncocitoma | 0,5/100.000 |
| Esclerosis Tuberosa | <5 | <i>TSC1, TSC2</i> | Células claras, papilar, cromóforo | 1/5.800 |
| Cowden | 10-15 | <i>PTEN</i> | Células claras, papilar, cromóforo | 0.5/100.000 |
| MIFT | <10 | <i>MIFT</i> | Células claras, papilar-like | Desconocida |
| BAP1 | 9-13 | <i>BAP1</i> | Células claras | 1/27.000 |
| Translocación cromosoma 3 | 30 | Translocaciones (3:6, 3:8, 3:11) | Células claras | Desconocida |

Adaptado de: Shuch and Zhang (2018).

1.2. Patología de los cánceres renales y aspectos moleculares

Los carcinomas se originan en el epitelio de los túbulos renales. Según la última clasificación de tumores renales publicada por la Organización Mundial de La Salud (OMS) que considera hasta 14 diferentes entidades de carcinomas de células renales (21), el carcinoma de células claras es la variedad más frecuente (70-80%), seguido del carcinoma papilar tipo 1 (5-10%), del carcinoma papilar tipo 2 (5-10%) y del carcinoma cromóforo (3-5%), a los que se añaden otras entidades inusuales (22,23). En la última clasificación de tumores renales publicada por la OMS en 2016, se incluyeron entre las nuevas entidades reconocidas como diferentes por sus características moleculares y patológicas, el CR asociado a déficit de fumarato hidratasa (FH) específico del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario (*Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer*, HLRCC) y el CR por déficit del complejo enzimático succinato deshidrogenasa (SDH) asociado al síndrome de paraganglioma/feocromocitoma hereditario, ambas entidades hereditarias (Tabla 2) (21,24).

Tabla 2: Clasificación de subtipos histológicos de cánceres de células renales de la Organización Mundial de la Salud 2016.

| SUBTIPOS DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES | CÓDIGO MORFOLÓGICO ICD-O |
|--|--------------------------|
| Carcinoma células claras | 8310/3 |
| Neoplasia quística multilocular bajo potencial maligno | 8316/1 |
| Carcinoma papilar | 8260/3 |
| Carcinoma asociado a HLRCC | 8311/3 |
| Carcinoma cromóforo | 8317/3 |
| Carcinoma conductos colectores | 8319/3 |
| Carcinoma medular | 8510/3 |
| Carcinoma con translocación MiT | 8311/3 |
| Carcinoma con déficit de succinato dehidrogenasa | 8311/3 |
| Carcinoma mucinoso tubular y fusocelular | 8480/3 |
| Carcinoma tubuloquístico | 8316/3 |
| Carcinoma asociado a enfermedad quística adquirida | 8316/3 |
| Carcinoma papilar de células claras | 8323/1 |
| Carcinoma inclasificado | 8312/3 |

Adaptado de Moch et al.(2016).

El estudio de los casos hereditarios de CR, junto con los datos del atlas del genoma del cáncer ha permitido entender las bases moleculares genéticas, las alteraciones metabólicas subyacentes y la importancia de la vía celular de regulación de la hipoxia (Figura 1).

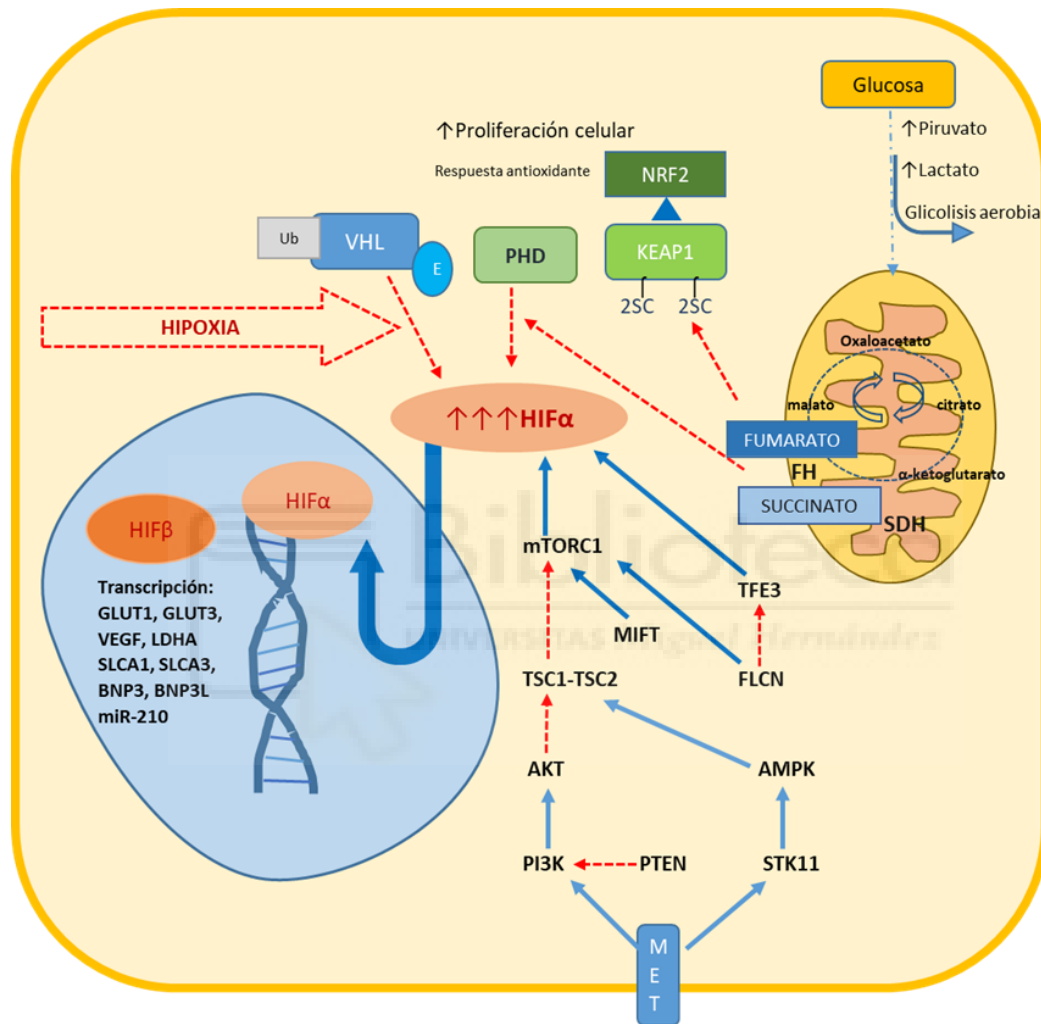


Figura 1. Vías metabólicas y cánceres renales

→ Estímulo - - - - -> Inhibición

Complejo HIF (α y β): Sensor de oxígeno, hierro, nutrientes y energía.

PHD degrada **HIFα**; **NRF2** activado por la modificación de residuos cisteína de **KEAP1**; **TFE3** ; **AMPK** , **mTORC1** , **STK11** son serina-treonina cinasas; ; **Ub**: Ubiquitinación

VHL, **FH**, **SDH**, **MIFT**, **FLCN**, **TSC1**, **TSC2**, **PTEN**, **MET** son las proteínas codificadas por genes de predisposición hereditaria a cáncer renal.

Gracias a estos datos se han producido grandes avances en el desarrollo de terapias dirigidas, principalmente agentes antiangiogénicos, que han modificado el curso vital de los

pacientes afectos. Cada tipo histológico de cáncer renal se relaciona con unas características moleculares concretas (Tabla 3), que incluye VP somáticas en genes de vías metabólicas que responden a cambios en los niveles de oxígeno, hierro, nutrientes y energía, y en genes de proliferación, supervivencia celular y metástasis en 72-92% de los tumores con potenciales terapias dirigidas actualmente en vías de investigación (14,25–29).

Tabla 2. Características moleculares de subtipos de carcinoma renales

| Subtipo histológico carcinoma renal | Características moleculares |
|-------------------------------------|--|
| Células claras | Pérdida cromosoma 3p Mutaciones y metilación promotor <i>VHL</i> Mutaciones en <i>TCEB1</i> , <i>PBRM1</i> , <i>SETD2</i> , <i>BAP1</i> , <i>KDM5C</i> , <i>TP53</i> , <i>MTOR</i> |
| Papilar 1 | Mutaciones en <i>MET</i> |
| Papilar 2 | Pérdida o hipermetilación de promotor de <i>CDKN2A</i> , mutaciones en <i>SETD2</i> , <i>BAP1</i> , <i>PBRM1</i> , <i>NF2</i> , <i>CUL3</i> , <i>FH</i> , promotor <i>TERT</i> Ganancia cromosomas 7, 12, 16 y 17 |
| Cromóforo | Pérdida de cromosomas 1, 2, 6, 10, 13, 17 y 21, mutaciones <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> |
| Carcinoma conductos colectores | Mutaciones en <i>NF2</i> , <i>SETD2</i> , <i>SMARCB1</i> , <i>FH</i> , <i>CDKN2A</i> |
| Carcinoma medular | Mutaciones en <i>SMARCB1</i> , <i>INI1</i> |
| Carcinoma con translocación MIT | Translocaciones <i>TFE-3</i> , <i>TEF-B</i> |
| Carcinoma no clasificado | <i>NF2</i> , <i>SETD2</i> , <i>BAP1</i> , <i>KMT2C</i> , <i>MTOR</i> , alteraciones vías <i>NF2/Hippo</i> , <i>MOTRC1</i> , daño de cromatina/ADN. |

En el carcinoma renal de células claras la inactivación del gen *VHL*, que ocasiona proteínas *VHL* no funcionantes, es el evento molecular más frecuente. Puede ser debida a VP somáticas o germinales y a hipermetilación del promotor de *VHL*. La proteína *VHL* forma parte del complejo proteico que regula la respuesta a los niveles de oxígeno y hierro en la célula y que incluye la elongina B, la elongina C y la cullina-2, y posee actividad de ubiquitina ligasa E3. En condiciones de normoxia los factores inducibles por la hipoxia alfa (*HIF1α* y *HIF2α*) y beta son hidroxilados en los residuos prolina, donde se une *VHL* y se produce la poliubiquitinación y su degradación. En hipoxemia no se produce la hidroxilación y hay acúmulo de proteínas *HIFα*, que se dimeriza con *HIFβ* en un complejo en el núcleo de la célula con función de factor de transcripción de ARNm que codifica las proteínas eritropoyetina, factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*), el factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante o tumoral α (TGF α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el transportador de glucosa (GLUT1), para recuperar la normoxia. Si las proteínas VHL no son funcionantes se produce una situación de pseudohipoxia, aumenta la actividad del complejo HIF α -HIF β y se transcriben genes de respuesta que favorecen la proliferación tumoral (Figura 1). Agentes antiangiogénicos contra VEGF y PDGF muestran actividad antitumoral en este tipo tumoral (14,27,30).

El carcinoma renal papilar tipo 1 se relaciona con VP activantes del protooncogen *MET* que codifica para un receptor tirosin kinasa del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF). Datos del proyecto *The Cancer Genome Atlas* muestran que casi todos los tumores renales de tipo papilar 1 presentan ganancia del cromosoma 7, donde se localiza el gen *MET*, y el 17% presentan VP en *MET* tanto en línea germinal como somáticas. Como resultado se activan las vías de señalización celular que aumenta el transporte de nutrientes a la célula y las vías de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa – proteína cinasa B (PI3K–AKT1–mTOR) y de las proteínas quinasas RAS, RAF y quinasas activadas por mitógenos (RAS–RAF–MEK1/2–ERK1/2) para el crecimiento y la proliferación tumoral (14,27,31).

En el síndrome HLRCC, las VP en el gen *FH* dan lugar a proteínas FH sin funcionalidad. FH es una enzima que participa en el ciclo de Krebs también llamado ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Figura 2), ruta metabólica anfibólica de catabolismo de glúcidos y lípidos, de anabolismo de precursores de algunos aminoácidos y así como de generación de energía para la célula. La falta de FH activa lleva a disminución del NADH y acúmulo de sus sustratos fumarato y succinato, produciendo succinación de residuos cisteína (2–succínico–cisteína, 2SC), en péptidos y proteínas entre las que se incluye el factor de transcripción Kelch–like ECH–associated protein 1 (KEAP1) y actúan como oncometabolitos además de activar la vía de señalización de la hipoxia a través de HIF1. Se ha observado aumento del estrés oxidativo y activación de las vías del Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 y el elemento de respuesta antioxidante (NRF2–ARE),

metilación de islas CpG del ADN, y aumento de expresión de genes implicados en la glicolisis (Figura 1) (13,14,26,32–35).

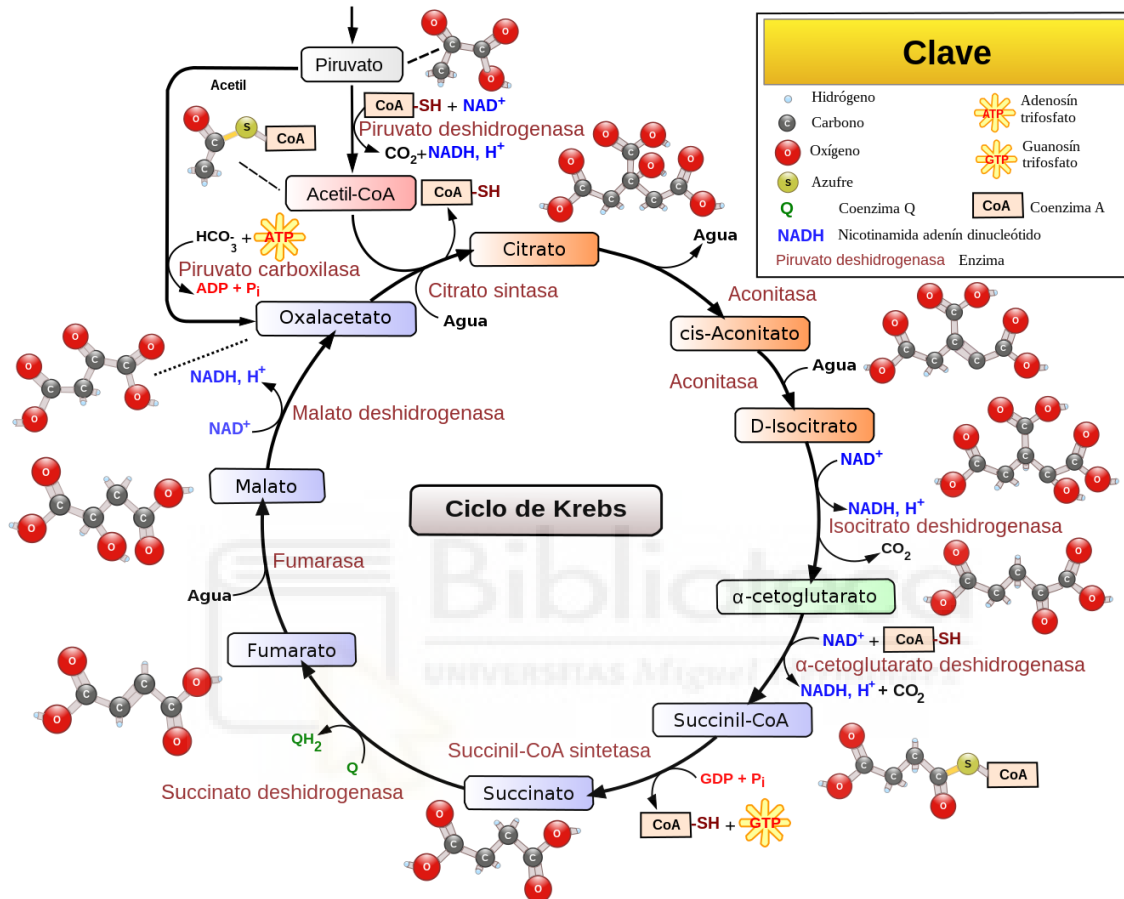


Figura 1. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs.
Wikimedia Commons, the free media repository.

1.3. Diagnóstico de los cánceres renales

La gran mayoría de los tumores renales son hallazgos incidentales a partir de una prueba de imagen realizada por otra indicación. Los síntomas de presentación más frecuentes son la hematuria, dolor en flanco o abdomen, alteraciones digestivas, u otras manifestaciones de enfermedad avanzada metastásica. Las pruebas de imagen diagnósticas son la tomografía computerizada (TC) con contraste y la resonancia magnética (RM) con contraste (7). La ecografía abdominal presenta limitaciones, aunque con el uso de contraste mejora sus resultados (36). La

tomografía por emisión de positrones con Deoxi-2[18F]fluoro-d-glucosa tiene baja sensibilidad, aunque se está investigando su utilidad diagnóstica con otros radiotrazadores (37).

La biopsia percutánea guiada por imagen, ecografía o TC permite el diagnóstico más preciso de las masas renales. Según un metaanálisis, la tasa de diagnóstico para todos los tipos de biopsia renal percutánea es del 92%. La biopsia con aguja gruesa tiene una sensibilidad del 99,1% y una especificidad del 99,7% mientras que la punción con aguja fina tiene una sensibilidad del 93,2% y una especificidad del 89,8% para el diagnóstico de malignidad (38).

1.4. Tratamiento de los cánceres renales

El tratamiento de los tumores renales localizados depende del tamaño del tumor y de la edad del paciente, tras evaluar riesgos y beneficios. En casos de tumores menores de 3 cm se puede optar por la ablación térmica, aunque tiene riesgo de recurrencia y se requiere un seguimiento activo. La nefrectomía radical, laparoscópica o abierta, es la técnica más definitiva y se considera el *gold standard* especialmente en tumores > 4 cm. La nefrectomía parcial es de elección en casos en que se requiera conservar la función renal, por lo que debe ser una decisión individualizada. El seguimiento activo sin intervención puede considerarse en pacientes con lesiones < 2 cm, lesiones quísticas complejas (Tipos 3 y 4 de la clasificación de Bosniak, para lesiones estudiadas mediante TC) o pacientes con riesgo quirúrgico alto, y se debe realizar cada 3-6 meses con ecografía, TC o RM de abdomen durante el primer año y después el intervalo se ajusta según la velocidad de crecimiento o progresión (7,39,40).

En tumores avanzados, la quimioterapia clásica no aporta beneficios. Si se ha demostrado la utilidad de fármacos contra dianas moleculares características de los CR. Los fármacos más efectivos son los dirigidos a bloquear la vía de la angiogénesis, entre los que se encuentran los inhibidores tirosin-kinasa del receptor de VEGF, como son Sunitinib, Pazopanib, Sorafenib o Axitinib, los inhibidores tirosin-kinasa multi-diana, como Cabozantinib y Lenvatinib, y los

inhibidores directos de VEGF como Bevacizumab. También es efectiva la inhibición de la vía de crecimiento y proliferación celular PI3K–AKT1–mTOR, mediante los inhibidores de mTOR, entre los que se encuentran Temsirolimus y Everolimus.

Por otra parte, la observación de que en algunos pacientes con CR metastásico la enfermedad remitía espontáneamente tras extirpar el tumor primitivo llevó a la investigación y el desarrollo de la inmunoterapia, disponiéndose actualmente de fármacos que bloquean los puntos de control proteína de muerte celular programada 1, PD-1, como Nivolumab y Pembrolizumab, el ligando de la proteína de muerte celular programada, PD-L1, como Avelumab, e inhibidores del antígeno 4 del linfocito T citotóxico, CTLA-4, como Ipilimumab entre las opciones de tratamiento (7,40).

1.5. Síndromes de predisposición genética hereditaria a cáncer renal

1.5.1. Síndrome de Von Hippel – Lindau (OMIM 193300)

Su herencia es autosómica dominante, con muy alta penetrancia (> 90% a los 65 años). Se estima una prevalencia de 1/30.000-50.000 hab., con edad media de inicio de las manifestaciones clínicas a los 26 años. Los tumores más característicos de este síndrome son los hemangioblastomas formados a partir de vasos sanguíneos, que aparecen típicamente del sistema nervioso central y retina, y que producen graves complicaciones como pérdida de visión, déficits motores, o ataxia. El tumor maligno más frecuente es el CR, el 25-45% de los afectados a edad media de 37 años y con rango 16-67, especialmente de tipo histológico de células claras. Suelen ser multifocales y bilaterales, con frecuencia asociados a quistes, de bajo grado (Fuhrman 2) y poco invasivos cuando son <3 cm. En estos casos se puede tener una actitud expectante, de vigilancia. Los tumores > 3 cm pueden progresar en grado y capacidad de metástasis, por lo que está indicado tratamiento quirúrgico. También pueden desarrollar feocromocitomas (25-30%), con una edad media de 30 años y paragangliomas (19%). Se han descrito tumores neuroendocrinos de páncreas,

que aparecen a edad media de 38 años. Otras manifestaciones son los quistes renales, quistes pancreáticos y quistes del tracto genital. La identificación de VP en heterocigosis en el gen *VHL*, locus 3p25-26, como causantes de este cuadro fue establecida en 1988 (13,17,41,42). El desarrollo tumoral sigue el modelo de Knudson (18), siendo el primer *hit* la VP germinal heredada y el segundo *hit* la VP somática sufrida por una célula. Portadores homocigotos o doble heterocigotos de variantes en *VHL* desarrollan la policitemia de Chuvash o eritrocitosis familiar tipo 2, de herencia autosómica recesiva. Los individuos desarrollan policitemia, pero ninguna de las manifestaciones del síndrome de Von Hippel – Lindau (42).

La recomendación de diagnóstico precoz del CR consiste en realizar a partir de los 16 años ecografía abdominal anual y RM abdominal cada dos años (42).

1.5.2. Síndrome de Birt – Hogg – Dube (OMIM 135150)

Este síndrome se caracteriza por lesiones cutáneas (84%) como fibrofolículos, tricodiscomas, acrocordones y angiofibromas, por quistes pulmonares (70-85%) que al romperse producen neumotórax espontáneo, y CR múltiples (19-35%). Pueden ser de diversos tipos como cromóforo, de células claras, oncócitos mixtos y papilares, habitualmente antes de los 50 años. Ha sido descrito un incremento moderado de riesgo de melanoma, patología tiroidea (nódulos, quistes, bocio), tumores parotídeos (adenoma, tumor de Warthin, oncocitoma), y pólipos de colon que pueden malignizar a carcinoma de colon. Sigue un patrón de herencia autosómica dominante, su prevalencia es 0,5/100.000 hab. en población europea. Es debido a VP en línea germinal del gen *FLCN*, locus 17p11.2, que codifica la proteína foliculina (FLCN) que participa en vías de señalización celular, activando AMPK y modulando AKT–mTOR (17,41,43–45).

No hay hasta el momento un consenso sobre las recomendaciones de diagnóstico precoz de los tumores renales para este síndrome, aunque por las características de presentación se acepta la realización de RM abdominal anual a partir de los 20 años. En caso de no haber

antecedentes familiares de CR y tras dos o tres exploraciones consecutivas normales, se podría ampliar el intervalo a cada dos años (43,46).

1.5.3. Síndrome de cáncer renal papilar tipo 1 (OMIM 164860)

Se caracteriza por el desarrollo de CR papilar tipo 1, múltiples y bilaterales. Debido a VP activantes del protooncogén *MET*, locus 7q21-31, y que codifica para el receptor tirosin-kinasa, MET, situado en la membrana celular. Su ligando es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La activación de MET produce una cascada de señales para la proliferación y supervivencia celular. La penetrancia es muy alta, casi del 100% a los 80 años. Se puede optar por una actitud expectante como en el síndrome de Von Hippel – Lindau. La herencia es autosómica dominante. Se están realizando ensayos clínicos de tratamientos dirigidos con inhibidores de MET, con resultados muy prometedores (17,41,47).

Como medida de diagnóstico precoz del CR se realiza RM abdominal anual a partir de los 30 años, aunque no hay guías ni consensos de expertos al respecto (46).

1.5.4. Síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario (OMIM 150800)

En 1973, Reed *et al.* (48) describieron dos familias cuyos miembros, en generaciones sucesivas, presentaban leiomiomas cutáneos (LMC) y leiomiomas uterinos (LMU), uno de los individuos afecto de CR a los 20 años de edad, con un patrón de herencia autosómico dominante. A esta entidad se le denominó leiomiomatosis cutánea y uterina múltiple o síndrome de Reed. En 2001, Launonen *et al.* (49) propusieron el término leiomiomatosis y cáncer de células renales hereditarios (*Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*, HLRCC). En 2002, Tomlinson *et al.* (50) demostraron que se debe a VP germinales en heterocigosis en el gen *FH*, que codifica para la

FH. Esta enzima participa en varias vías metabólicas entre las que destaca el ciclo de Krebs (Figura 2), esencial para la producción de energía para la célula. Recientemente se ha establecido un nuevo nombre: síndrome de predisposición tumoral *FH* (51).

Se han propuesto unos criterios clínicos diagnósticos, uno mayor y tres menores.

Criterio mayor:

- Presencia de múltiples LMC, al menos uno confirmado por examen histológico.

Criterios menores:

- Un único LMC e historia familiar de HLRCC.
- CR de tipo papilar 2 a edad temprana.
- LMU múltiples a edad temprana, menor de 40 años.

El diagnóstico definitivo se establece cuando se identifica una variante patogénica en el gen *FH* (33).

En sujetos con mutaciones germinales bialélicas en el gen *FH* se produce la deficiencia grave de FH también denominada aciduria fumárica (OMIM#136850), que es un error innato del metabolismo con patrón de herencia autosómica recesiva. Se caracteriza por encefalopatía neonatal o en la infancia, hipotonía, ataques epilépticos y letargia. Los sujetos tienen rasgos faciales dismórficos (prominencia frontal, ojos separados, puente nasal deprimido y microcefalia) y anomalías del desarrollo sistema nervioso como atrofia cerebral, ausencia de cuerpo calloso, retraso en la mielinización y tronco cerebral pequeño. Pocos individuos llegan a la edad adulta, y la mayoría son incapaces de hablar y deambular. Presentan niveles elevados de ácido fumárico en orina, y la actividad de la FH es generalmente menor del 10%. El diagnóstico se confirma por identificación de la deficiencia de la enzima en fibroblastos, linfoblastos, o en leucocitos y/o estudio del gen *FH* (52).

El asesoramiento genético a los individuos portadores heterocigotos es fundamental no solo por su riesgo individual de desarrollar las patologías asociadas al síndrome HLRCC y sus complicaciones, sino por el riesgo de aciduria fumárica si tienen hijos con otro portador. Siendo una enfermedad rara en general, en áreas geográficas de mayor prevalencia podría darse esta circunstancia.

El gen *FH*, locus 1q43, [NC_000001.11 (241497603..241519755, complement) GRCh38.p14], abarca 22.153 nucleótidos, con una secuencia codificante de 1.533 nucleótidos que codifica para una proteína de 510 aminoácidos con dos dominios funcionales principales: el dominio liasa codificado por los exones 2 a 8 y el dominio fumarasa C codificado por los exones 9 y 10. Sus secuencias de referencia son, para nucleótidos: NM_000143.4 y, para aminoácidos: NP_000134.2 (Figura 3). Este gen codifica dos isoformas de la proteína FH, una localizada en la mitocondria donde cataliza la hidratación de fumarato a l-malato en el ciclo de Krebs, y la otra se localiza en el citosol participando en el ciclo de la urea y en el metabolismo de la arginina (53). En la base de datos *Leiden Open Variation Database* (LOVD) están descritas unas 431 variantes (54), y en la base de datos *ClinVar* se recogen 333 VP, 142 variantes probablemente patogénicas (VPP), 615 variantes de significado desconocido y 123 con conflicto de interpretación. Entre las VP y VPP, 116 tipo *missense*, 108 *frameshift*, 63 *nonsense*, 50 *splicing* y 24 grandes deleciones (55) causantes de HLRCC o aciduria fumárica. También se ha descrito pérdida de FH en tumores esporádicos como feocromocitomas, paragangliomas, carcinoma adrenocortical, sarcomas óseos y tumores de sistema nerviosos central (45).

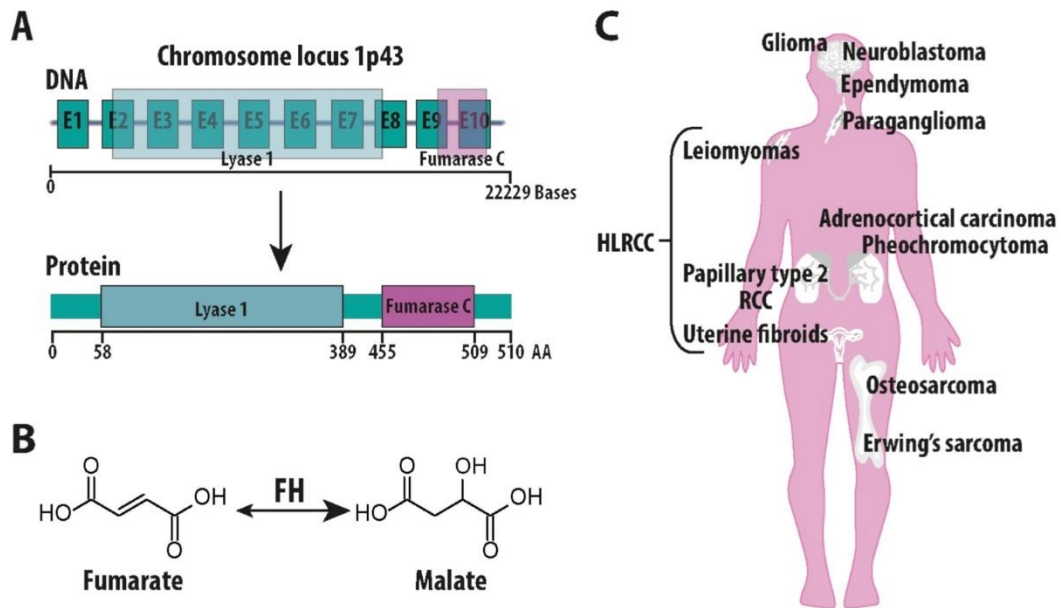


Figura 2. Gen *FH* y proteína FH

A) Representación esquemática del gen *FH* y de la proteína FH. B) Reacción catalizada por FH convirtiendo el fumarato en malato. C) Cánceres y tumores producidos por la pérdida de función de FH: germinal (síndrome HLRCC) y somática (en cánceres esporádicos). De: Schmidt C et al. (2019).

El síndrome HLRCC tiene una alta penetrancia, por sus manifestaciones clínicas características que son los LMC y los LMU, así como los quistes renales (QR) y el CR (17,32,45,50).

Los pacientes con síndrome HLRCC desarrollan LMC aproximadamente en el 71,5-78% de los casos a una edad media de 25 años (56-58). Son lesiones que pueden pasar desapercibidas. Es el dermatólogo el que suele hacer el diagnóstico clínico o por biopsia cuando el paciente consulta ante la aparición de lesiones de color marrón o púrpura, que a menudo son confundidas con lesiones por acné o abscesos persistentes pese a tratamientos tópicos (Figura 4). Aparecen progresivamente, pudiendo aumentar en número, a veces con distribución lineal o coalescentes en placas (56,59,60) y pueden llegar a ser muy molestas, por prurito o dolor que en algunos casos requieren cirugía (Figura 4B) o tratamiento específico por Unidad del Dolor. Se han publicado casos de malignización a leiomiomas cutáneos (57).

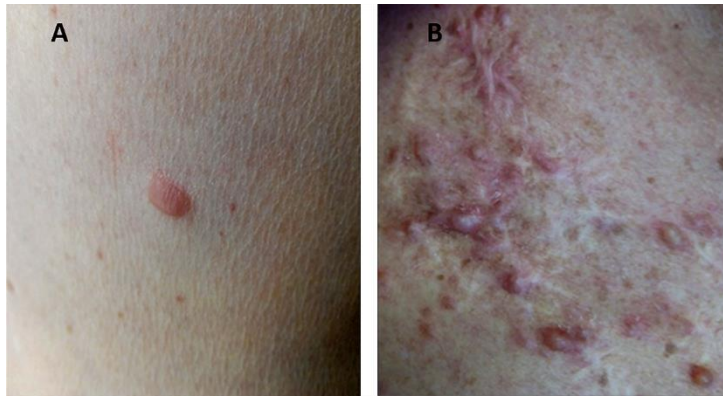


Figura 4. Diferentes presentaciones de leiomiomas cutáneos.

A) Leiomioma cutáneo único. B) Leiomiomas múltiples con cicatrices post-cirugía.

Los LMU aparecen hasta en el 42-83% (56–58) de las mujeres, a edad joven. Suelen ser grandes y numerosos, por lo que sufren dismenorrea y metrorragias abundantes con anemia crónica. Con frecuencia requieren miomectomías múltiples e incluso histerectomía a edad media más joven que los casos esporádicos (<30 vs 45 años, respectivamente), con la consecuente repercusión en su capacidad reproductiva. Se desarrollan en el periodo fértil de la mujer y remiten después de la menopausia (61). Morfológicamente se caracterizan por tener gran celularidad, presencia de células multinucleadas, atipias y núcleo con nucleolo rodeado de un halo, similar a lo observados en el cáncer renal asociado a este síndrome (62). El útero normal sufre cambios cíclicos en la angiogénesis, de forma fisiológica regulado por estrógenos y progestágenos, para poder suministrar hormonas y nutrientes ante un posible embarazo y así garantizar el desarrollo fetal. En los LMU esporádicos se observa mayor expresión de receptores para estrógenos y de progesterona, así como de receptores de factores de crecimiento tirosin-kinasa como EGF, PDGF, IGF, TGFalfa, VEGF, y que activan la cascada de señales de las vías RAS–ERK/MAP-kinasa y PI3K–AKT–mTOR comparando con el miometrio normal (63,64). Además, presentan diferencias en la vascularización, de menor densidad central y mayor acúmulo en la cápsula, pero mayor presencia de factores angiogénicos y respuesta aberrante a la hipoxia (65). Sin embargo, los LMU de mujeres

con HLRCC presentan una mayor densidad de microvasos, están más vascularizados y presentan mayor sobreexpresión de HIF1 y de VEGF, que los leiomiomas esporádicos (66,67), y aumento de la expresión de genes de la glicolisis, de la oxi-reducción y de la homeostasis del metabolismo del hierro (68). Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta por el ginecólogo de cara a prevenir las complicaciones hemorrágicas en el momento de la cirugía. Se han reportado casos de evolución a leiomiosarcomas uterinos, pero recientes revisiones los re-clasifican como leiomiomas atípicos, no malignos (62,69,70).

En el 36% de los individuos con HLRCC se identifican QR, igual que en individuos con otros síndromes de predisposición a CR hereditarios como el síndrome de Von Hippel – Lindau, el complejo de esclerosis tuberosa y el síndrome de Birt – Hogg – Dubé (42,71–73), mientras que en la población general se estima que la prevalencia es 4,6–8,2% (69). Un estudio en ratones deficientes en FH demostró que la formación de QR está mediada por NRF2, pero es independiente de HIF (74). Modelos de quistes benignos en células deficientes en FH y quistes renales de pacientes con HLRCC muestran por tinción inmunohistoquímica (IHQ) positividad para 2SC, y lo que sugiere que dichos quistes son lesiones precursoras de CR (Figura 5) (75,76).

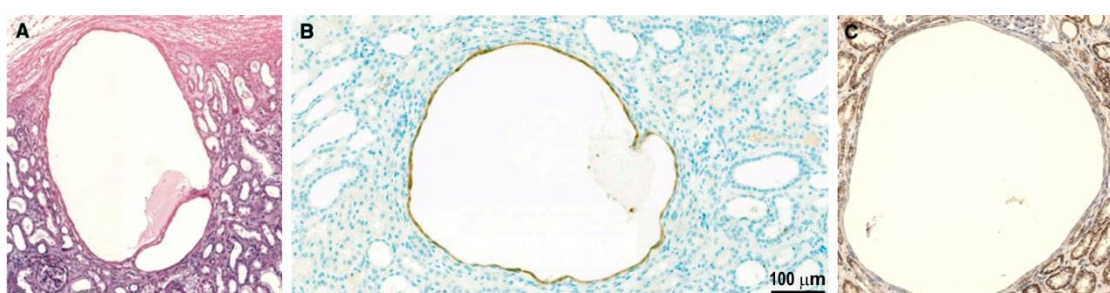


Figura 5. Fotomicrografías de quistes uniloculares revestido por capa unicelular, de paciente con HLRCC.

A) Tinción hematoxilina-eosina, no se observan células tumorales. B) Inmunohistoquímica 2SC positiva. C) Inmunohistoquímica FH negativa. De: Muller M, et al.(2018).

El CR es la manifestación más grave de este síndrome. Según diferentes publicaciones el riesgo de desarrollarlo es de 10-16%, pero a edad más temprana que los casos esporádicos,

habitualmente con mayor agresividad y mal pronóstico vital (13,17,32,41). Varias publicaciones refieren una frecuencia en torno al 20-30%. Sin embargo, son series de pacientes de centros de referencia especializados en la patología, por lo que existiría sesgo de selección de casos (56,77,78). Habitualmente son lesiones únicas, pero también se han descritos casos bilaterales y múltiples

El tipo histológico clásicamente asociado al HLRCC era el carcinoma papilar tipo 2, pero se han descrito otros tipos o patrones como tubulocístico, tubulo-papilar, tubular, de los conductos colectores, oncocítico y células claras (Figura 6). Con frecuencia presentan lesiones quísticas macro o microscópicas asociadas. En las primeras descripciones se remarcaba unas características específicas que lo diferencian del carcinoma papilar tipo 2 habitual (79) recogidas en la Clasificación de Tumores del Sistema Urinario de la OMS de 2016, que como ya se ha dicho incluye el CR asociado a HLRCC como una nueva entidad (código 8311/3) (21). Puede presentarse con características patológicas variables, pero con una arquitectura papilar específica con citoplasma eosinofílico abundante, núcleos grandes, nucleolos muy prominentes, halos perinucleolares y generalmente grado Fuhrman de tres a cuatro (Figura 7) (79,80). Esto subraya la importancia de buscar las características subcelulares en el examen histopatológico y el uso de técnicas IHQ para detectar residuos de 2SC como expresión proteínas succinadas (IHQ positiva) o el déficit de expresión de FH (IHQ negativa), lo que permite confirmar el diagnóstico de esta entidad (Figura 8) (76,81–83). Los QR benignos y los quistes asociados al carcinoma presentan positividad para 2SC (76,83). El estudio genético en tejido tumoral identifica la mutación germinal y la pérdida del segundo alelo (lost of heterozygosity, LOH) simultáneamente en el 90% de los casos, y en algunos CR esporádicos se detectan mutaciones inactivantes somáticas bialélicas de *FH* (17).

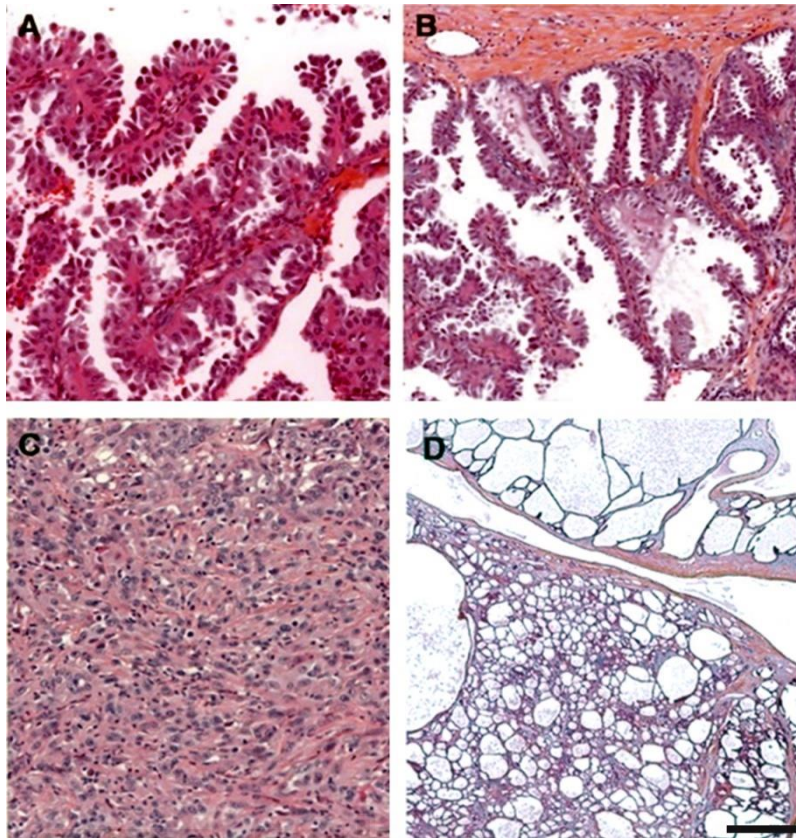


Figura 6. Patrones morfológicos carcinomas renales de HLRCC.

Fotomicrografías (tinción hematoxilina-eosina) de cánceres renales: A) Papilar. B) Túbulo-papilar. C) Sarcomatoide. D) Tubulocístico. De: Muller M, et al. (2018).

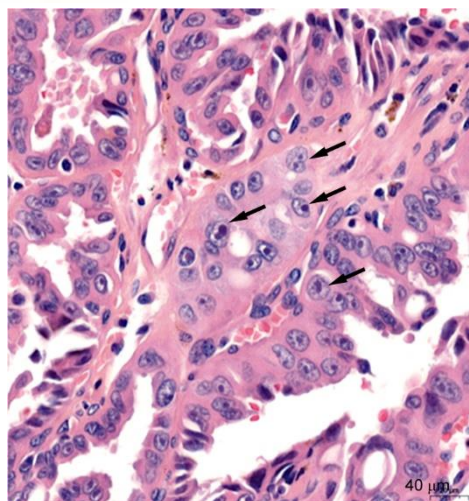


Figura 7. Patrón microscópico de carcinoma renal de paciente con HLRCC.

Fotomicrografía a gran aumento (tinción hematoxilina-eosina). Se observan núcleos eosinofílicos, nucleolos grandes con halo alrededor (flechas). De: Muller M, et al. (2018).

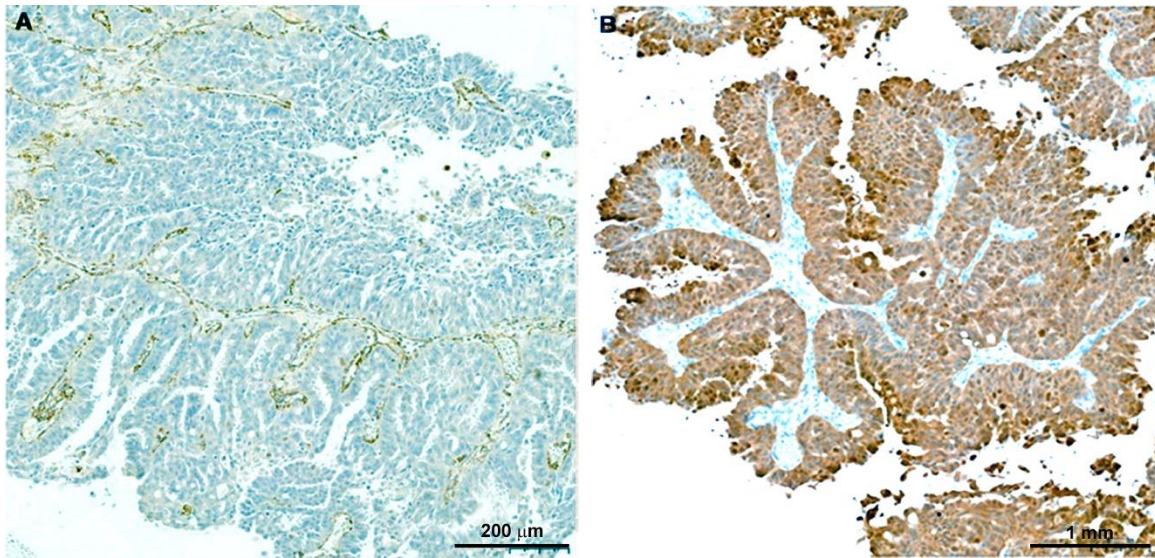


Figura 8. Inmunohistoquímica de carcinoma renal de paciente con HLRCC.

A) Fotomicrografía donde se muestran células tumorales FH inmuno-negativas, mientras que algunas células del estroma no tumorales son FH inmuno-positivas. B) Microfotografía donde se observan células tumorales inmuno-positivas a 2SC. De: Muller M, et al. (2018).

En el Segundo Simposio sobre Leiomiomatosis Hereditaria y Cáncer Renal celebrado en París en 2013, el consenso de expertos recomendó como medida de cribado o diagnóstico precoz la realización de RM renal preferiblemente una vez al año a partir de los 8-10 años, aunque el riesgo es bajo antes de los 20 años (84,85).

Otros tumores que han sido asociados a HLRCC son adenoma y carcinoma corticosuprarrenal, tumor de Wilms, tumor de células de Leydig, GIST, cistadenomas ováricos, feocromocitoma y paraganglioma (57,86,87).

FH es una proteína homotetrámera. Cada subunidad que la forma tiene tres dominios, D1, D2 y D3. El dominio D2 facilita la tetramerización y los dominios D1 (líasa N-terminal) y D3 (fumarasa C-terminal) de diferentes subunidades forman los sitios activos en las cuatro esquinas de la estructura tridimensional de la enzima fumarato hidratasa. Los residuos de aminoácidos 176-193, 228-247 y 359-381, conservados evolutivamente, forman parte de los sitios con actividad

catalítica y de unión al sustrato (Figura 9). Las mutaciones que afectan a estas regiones o a la estructura de la proteína disminuyen o eliminan la actividad enzimática (88–91).

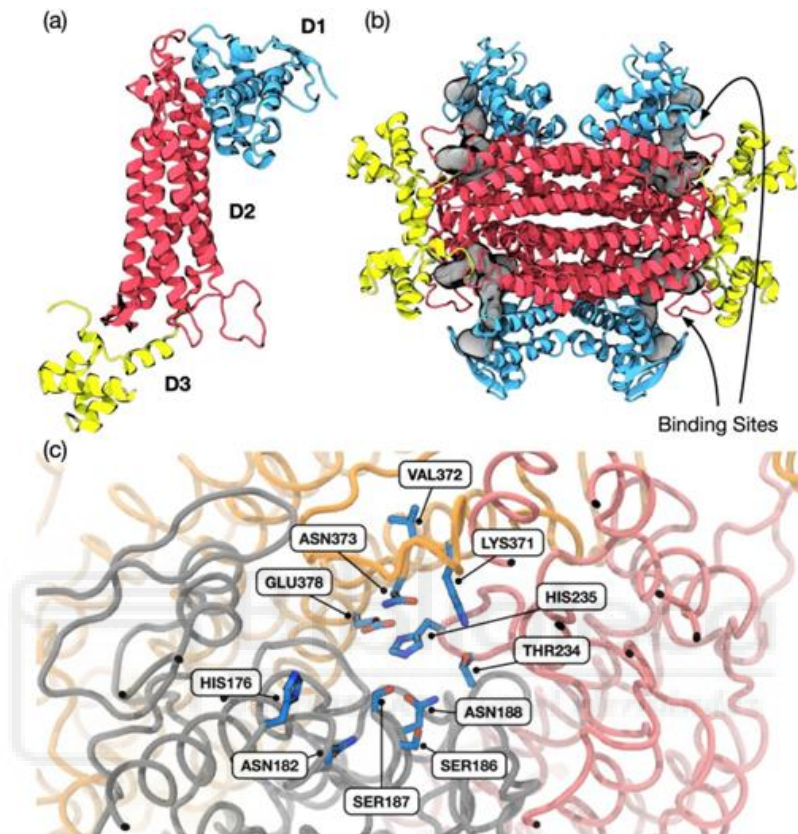


Figura 9. Estructura la enzima FH.

a) Monómero de FH con los distintos dominios D1, N-terminal, D2 y D3, C-terminal. b) Homotetramero ensamblado, sitios activos marcados por flechas. c) Sitio de unión de FH, resaltados los residuos con actividad catalítica. De: Shorthouse D et al. (2021).

La pérdida total de función de FH puede ser letal para las células debido a su papel esencial en el metabolismo celular. Así, si la mutación de la línea germinal genera una pérdida total de la función, como un codón de parada prematuro o grandes reordenamientos, sólo las segundas mutaciones somáticas con una inactivación parcial, como las mutaciones *missense* o *in-frame indel*, tendrán un potencial efecto oncogénico, ya que las células conservan una función

enzimática residual. La pérdida de heterocigosidad se ha descrito como el evento más frecuente de inactivación del segundo alelo en CR y LMU de pacientes con HLRCC (49,62).

Varios mecanismos pueden estar implicados en el desarrollo de los tumores:

- El déficit de FH conlleva a la detención del ciclo de Krebs, con acumulación de fumarato y succinato y disminución de la fosforilación oxidativa. Para compensar esto, se produce un cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica para la producción de energía que aumenta el lactato y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (92). Las ROS y los altos niveles de fumarato inhiben la degradación de HIF α por parte de las PHD dependientes de oxígeno, lo que conduce a una situación de pseudohipoxia (32,82).
- El exceso de fumarato produce succinación de, entre otras proteínas, KEAP1 que da lugar a la regulación al alza de genes de la respuesta antioxidante como *NRF2*, lo que conduce a la proliferación celular (93,94).
- Por otra parte, el fumarato causa la supresión epigenética por hipermetilación de *CDKN2A* que codifica para la ciclina p16, y supresión de la familia de microRNAs antimetastáticos, *MIR200*, lo que lleva a la transición epitelial-mesenquimal, un cambio fenotípico que promueve la iniciación del tumor, la invasión y las metástasis (45,95).

El síndrome HLRCC se considera una enfermedad rara por su baja frecuencia (44,58), y en las publicaciones de casos revisadas hasta el momento de inicio de este proyecto no se ha evidenciado una correlación entre el genotipo y el fenotipo.

2. ASESORAMIENTO Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO

2.1. Asesoramiento genético en cáncer familiar y hereditario

2.1.1. Definición

El asesoramiento genético en cáncer familiar y hereditario es un proceso cuya finalidad es dar la información que permita al individuo comprender cómo la genética contribuye al desarrollo de un determinado tipo de cáncer, las posibilidades de su estudio, las consecuencias médicas para él y sus familiares de los resultados obtenidos, ayudando a su adaptación psicológica y social a la situación (*National Society of Genetic Counselors' Definition*). Esto requiere de la colaboración de un equipo de profesionales sanitarios (enfermera/o, médica/o, psicóloga/o) con habilidades de comunicación especialmente desarrolladas en este campo. Los objetivos primordiales son asegurar que el individuo y familiares entienden correctamente toda la información con las opciones de tratamiento y prevención, valorando el impacto emocional y la necesidad de soporte psicológico. Con todo, el individuo será capaz de dar el consentimiento para la realización del estudio (19).

2.1.2. Marco legal

En España, para garantizar a los individuos el desarrollo del proceso de asesoramiento genético, este está regulado mediante la Ley de Investigaciones Biomédicas (96). En ella se establecen los diferentes aspectos que debe incluir: la indicación del estudio, la información previa, el consentimiento informado, la confidencialidad, protección, acceso y preservación de los datos, así como los requisitos de idoneidad de los profesionales que lo lleven a cabo. En la Comunidad Valenciana, en el año 2005 se puso en marcha el Programa de Consejo Genético en Cáncer regulado mediante la Orden de 5 de junio de 2015 de la Conselleria de Sanitat, que ha sido

modificada por el Decreto 170/2021 de 15 de octubre del Consell, de regulación y organización de la realización de análisis genéticos y biomarcadores moleculares con fines asistenciales (97).

2.1.3. Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana

Tal y como se recoge en la Guía de Práctica Clínica en Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana, el objetivo general del programa de cáncer hereditario es reducir la incidencia y mortalidad por cáncer en aquellas personas con una predisposición genética conocida, ofreciendo asesoramiento a pacientes y a sus familiares de primer grado (98). Este programa incluye los síndromes/genes en los que la identificación de una VP determinante influye en su manejo clínico, es decir que tienen accionabilidad clínica como son el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, el síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar, el síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 y carcinoma medular de tiroides, el síndrome de Von Hippel – Lindau, el síndrome de retinoblastoma hereditario, el síndrome de Cowden, el síndrome de Peutz – Jeghers, el síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 1, el síndrome de feocromocitoma /paraganglioma hereditario y el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario.

Este programa ha obtenido el reconocimiento de Buena Práctica del Sistema Nacional de Salud en la Estrategia en Cáncer, otorgado por el Pleno del Consejo Interterritorial con fecha de 16 de marzo de 2016.

2.1.4. Validez y utilidad clínica del estudio genético en el síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario

La validez clínica indica que la presencia de una variante en un gen se relaciona con el desarrollo o riesgo de desarrollar un tumor. La utilidad clínica del estudio genético de un gen resulta en información para el diagnóstico, tratamiento, o intervención con medidas específicas y

así evitar desarrollo de un cáncer o la gravedad de éste. Su evaluación es importante teniendo en cuenta la gran heterogeneidad y las implicaciones de las diferentes mutaciones.

La validez y utilidad clínica del estudio del gen *FH* ante la sospecha de síndrome HLRCC ha sido demostrada (99):

- El diagnóstico de confirmación del síndrome HLRCC solo puede hacerse mediante estudio genético.
- El manejo clínico cambia según los resultados del estudio genético, estableciendo unas medidas de seguimiento para los individuos portadores encaminadas a la detección precoz de tumores malignos: cáncer renal, leiomiomas.
- El asesoramiento genético es esencial en estas familias por el riesgo de transmisión a su descendencia del síndrome HLRCC, y por el riesgo para su descendencia de Aciduria Fumárica si su pareja fuese también portadora o portador en heterocigosis de una VP en *FH*.

2.1.5. Inclusión del síndrome de leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario en el Programa de Consejo Genético en Cáncer de la Comunidad Valenciana

En nuestra actividad asistencial en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche hemos diagnosticado 26 familias con el síndrome HLRCC entre los años 2009 y 2019, no relacionadas entre sí y con la misma variante patogénica.

Se solicitó la inclusión del síndrome HLRCC en la Cartera de Servicios de la Comunidad Valenciana en 2018, previa aprobación por el Grupo de Asesoramiento en Cáncer Hereditario del Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana. Debe indicarse que el CR asociado, aunque infrecuente, puede tener una alta agresividad, mortalidad y morbilidad, con una importante pérdida de años de vida ya que se desarrolla a edades jóvenes.

La inclusión en el Programa de Cáncer Hereditario permitiría regular el asesoramiento a las familias de forma integral y con la experiencia que ya poseen las UCGC de la Comunidad Valenciana y la realización del estudio genético que en la mayoría de los individuos originarios de la provincia de Alicante sería más sencillo, rápido y barato por encontrarnos ante una VP recurrente. Todo ello redundaría en beneficio para los pacientes y de forma secundaria en ahorro de costes para el Sistema Sanitario.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Justificación

En nuestra actividad asistencial en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche se ha diagnosticado genéticamente a distintas familias no relacionadas de nuestra provincia, a partir del estudio de individuos remitidos por presentar LMC múltiples, con la VP de tipo *missense FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser), causante del síndrome HLRCC. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que fuese una variante con efecto fundador en la población alicantina. En 2016, durante la reunión de los miembros de la Sección de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) de Cáncer Familiar y Hereditario en el Congreso SEOM 2016, se constató que en otras unidades clínicas como la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Instituto Catalán de Oncología de Hospitalet de Llobregat (Barcelona) y la Unidad de Genética Clínica del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (Madrid) también se había realizado diagnóstico genético de otras familias españolas con síndrome HLRCC, lo cual permitiría comparar sus resultados con los nuestros y tratar de esclarecer si la VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) tiene un efecto fundador en población alicantina. Por otra parte, teniendo en cuenta las diferentes repercusiones funcionales que pueden causar las VP que causan pérdida de función de FH frente a las VP que permiten conservarla parcialmente, planteamos la hipótesis de una asociación entre el tipo de VP germinal y el fenotipo clínico del HLRCC.

Se planificó estudiar (i) las características clínicas y genéticas de individuos con síndrome HLRCC, (ii) comparar y valorar diferencias entre familias españolas con diferentes VP, y (iii) estudiar si la VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) es una variante fundadora en la población alicantina. Esto último implicaría que es una situación de endemismo genético, con importantes repercusiones en salud pública sobre las que la Dirección General de Salud Pública, a

través de la Subdirección General de Promoción de la Salud y Prevención y el Servicio del Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana (Programa de Consejo Genético en Cáncer) podría establecer un programa específico de prevención de cáncer renal y otros tumores para esta población. Para ello se realizó un informe para su inclusión en el programa, aprobada por el Grupo de Asesoramiento en Cáncer Hereditario del Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana, pero a fecha de hoy está pendiente de la aprobación definitiva por parte de la Conselleria de Sanitat i Salut Universal.

3.2. Hipótesis planteadas

Hipótesis 1. Los portadores de las variantes patogénicas de tipo *missense* presentan diferencias a nivel de expresividad y penetrancia en el fenotipo clínico asociado al síndrome con respecto a los de portadores de variantes patogénicas de tipo pérdida de función en el gen *FH*.

Hipótesis 2. La variante patogénica recurrente en población alicantina *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) responsable del síndrome HLRCC es una mutación fundadora.

3.3. Objetivos

Objetivo 1: Describir y comparar las características clínicas y genéticas de los sujetos portadores de variantes patogénicas de tipo *missense* y de los portadores de variantes patogénicas de tipo pérdida de función en el gen *FH*.

Objetivo 2: Estudio de haplotipos para la caracterización de la posible variante patogénica fundadora: *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) en las familias ya caracterizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. PACIENTES Y RECOGIDA DE DATOS

Se incluyeron pacientes con criterios clínicos de HLRCC y diagnóstico familiar confirmado mediante estudio genético, así como portadores obligados, entre 2009 y 2019, de 11 diferentes centros españoles.

Los pacientes fueron asesorados e informados de la utilidad del estudio genético, tras lo cual firmaron consentimiento informado para estudio genético y para donación de muestra de ADN excedente para Biobanco (anexos III y IV).

Se creó una base de datos para recoger la información clínica, que incluía las características clínicas del síndrome como la presencia y edad de diagnóstico de LMC, LMU, leiomiomas, QR, CR; también los datos de cirugías realizadas como histerectomía y edad, nefrectomía y edad. De los CR se recogieron los datos de la histología, el estadio tumoral al diagnóstico, el tratamiento médico realizado, la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Se detalló la presencia de otros tumores como adenomas suprarrenales o cánceres de otras localizaciones. Se recogieron datos de la presencia de factores de riesgo para CR como son el tabaquismo (fumador activo o pasivo), la obesidad (definida como IMC > 30 kg/m²), la hipertensión arterial, y si el individuo practicaba actividad física intensa, definida como la realización de actividades deportivas más de 3 días en semana (como posible desencadenante de desarrollo tumoral por demanda aumentada de actividad metabólica y energía). Los CR habían sido confirmados por estudio histopatológico tras exéresis tumoral. Los quistes renales y los adenomas adrenales habían sido diagnosticados mediante pruebas de imagen, como TC, RM o ecografía. Algunos QR fueron confirmados en la pieza quirúrgica de la nefrectomía efectuada debido al CR.

4.1. Detección de variantes patogénicas en línea germinal

Se tomaron muestras de sangre periférica para extracción de ADN y realización de estudio de la secuencia codificante completa del gen *FH* y las uniones intrón-exón mediante amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*) y secuenciación de tipo Sanger para variantes de nucleótidos simples y de tipo inserción/delección. Variantes de tipo variaciones en el número de copias (CNV) fueron analizadas mediante la prueba *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) según el protocolo del fabricante (SALSA MLPA Probemix P198, MRC-Holland, The Netherlands). En algunos centros el estudio se hizo mediante secuenciación masiva de nueva generación (*next-generation sequencing*, NGS) y posterior confirmación de los hallazgos por secuenciación Sanger o por MLPA, dependiendo del tipo de variante, ya que disponían de esta tecnología. Los estudios directos en familiares se realizaron mediante secuenciación Sanger o por MLPA. Las variantes fueron descritas usando la versión actual de la nomenclatura de búsqueda de variantes genómicas humanas (100) teniendo en cuenta como secuencia de referencia de la transcripción (NM_000143.4). El significado clínico de las variantes se evaluó usando los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* ACMG (101). Unas 70 bases de datos genómicas fueron consideradas a través de la herramienta de minería de datos VarSome (102) incluyendo *The FH mutation database* específica para el gen *FH* (55) y ClinVar (103) que proporciona pruebas de las relaciones entre las variaciones genéticas humanas y los fenotipos.

Para la búsqueda de asociaciones genotipo-fenotipo, las VP y VPP (C-4 y C-5) se clasificaron en dos grupos: a) pérdida de función (*Loss of Function*, LOF), que incluye aquellas variantes disruptivas que generarían proteínas truncadas o pérdida de expresión proteica (*nonsense*, *frameshift*, *splicing* y grandes deleciones); y b) variantes *missense* en las que el efecto funcional previsto sería más leve.

4.2. Estudio carácter fundador de la variante patogénica *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser)

4.2.1. Muestras

Se seleccionaron 27 portadores heterocigotos no emparentados de *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) para el estudio de haplotipos. Además, se seleccionaron 20 controles sanos sin cáncer con ausencia confirmada de esta variante como población de control. La extracción de ADN de sangre periférica de todos los pacientes incluidos en el estudio se realizó utilizando un minikit de ADN QIAamp y QIAcube (QIAGEN, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.2.2. Análisis de haplotipos

La construcción de haplotipos se realizó utilizando 38 marcadores polimórficos (marcadores microsatélite y variantes de un solo nucleótido) que flanquean el gen *FH* y abarcan casi 14 Mb. Se seleccionaron de la base de datos MapViewer diez marcadores de microsatélite que cubrían el locus *FH*. Los marcadores microsatélite se seleccionaron en función de los siguientes criterios 1) posición física alrededor del locus *FH*, 2) alta heterocigosidad (>0,5), y 3) inclusión de repeticiones dinucleotídicas.

Además, se seleccionaron 28 variantes de un solo nucleótido localizadas alrededor del locus *FH* y que presentaban una frecuencia alélica en la población europea no finlandesa (GnomAD) de entre 0,25 y 0,75. Se diseñaron amplicones de PCR que incluían más de una variante cuando no se encontraron pruebas de vinculación. Los marcadores seleccionados y su posición genómica se presentan en la Figura 10.

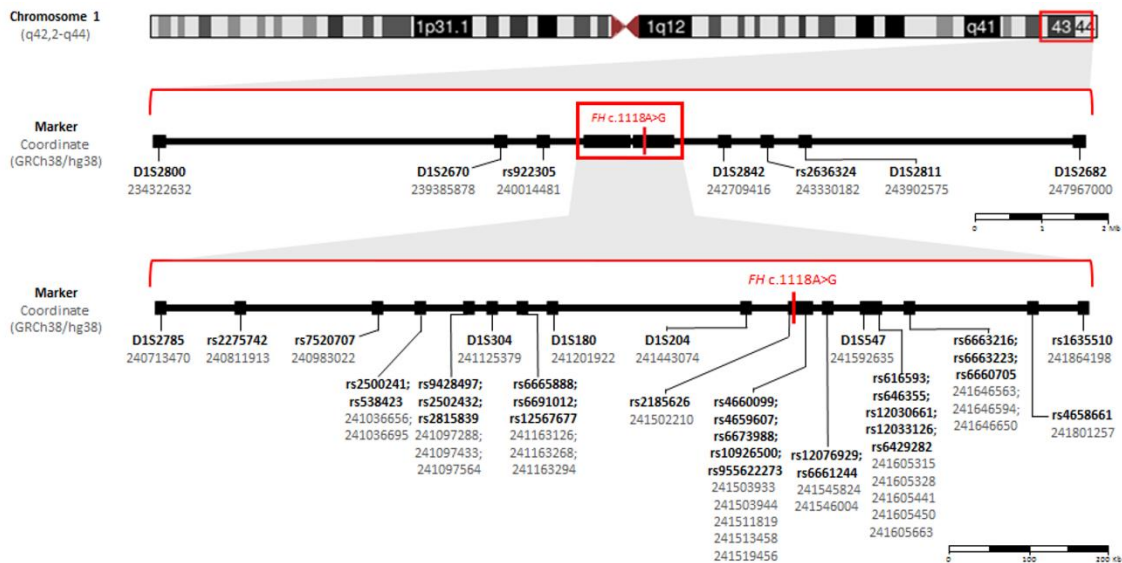


Figura 10. Distribución genética de los 38 marcadores polimórficos que cubren 14 Mb alrededor del locus *FH c.1118A>G*.

Los marcadores genéticos, tanto variantes de un solo nucleótido como *Short Tandem Repeats*, se indican en negro, mientras que su posición genética se indica en gris según GRCh38/hg38. De arriba abajo, cada región genética marcada en rojo se amplía a continuación.

4.2.3. Cálculo del tiempo del ancestro común más reciente (*Time of most recent common ancestor*, TMRCA)

La edad de la mutación se estimó utilizando el método del marcador único basado en el decaimiento esperado del ligamiento, como se informó previamente (104). Las distancias genéticas de Marshfield (cM) y las distancias físicas (Mb) se obtuvieron de las bases de datos Ensembl y UCSC (University of California, Santa Cruz), respectivamente (105,106). La estimación del ancestro común más reciente se realizó asumiendo una media de 25 años entre generaciones.

4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico ha sido realizado usando el software de estadística R versión 3.6.0 (*R Foundation for Statistical Computing*). En el análisis descriptivo, las variables cualitativas se presentan en porcentajes y las variables continuas como media y con desviación estándar (SD) o como mediana y rango intercuartílico (IQR). Las variables categóricas fueron comparadas con los

test de chi-cuadrado, test exacto de Fisher, y regresión logística multivariante. Las Odds ratio (OR) fueron calculadas para estimar la fuerza de la asociación entre las variables. Se utilizaron intervalos de confianza del 95% (CI 95%). Se aceptó el nivel de significación estadística $p = 0.05$. La incidencia acumulada de eventos se estimó con la función de riesgo acumulado. La supervivencia global fue estimada por el método de Kaplan-Meier.

4.4. Aspectos éticos y legales

El presente estudio se ha desarrollado según los principios de la Declaración de Helsinki, última actualización de Fortaleza, Brasil, octubre de 2013 (107).

El tratamiento de los datos generados se hizo según la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, y su normativa de desarrollo (108).

Los pacientes incluidos en el estudio dieron previamente consentimiento informado para la realización del estudio genético, así como consentimiento informado de donación de muestras para fines de investigación, según la normativa de los artículos 48, 51 y 58.2 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (109).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche el 25 de enero de 2018 (código PI 42/2017) (Anexo V).

RESULTADOS

5. SÍNDROME DE LEIOMIOMATOSIS MÚLTIPLE Y CÁNCER RENAL HEREDITARIO EN ESPAÑA.

5.1. Variantes patogénicas en el gen *FH*. Objetivo 1.

Se incluyeron 197 portadores heterocigotos de 27 diferentes VP y VPP (clases 4 y 5 por su significado clínico) en el gen *FH*, 74 casos índice y 123 familiares de 74 familias no relacionadas. Ciento trece mujeres (57,4%) y 84 hombres (42,6%), con edad media de 51,1 años [SD 13,4]. Los tipos de variantes son: 13 *missense*, 5 *frameshift*, 4 grandes deleciones, 3 *splicing* y 2 *nonsense*. Doce (44%) no han sido reportadas previamente en bases de datos (55,102,103) (Tabla 4).



Tabla 4. Clasificación de variantes germinales FH familias HLRCC.

| NM_000143.3(FH) Variante | Cambio en proteína | Consecuencia molecular | localización | GnomAD | ClinVar (22/06/2020) | FH_LOVD | Evidencias de clasificación VarSome ¹ (22/06/2020) | Significado clínico ² | Tipo de variante |
|-----------------------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------|-------------------------|------------------|--|----------------------------------|------------------|
| c.1-?_1533+?del | p.? | Deletion | 1-10 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.133-?_267+?del | p? | Deletion | Exon 2 | nr | nr | | PVS1 | 5 | LoF |
| c.139C>T | p.Gln47Ter | Nonsense | Exon 2 | nr | Patog ** | | PVS1, PM2, PP3, PP5 | 5 | LoF |
| c.267+1_267+10delGTAAGTGCCA | p.? | Splicing | Intron 2 | nr | Patog* | Patog | PVS1, PM2, PP5 | 5 | LoF |
| c.301C>T | p.Arg101Ter | Nonsense | Exon 3 | nr | Patog ** | Prob. Patog. | PVS1, PM2, PP3, PP5 | 5 | LoF |
| c.349G>C | p.Ala117Pro | Missense | Exon 3 | nr | Patog ** | Patog | PS4, PM2, PP1, PP3, PP5 | 4 | Missense |
| c.395delT | p.Leu132Ter | Frameshit | Exon 4 | nr | Patog* | | PVS1, PM2, PP3, PP5 | 5 | LoF |
| c.553delC | p.Gln185ArgfsTer17 | Frameshit | Exon 4 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.555+1G>A | p.? | Splicing | Intron 4 | nr | Prob. Patog.* | Prob. Patog. | PVS1, PM2, PP3, PP5 | 5 | LoF |
| c.563A>G | p.Asn188Ser | Missense | Exon 5 | nr | nr | VED | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense |
| c.575C>T | p.Pro192Leu | Missense | Exon 5 | nr | I. Conflic.* | VED | PM1, PM2, PP1, PP3 | 4 | Missense |
| c.697C>T | p.Arg233Cys | Missense | Exon 5 | nr | Patog ** | Patog/VED | PM1, PM2, PP3, PP5 | 5 | Missense |
| c.698G>A | p.Arg233His | Missense | Exon 5 | 0.000007459 | Patog ** | Patog/VED | PS3, PM5, PP1, PP3, PP5 | 5 | Missense |
| c.703C>T | p.His235Tyr | Missense | Exon 5 | 0.000004065 | Prob. Patog.* | | PM2, PM5, PP1, PP3, PP5 | 4 | Missense |
| c.845G>T | p.Gly282Val | Missense | Exon 6 | nr | nr | Patog/VED | PM2, PP3, PP1, PP5 | 4 | Missense |
| c.893del | p.Ala298ValfsTer31 | Frameshit | Exon 6 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.905-2A>G | p.? | Splicing | Intron 6 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.965T>G | p.Val322Gly | Missense | Exon 7 | 0.000003980 | I. Conflic.* | | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense |
| c.974delG | p.Ser325MetfsTer4 | Frameshit | Exon 7 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.1108-?_1236+?del | p.? | Deletion | Exon 8 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.1112A>G | p.Lys371Arg | Missense | Exon 8 | nr | nr | | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense |
| c.1118A>G | p.Asn373Ser | Missense | Exon 8 | nr | nr | | PS3, PS4, PM2, PP1, PP3, PP5 | 5 | Missense |
| c.1126delC | p.Gln376SerfsTer5 | Frameshit | Exon 8 | nr | I. Conflic.* | Patog/VED | PVS1, PM1, PM2, PP3 | 5 | LoF |
| c.1189G>A | p.Gly397Arg | Missense | Exon 8 | 0.000004222 | Patog ** | Patog/Prob Patog | PS3, PM2, PP3, PP5 | 4 | Missense |
| c.1217A>C | p.Asn406Thr | Missense | Exon 8 | nr | nr | | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense |
| c.1240A>G | p.Lys414Glu | Missense | Exon 9 | nr | nr | | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense |
| c.1237-?_1390+? | p.? | Deletion | Exon 9 | nr | nr | | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF |

nr: no reportada

1: Evidencias de base de datos VarSome: PVS_ : patogénica "very strong"; PS_ : patogénica "strong"; PM_ : patogénica "moderate"; PP_ : patogénica "supporting".

2: Criterios clasificación ACMG. 4: probablemente patogénica; 5: patogénica.

LoF: loss of function, pérdida de función

Patog.: Patogénica; Prob. Patog.: Probablemente Patogénica; I.Conflic.: Interpretación conflictiva

* un único remitente o criterio con interpretaciones conflictivas

** múltiples remitentes, sin conflicto

Tabla 5. Características genotípicas y fenotípicas de las familias con síndrome HLRCC

| Variante | Clase | Tipo de variante | nº familias /nº individuos (hombre; mujer) | LMC* | LMU* | QR* | CR* | Origen |
|-------------------------|-------|------------------|--|--|----------------|----------------|----------------|-------------|
| | | | | <i>Nº individuos afectados/Nº total individuos</i> | | | | |
| Del FH | 5 | LoF | 2/6 (4; 2) | 2/6 | 1/2 | 2/6 | 0/6 | España |
| Del exon 2 | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | España |
| c.139C>T | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | ? | 0/1 | España |
| c.267 + 1_267 + 10del | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | España |
| c.301C>T | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | España |
| c.349G>C | 4 | Missense | 2/3 (1; 2) | 2/2 | 2/2 | ? | 0/3 | España |
| c.395delT | 5 | LoF | 1/16 (5; 11) | 1/15 | 6/10 | 0/14 | 2/16 | España |
| c.553delC | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | ? | ? | España |
| c.555 + 1G>A | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | España |
| c.563A>G | 4 | Missense | 1/2 (1; 1) | 1/2 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | España |
| c.575C>T | 4 | Missense | 4/11 (4; 7) | 11/11 | 7/7 | 5/11 | 0/11 | España |
| c.697C>T | 4 | Missense | 5/10 (5; 5) | 5/9 | 4/4 | 3/6 | 0/6 | España |
| c.698G>A | 5 | Missense | 4/7 (2; 5) | 4/6 | 4/4 | 1/1 | 1/3 | España |
| c.703C>T | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | ? | ? | ? | 0/1 | España |
| c.845G>T | 4 | Missense | 3/6 (2; 4) | 5/5 | 3/4 | 3/4 | 1/5 | España |
| c.893del | 5 | LoF | 1/2 (0; 2) | 2/2 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | España |
| c.905-2A>G | 5 | LoF | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 1/1 | 0/1 | España |
| c.965T>G | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | España |
| c.974delG | 5 | LoF | 1/3 (1; 2) | 1/1 | ? | 0/1 | 1/1 | España |
| Del exon 8 | 5 | LoF | 3/6 (1; 5) | 4/5 | 4/4 | 3/6 | 1/6 | España |
| c.1112A>G | 4 | Missense | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 | Perú |
| c.1118A>G | 5 | Missense | 31/104 (51; 53) | 64/99 | 50/51 | 36/85 | 10/101 | España |
| c.1126delC | 5 | LoF | 1/6 (4; 2) | 5/6 | 2/2 | 0/6 | 0/6 | España |
| c.1189G>A | 4 | Missense | 2/2 (0; 2) | 1/2 | 2/2 | 0/2 | 0/2 | Colombia |
| c.1217A>C | 4 | Missense | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 | Cuba |
| c.1240A>G | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | Bielorrusia |
| Del exon 9 | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | ? | 1/1 | ? | 1/1 | España |
| Total | | | 74/197 (84; 113) | 118/182 (64.8%) | 93/103 (90.3%) | 57/153 (37.3%) | 19/175 (10.9%) | |
| Loss of Function | | | 17/47 (16; 31) | 21/41 (51.2%) | 18/25 (72.0%) | 8/38 (24.8%) | 6/42 (14.3%) | |
| Missense | | | 57/150 (68; 82) | 97/141 (68.8%) | 75/78 (96.1%) | 49/115 (42.6%) | 13/133 (9.8%) | |

HLRCC: síndrome Leiomiomatosis múltiple y cáncer renal hereditario; LMC: leiomiomas cutáneos; LMU: leiomiomas uterinos; QR: quiste renal; CR: cáncer renal; LoF: Loss of Function, pérdida de función; * Información clínica confirmada; ?: sin información.

5.2. Manifestaciones clínicas. Objetivo 1.

Según la repercusión funcional sobre la proteína, 150 individuos presentaban VP y VPP tipo *missense* y 47 VP tipo LoF (Tabla 5). Se describen a continuación las manifestaciones clínicas características de HLRCC.

5.2.1. Leiomiomas cutáneos (LMC)

Ciento dieciocho de los 182 pacientes con examen dermatológico presentaban LMC (64,8%), 69 mujeres (58,5%) y 49 hombres (41,5%). La mediana de edad de diagnóstico fue de 36,2 años, [IQR 28,0-48,3] (Figura 11). La frecuencia de los LMC fue mayor en los individuos portadores de VP y VPP tipo *missense* que en los portadores de VP de tipo LoF (68,8% frente a 51,2%, $p = 0,038$; OR 0,47, [IC del 95%: 0,23-0,96] (Tabla 6). La incidencia acumulada de LMC estratificada por tipo de variante no mostró diferencias significativas (Figura 11). Los análisis univariantes y el análisis de regresión logística multivariante no revelaron diferencias según el sexo, el estado de la presión arterial, exposición a tabaco, la obesidad o la actividad física intensa (Tablas 7 y 8).

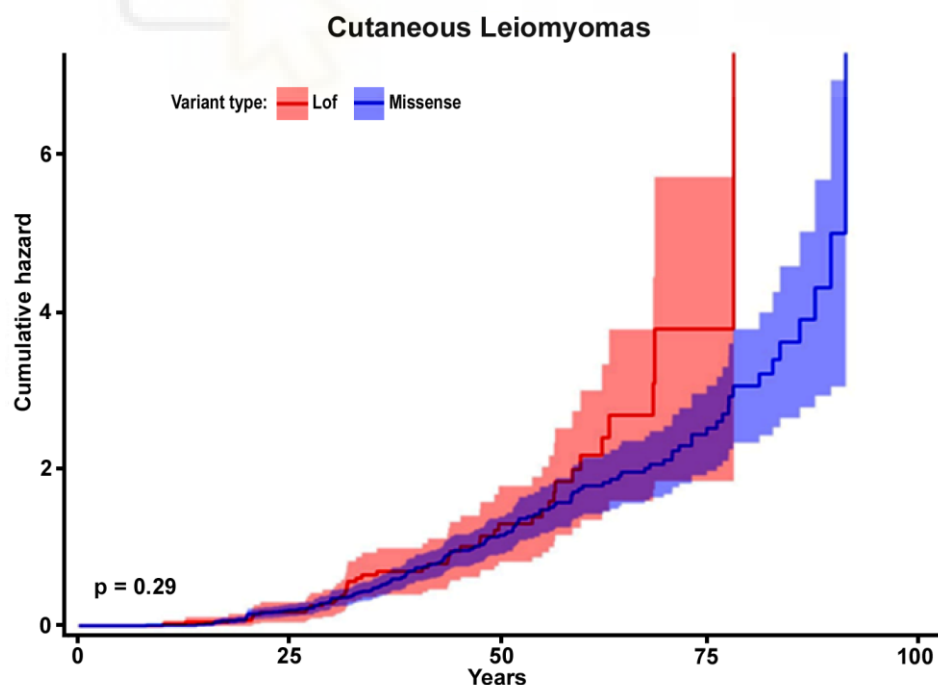


Figura 11. Incidencia acumulada de leiomiomas cutáneos según tipo de variante. Rojo: *loss of function*, Azul: *missense*. Las áreas coloreadas representan los intervalos de confianza.

Tabla 6. Asociaciones fenotipo/genotipo

| Tipo variante | Missense | LoF | OR (IC95%) | p-valor* |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|----------|
| Manifestaciones clínicas | No. afectados/Total (%) | No. afectados/Total (%) | | |
| LMC | 97/141 (68.8) | 21/41 (51.2) | 0.47 (0.23–0.96) | 0.038 |
| LMU | 75/78 (96.1) | 18/25 (72.0) | 0.10 (0.02–0.43) | 0.001 |
| QR | 49/115 (42.6) | 8/38 (21.0) | 0.35 (0.15–0.85) | 0.017 |
| CR | 13/133 (9.7) | 6/42 (14.2) | 1.53 (0.55–4.34) | 0.412 |

LMC, leiomiomas cutáneos; LMU, leiomiomas uterinos; QR, quistes renales; CR, cáncer renal; LoF, loss of function (pérdida de función); OR, odds ratio; IC: intervalo confianza; * X² test.

Tabla 7. Modelo de análisis univariante de las manifestaciones clínicas y factores de riesgo

| Manifestaciones clínicas Variable | LMC | | LMU | | QR | | CR | |
|--------------------------------------|---------------|---------|--------------|---------|---------------|---------|--------------|---------|
| | n (%) | p-valor | n (%) | p-valor | n (%) | p-valor | n (%) | p-valor |
| Tipo variante | | | | | | | | |
| Missense | 97/141 (68.8) | 0.038* | 75/78 (96.1) | 0.001* | 49/115 (42.6) | 0.017* | 13/133 (9.8) | 0.412* |
| LoF | 21/41 (51.2) | | 18/25 (72) | | 8/38 (21) | | 6/42 (14.3) | |
| Sexo | | | | | | | | |
| Hombre | 49/81 (60.5) | 0.272* | - | - | 24/69 (34.8) | 0.566* | 11/79 (14) | 0.236* |
| Mujer | 69/101 (68.3) | | - | | 33/84 (39.3) | | 8/96 (8.3) | |
| Obesidad | | | | | | | | |
| No | 92/149 (61.7) | 0.669* | 71/80 (88.7) | 0.696* | 47/136 (34.5) | 0.058* | 14/148 (9.5) | 1† |
| Si | 10/14 (71.4) | | 8/8 (100) | | 8/12 (66.6) | | 1/13 (7.7) | |
| HTA | | | | | | | | |
| No | 84/132 (63.6) | 0.848* | 67/76 (88.1) | 0.548* | 40/119 (33.6) | 0.156* | 11/129 (8.5) | 1† |
| Si | 19/29 (65.5) | | 10/10 (100) | | 13/27 (48.1) | | 3/30 (10) | |
| Actividad física intensa | | | | | | | | |
| No | 82/136 (60.3) | 0.378* | 67/75 (89.3) | 1† | 44/123 (35.7) | 0.813† | 9/134 (6.7) | 0.126† |
| Si | 10/13 (76.9) | | 5/5 (100) | | 3/11 (27.3) | | 3/13 (23.1) | |
| Tabaco | | | | | | | | |
| No | 59/102 (57.8) | 0.196* | 55/62 (88.7) | 1* | 29/93 (31.2) | 0.076* | 9/102 (8.8) | 0.510* |
| Si | 35/51 (68.6) | | 18/20 (90) | | 21/45 (46.6) | | 6/49 (12.2) | |

LMC: leiomiomas cutaneos; LMU: leiomiomas uterinos; QR: quistes renales; CR: cáncer renal; LoF: Loss of Function, pérdida de función; HTA: hipertensión arterial; *test X²; †test exacto de Fisher.

Tabla 8. Modelo de regresión logística multivariante de las manifestaciones clínicas y factores de riesgo.

| Manifestaciones clínicas | LMC | | LMU | | QR | | CR | |
|---------------------------------|-------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| Variable | OR (95% CI) | p-valor* | OR (95% CI) | p-valor* | OR (95% CI) | p-valor* | OR (95% CI) | p-valor* |
| Tipo variante | | | | | | | | |
| Missense | Ref. | 0,003 | Ref. | 0,004 | Ref. | 0,013 | Ref. | 0,978 |
| LoF | 0,27 (0,11-0,64) | | 0,07 (0,01-0,43) | | 0,23 (0,07-0,64) | | 0,98 (0,23-4,12) | |
| Obesidad | | | | | | | | |
| No | Ref. | 0,801 | Ref. | 0,996 | Ref. | 0,177 | Ref. | 0,896 |
| Si | 1,18 (0,32-4,29) | | Inf (0, inf) | | 2,51 (0,66-9,56) | | 1,16 (0,12-11,45) | |
| HTA | | | | | | | | |
| No | Ref. | 0,836 | Ref. | 0,996 | Ref. | 0,468 | Ref. | 0,968 |
| Si | 1,11 (0,43-2,86) | | Inf (0, inf) | | 1,44 (0,54-3,86) | | 0,97 (0,18-5,19) | |
| Actividad física intensa | | | | | | | | |
| No | Ref. | 0,156 | Ref. | 0,997 | Ref. | 0,804 | Ref. | 0,067 |
| Si | 2,81 (0,67-11,71) | | Inf (0, inf) | | 0,83 (0,19-3,59) | | 4,21 (0,9-19,55) | |
| Tabaco | | | | | | | | |
| No | Ref. | 0,272 | Ref. | 0,77 | Ref. | 0,033 | Ref. | 0,916 |
| Si | 1,55 (0,71-3,40) | | 1,43 (0,13-15,96) | | 2,43 (1,07-5,509) | | 0,93 (0,25-3,5) | |

LMC: leiomiomas cutaneos; LMU: leiomiomas uterinos; QR: quistes renales; CR: cáncer renal; LoF: Loss of Function (perdida de función); OR: Odd Ratio; HTA: hipertensión arterial; ; p-valor obtenido mediante test de Wald.

5.2.2. Leiomiosarcomas cutáneos

Dos casos (1,7%), una mujer y un hombre, desarrollaron leiomiosarcoma cutáneo a la edad de 46 y 56 años, respectivamente. El tratamiento fue quirúrgico curativo en ambos casos.

5.2.3. Leiomiomas uterinos

De las 103 mujeres con examen ginecológico, 93 (90,3%) fueron diagnosticadas de LMU, a una edad media de 30,7 años [IQR 24,9-34,2]. La frecuencia de LMU fue mayor en las mujeres con VP y VPP de tipo *missense* que en las que tenían VP de tipo LoF (96,2% frente a 72%, $p = 0,001$; OR 0,10, [IC95% 0,02-0,43]) (Tabla 6). La incidencia acumulada de LMU estratificada por tipo de variante no mostró diferencias significativas (Figura 12). Los análisis univariantes y la regresión logística multivariante no encontraron diferencias según el estado de la presión arterial, el consumo de tabaco, la obesidad o la realización de actividad física intensa (Tablas 7 y 8). La histerectomía se realizó en el 55,4% de las mujeres, a una edad media de 34,4 años [IQR 32,0-

38,9]. En una paciente de 21 años el diagnóstico patológico fue de leiomioma atípico (1,3%), y recibió radioterapia pélvica después de la cirugía. Una reciente revisión patológica ha confirmado el diagnóstico de leiomioma atípico en este caso.

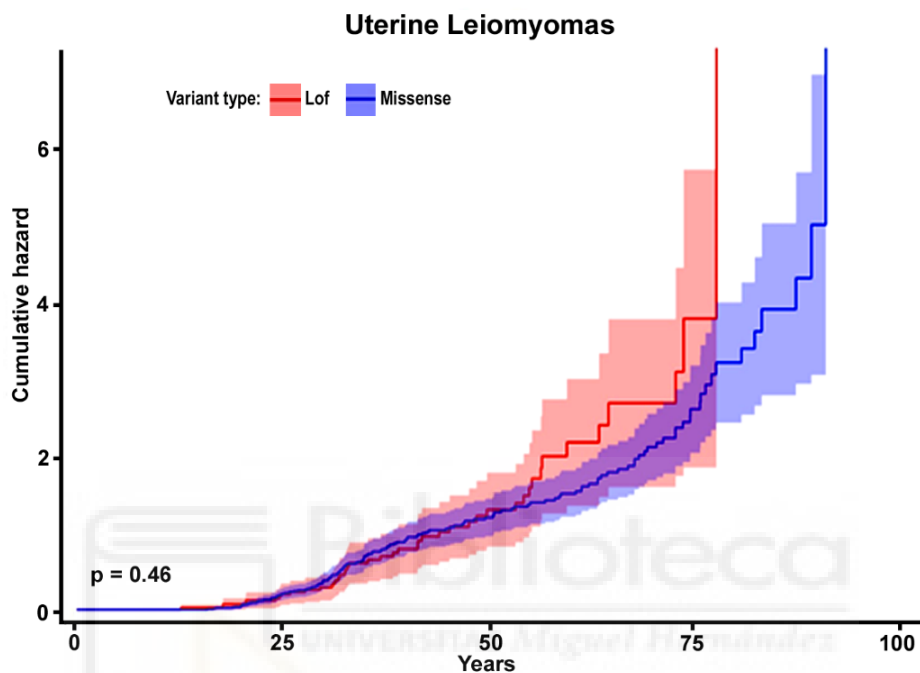


Figura 12. Incidencia acumulada de leiomiomas uterinos según tipo de variante. Rojo: loss of function (LoF), Azul: missense. Las áreas coloreadas representan los intervalos de confianza.

5.2.4. Quistes renales

De 153 pacientes con registros radiológicos, 57 (37,3%) presentaron QR, 33 mujeres (58%) y 24 hombres (42%), con una mediana de edad de 53,3 años (IQR 37,2-62,9). Un paciente operado presentaba un QR de contenido hemorrágico con atipias en el epitelio quístico. La frecuencia fue mayor en los individuos con VP y VPP *missense* que en los con VP LoF (42,6% frente a 21,1%, $p = 0,017$; OR 0,35 [IC95% 0,15-0,85]) (Tabla 6). La incidencia estratificada por tipo de variante no mostró diferencias significativas (Figura 13). El análisis univariante no mostró diferencias en función del sexo, el estado de la presión arterial o la actividad física intensa, pero los sujetos con

consumo de tabaco ($p = 0,076$) y obesidad ($p = 0,058$) mostraron una tendencia a desarrollar QR. La regresión logística multivariante no halló diferencias según el estado de la presión arterial, la obesidad o la actividad física intensa, pero si con el consumo de tabaco (Tablas 7 y 8). Un modelo de regresión logística que incluía el tipo de variante y la exposición al tabaco mostró que los pacientes con variantes LoF tenían menos riesgo de desarrollar QR con la exposición al tabaco en comparación con los pacientes con variantes *missense*, pero esto carecía de significación estadística (OR ajustada 2,05 [IC 95% 0,96-4,39]) (Tabla 9).

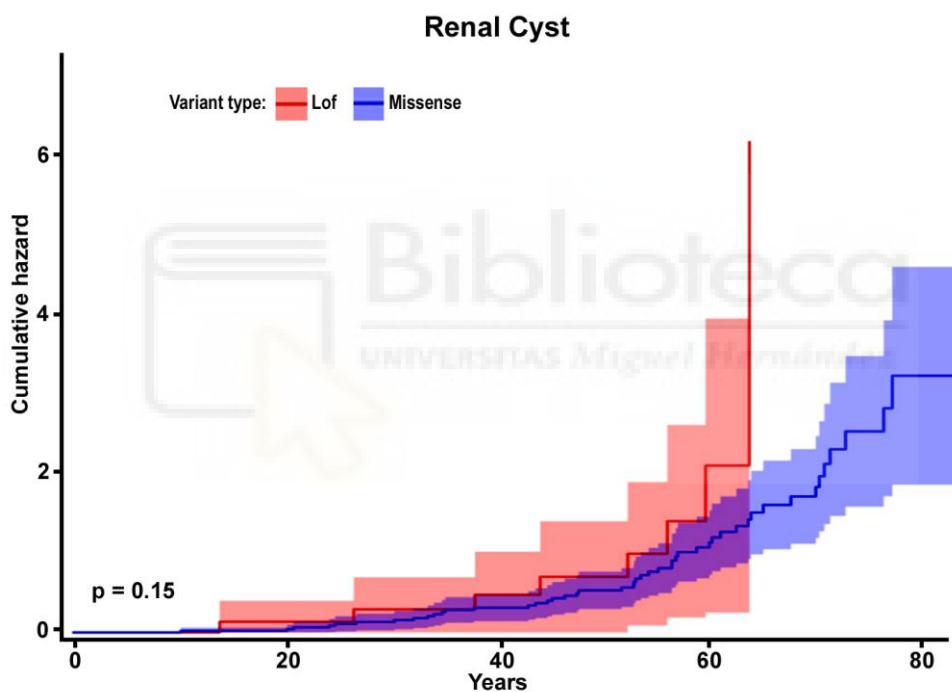


Figura 13. Incidencia acumulada de quistes renales según tipo de variante. Rojo: loss of function; Azul: missense. Las áreas coloreadas representan los intervalos de confianza.

Tabla 9. Modelo de regresión logística multivariante para las variables quistes renales, tipo de variante y tabaco.

| Manifestación clínica | QR | |
|-----------------------|-----------------|----------|
| Variable | OR (95% CI) | p-valor* |
| Tipo variante | | |
| Missense | Ref. | |
| LoF | 0.23(0.08-0.65) | 0.005 |
| Tabaco | | |
| No | Ref. | |
| Si | 2.05(0.96-4.39) | 0.065 |

QR: Quiste Renal; LoF: Loss of Function; OR: Odds Ratio; * Wald's test.

5.2.5. Cánceres renales

De 175 pacientes con información clínica confirmada, 19 presentaban CR (10,9%), 11 hombres y 8 mujeres, 14 eran casos índice. Siete de ellos presentaban también QR. Un paciente fue diagnosticado de dos CR, bilaterales, sincrónicos. La mediana de edad en el momento del diagnóstico fue de 37,4 años ([IQR 30,2-53,2], rango 10-67) (Figura 14). Diez casos eran portadores heterocigotos de la VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser), tres de ellos a una edad muy temprana (un niño a los 10 años, un joven a los 20 años y una mujer con CR bilateral a los 24 años). No se observaron diferencias significativas según el tipo de variante, el sexo, el estado de presión arterial, el consumo de tabaco o la obesidad en el modelo de regresión logística univariante y multivariante, pero los que realizaban una actividad física intensa mostraron una tendencia no significativa a desarrollar CR en el modelo de regresión logística multivariante ($p = 0,067$), (Tablas 7 y 8).

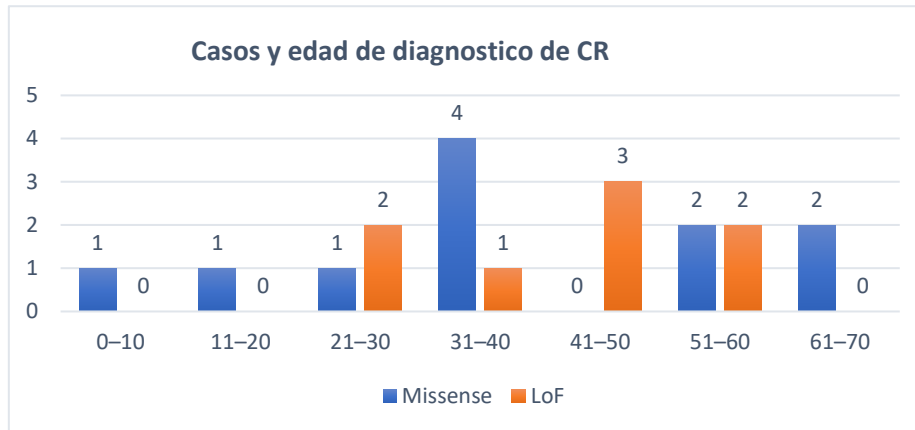


Figura 14. Edad de diagnóstico de cáncer renal y tipo de variante.
CR, cáncer renal.

El diagnóstico histopatológico de los 20 tumores identificó diversos patrones de CR. La morfología papilar fue la más frecuente (n = 14), con 10 casos (50%) de tipo 2 y 4 (20%) de tipo papilar no subclasificados. Cuatro casos (20%) fueron de variedad células claras y 2 (10%) tenían solo el diagnóstico de carcinoma sin más especificaciones (Tabla 10). Siete (35%) de los 20 tumores presentaban componente quístico. Una paciente fue diagnosticada de CR después del estudio genético directo positivo al revisar la prueba de imagen previa en la que presentaba un QR. Según la presentación inicial, 6 fueron clasificados como estadio I, 2 estadio II, 3 estadio III, 4 estadio IV y en 4 pacientes no se disponía de esta información. La mediana de supervivencia global fue de 8,01 años [IC 95%: 4,0-12,8]. En los pacientes con estadios I y II, no se alcanzó la mediana de supervivencia global y la media fue de 15,5 años [IC 95%: 9,6-21,4]. En los pacientes con estadios III y IV, la mediana de supervivencia global fue de 2,9 años [IC 95%: 1,4-4,4] (Figura 15). Un paciente con CR en estadio I tenía un cáncer de vejiga avanzado sincrónico y falleció por este segundo tumor a los 35,9 meses del diagnóstico.

Tabla 10. Variedades histológicas cánceres renales

| Histología | n | % |
|---------------------------|----|-----|
| Papilar tipo 2 | 10 | 50 |
| Papilar sin especificar | 4 | 20 |
| Células claras | 4 | 20 |
| Carcinoma sin especificar | 2 | 10 |
| Total | 20 | 100 |

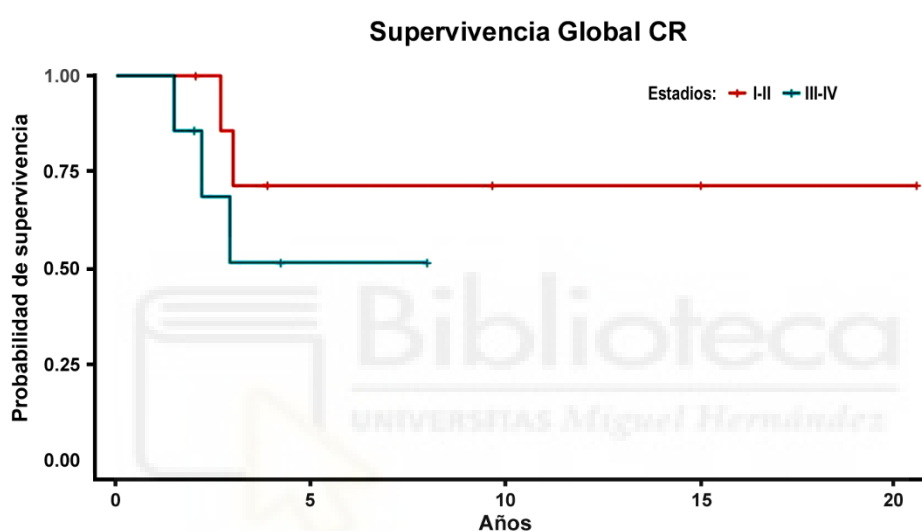


Figura 15. Supervivencia global estimada (Kaplan–Meier) de pacientes con cáncer renal estadios I y II vs. estadios III y IV. CR, cáncer renal.

Siete pacientes que desarrollaron enfermedad metastásica recibieron tratamiento antiangiogénico con y sin inmunoterapia, con una mediana de supervivencia global de 34,9 meses [IC 95%: 29,0-40,9] (Figura 16). De ellos, una paciente con estadio I inicial recidivó y tras recibir estos tratamientos sistémicos falleció a los 32,1 meses. Otros 2 pacientes en estadio III al diagnóstico recidivaron; en una se consiguió remisión completa con inmunoterapia y en el otro

remisión parcial con antiangiogénico. Dos de los 4 pacientes con CR en estadio IV estaban vivos y en tratamiento con antiangiogénico a los 24 y 50,7 meses, respectivamente.

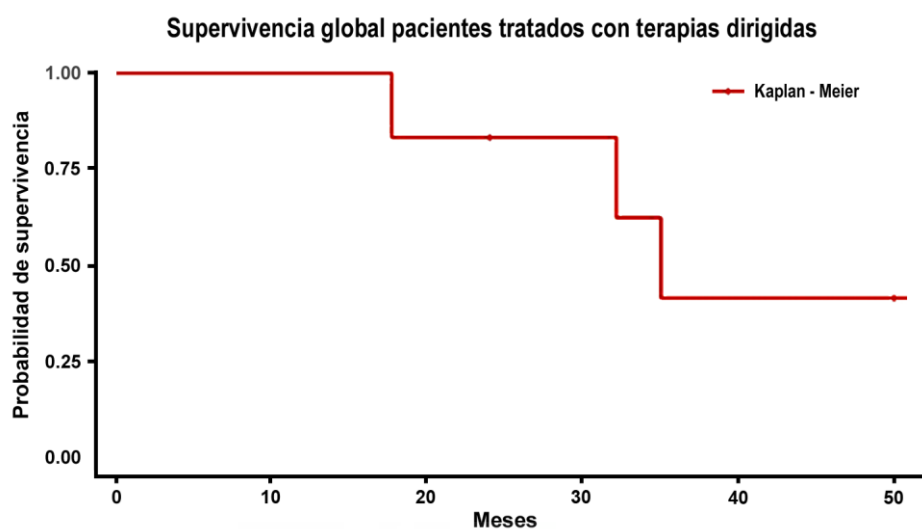


Figura 16. Supervivencia global estimada (Kaplan–Meier) de pacientes con cáncer renal metastásico tratados con terapias dirigidas. CR, cáncer renal.

5.2.6. Otros tumores

Veintisiete (15,8%) de 171 pacientes en los que se disponía de información clínica confirmada, 13 mujeres y 14 hombres, presentaban otras neoplasias. En 153 pacientes se pudo revisar los estudios radiológicos y nueve fueron diagnosticados de adenomas suprarrenales (5,9%), con una mediana de edad de 55,1 años (IQR 46,6-59,8). Los tipos de tumores malignos fueron cinco casos con cáncer de próstata, tres con cáncer de vejiga, dos con cáncer de colon, dos con cáncer de mama, dos carcinomas basocelulares cutáneos, dos carcinomas escamosos cutáneos, dos linfomas no Hodgkin, un melanoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de páncreas y un tumor carcinoide.

6. VARIANTE PATOGENICA FH (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser)

6.1. Estudio carácter fundador. Caracterización de haplotipos. Objetivo 2.

Para la caracterización del haplotipo, se seleccionaron los casos índice de cada familia. Se incluyeron 20 familias de la misma zona geográfica (provincia de Alicante) y siete familias de otras regiones españolas. Además, incluimos 20 controles sanos no emparentados para los cálculos de TMRCAs como portadores de cromosomas no afectados.

El análisis de haplotipos confirmó que las familias compartían un haplotipo común (32/38 marcadores) que abarcaba entre 0,61 y 0,82 Mb (1,40-1,89 cM) (Tablas 11 y 12). Se identificó un haplotipo conservado que co-segregaba con la VP y estaba ausente en los controles sanos. Este resultado sugiere fuertemente que la variante FH (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) es una mutación fundadora, descartando así la hipótesis del punto caliente (*hotspot*) de mutación recurrente.



Tabla 11. Haplotipo común mínimo entre veinte familias portadoras de FH c.1118A>G (variante resaltada en rojo) de la provincia de Alicante

| Proband | D1S2800 | D1S2670 | rs922305 | D1S2785 | rs2275742 | rs7520707 | rs2500241 | rs38423 | rs428497 | rs502432 | rs2815839 | D1S304 | rs665888 | rs691012 | rs1256777 | D1S180 | D1S204 | rs2185626 | FH c.1118A>G | rs460099 | rs4659607 | rs6673988 | rs10926500 | rs955622273 | rs12076929 | rs6661244 | D1S547 | rs616593 | rs46355 | rs12030661 | rs12033126 | rs429282 | rs663216 | rs663223 | rs660705 | D1S2842 | rs2636324 | D1S2811 | D1S2682 |
|------------|---------|---------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|-----------|--------|----------|----------|-----------|--------|--------|-----------|--------------|----------|-----------|-----------|------------|-------------|------------|-----------|--------|----------|---------|------------|------------|----------|----------|----------|----------|---------|-----------|---------|---------|
| Proband 1 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | - | - | 141 | | | | |
| Proband 2 | - - T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | - | - | 141 | | | | |
| Proband 3 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | - | - | - | | | | | |
| Proband 4 | - - - | - | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 5 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 6 | - - T | - | - | - | - | - | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | - | - | - | 141 | | | | |
| Proband 7 | - - - | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 8 | - - T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 9 | - - T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | - | - | | | | |
| Proband 10 | - - - | - | - | G | C | T | A | A | T | 175 | A | - | A | - | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | - | - | | | | |
| Proband 11 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | - | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | - | G | C | C | T | A | A | T | - | - | T | 164 | 141 | | | |
| Proband 12 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | - | - | T | 164 | 141 | | | |
| Proband 13 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | - | - | - | | | | |
| Proband 14 | - 131 - | - | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 15 | - - T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | - | | | | |
| Proband 16 | - T | - | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | - | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | - | - | | | | |
| Proband 17 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 18 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | - | - | - | | | | | |
| Proband 19 | - - - | - | T | - | - | - | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | 229 | T | 164 | 141 | | | | |
| Proband 20 | - 131 T | 170 | T | G | C | T | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | T | - | - | - | | | | | |

Minimum common shared haplotype (0,61-0,82 Mb)

Todos los portadores comparten un haplotipo común de 0,61-0,82 Mb (amarillo), delimitado por los marcadores de microsatélite D1S2785 y D1S2842. El haplotipo mínimo común compartido se señala en la parte inferior con una flecha.

6.2. Características clínicas

En total se analizan los datos de 104 pacientes, pertenecientes a 31 familias diferentes, portadores heterocigotos de la VP *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) de los cuales 31 eran casos índice y 73 familiares. Este grupo incluía 53 mujeres (51%) y 51 hombres (49%) con una edad media de 53,3 (rango, 12-91) años; 94 pacientes de 26 familias procedían de la provincia de Alicante. La prevalencia estimada de HLRCC por la variante fundadora en esta provincia es de 6,26/100.000 habitantes.

6.2.1. Leiomiomas cutáneos

De 99 pacientes con un examen dermatológico, 64 presentaban LMC (64,6%), 36 mujeres, 28 hombres (Figura 18). La edad media del diagnóstico fue de 35,8 años [SD 13,6]. En comparación con los pacientes portadores de VP tipo LoF, la frecuencia de LMC fue mayor en la presente cohorte (Tabla 13). No se detectaron diferencias en función del sexo. A la mayoría de los familiares se les diagnosticó LMC mediante examen dermatológico tras un resultado positivo en las pruebas genéticas. No se detectó ningún caso de leiomiomas cutáneos.

Tabla 13. Correlaciones genotipo-fenotipo por tipo de variante.

| Variante | c.1118A>G | LoF ^{ref} | p-valor* |
|---------------------------------|-----------|--------------------|----------|
| | n(%) | n(%) | |
| Manifestaciones clínicas | | | |
| LMC | 64 (64,6) | 21 (51,2) | 0,138 |
| LMU | 50 (98,0) | 18 (72,0) | 0,002 |
| QR | 36 (42,4) | 8 (21,1) | 0,022 |
| CR | 10 (10,4) | 6 (14,3) | 0,716 |

LoF, loss of function; OR, odds ratio; *, X² test

6.2.2. Leiomiomas uterinos

Cincuenta de las 51 mujeres (98%) que se sometieron a examen ginecológico presentaban LMU, a una edad media de 28,7 años [SD 6,8] (Figura 18). Esta frecuencia fue superior a la detectada en mujeres con VP tipo LoF (Tabla 12). Una paciente fue intervenida mediante histerectomía a los 21 años por un mioma de rápido crecimiento, estableciéndose el diagnóstico anatomopatológico de leiomiosarcoma y por el que recibió tratamiento complementario con radioterapia pélvica. Una nueva revisión patológica reciente ha establecido el diagnóstico de leiomioma atípico, sin características de malignidad o agresividad.

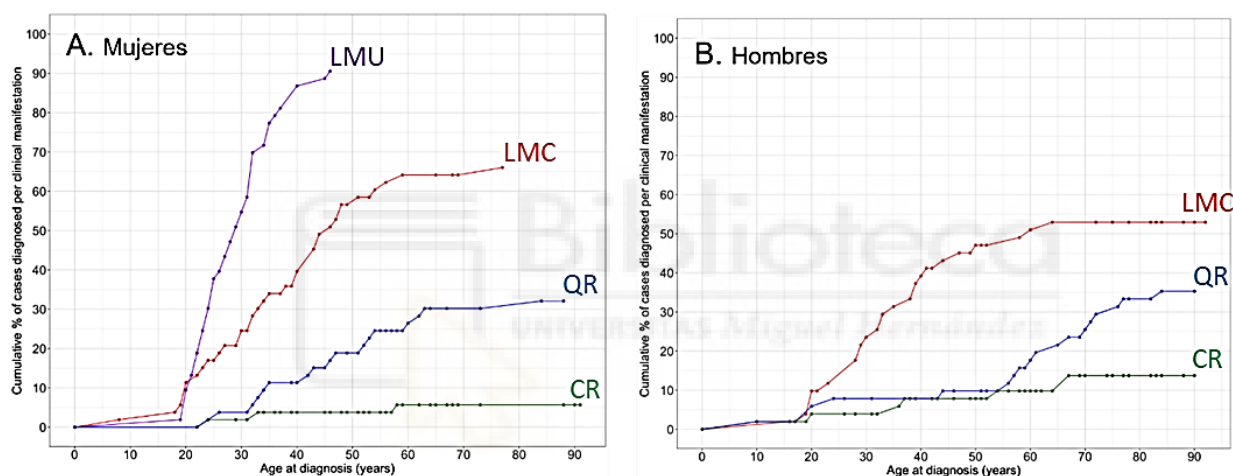


Figura 17. Incidencia acumulada por edad al diagnóstico de las diferentes manifestaciones clínicas en portadores FH c.1118A>G. A) Mujeres y B) Hombres. Leiomiomas uterinos en púrpura (LMU), leiomiomas cutáneos en rojo (LMC), quistes renales en azul (QR), y carcinoma renal en verde (CR).

6.2.3. Quistes renales

Se diagnosticó QR en 36 (42,4%) de los 85 pacientes que se habían sometido a pruebas de imagen (ecografía, TC, RM), 18 (50%) mujeres y 18 (50%) hombres (Figura 17), con una edad media de 50,9 años [SD 19,5]. Estas frecuencias fueron superiores a las observadas en individuos con VP de tipo LoF (Tabla 12). Un paciente fue diagnosticado a los 21 años de una masa renal, por la que

fue intervenido; resultó ser un QR de gran tamaño con contenido hemorrágico y el examen anatomopatológico mostró células atípicas en la pared del quiste.

6.2.4. Cáncer renal

De 96 pacientes con información clínica completa, 10 presentaron un CR (10,4%), siete hombres y tres mujeres. Una mujer presentó dos CR bilaterales y sincrónicos. La mediana de edad en el momento del diagnóstico fue de 40,6 años [SD 20], destacando tres casos con inicio a una edad muy temprana: un niño a los 10 años, un joven a los 20 años y la mujer con CR bilateral a los 24 años (Figura 17). Además del patrón papilar tipo 2, que fue el patrón histológico más frecuente, otros subtipos fueron carcinoma de células claras, carcinoma papilar sin especificar, carcinoma de conductos colectores y carcinoma no clasificado. No hubo diferencias en comparación con los pacientes portadores de las VP de tipo LoF (Tabla 12).



DISCUSIÓN

La HLRCC es un síndrome muy poco frecuente incluido en el catálogo de enfermedades raras de Orphanet (111). La prevalencia es muy baja, 1/200.000 (58). Sin embargo, puede estar subestimada debido a diagnósticos erróneos (112,113). Las principales manifestaciones son LMC y LMU. Las lesiones cutáneas a veces son escasas e individuales, como cicatrices de picaduras o de acné. Además, los fibromas uterinos son relativamente frecuentes en mujeres de mediana edad. Por ello, los profesionales sanitarios no suelen sospechar que los individuos puedan padecer HLRCC.

En la base de datos ClinVar (103) se han notificado un total de 333 variantes patogénicas y 142 variantes probablemente patogénicas de FH causantes de HLRCC o FMRD. Sin embargo, según la base de datos de genoma poblacional gnomAD v3.1.2 la frecuencia de portadores de VP en FH es aproximadamente de 1778 por cada 100.000 individuos (114), lo que denota que el síndrome HLRCC está infradiagnosticado.

El gen FH se localiza en el cromosoma 1q42.1, con 1533 nucleótidos y 10 exones. Codifica dos isoformas de FH, una localizada en la mitocondria que participa en el ciclo TCA catalizando la hidratación del fumarato a l-malato, y otra en el citosol que participa en el ciclo de la urea y en el metabolismo de la arginina (53). Se han descrito alrededor 333 VP y 142 VPP causantes de HLRCC o aciduria fumárica, principalmente VP *missense*, pero también hay variantes *frameshift*, *nonsense*, *splicing* y deleciones (55,102). Aquí describimos 27 variantes causantes de HLRCC, 12 (44%) de las cuales no se habían descrito previamente en bases de datos (103,115). Catorce variantes se clasificaron como VP disruptivas con pérdida de función, denominadas LoF, y 13 eran VP y VPP *missense*.

Las variantes disruptivas (*nonsense*, *frameshift*, *splicing* y grandes reordenamientos) eliminan por completo la función génica proveniente del alelo mutado. Por el contrario, las variantes de tipo *missense* pueden generar una disminución parcial de la actividad enzimática

quedando una funcionalidad residual, que previsiblemente se podría traducir en una menor penetrancia y/o efecto fenotípico menos agresivo. Es esperable que la combinación de la naturaleza de la alteración genética en línea germinal, junto con la naturaleza de la alteración somática subsecuente (*second hit*), determine el efecto global de penetrancia y expresividad. Se ha descrito que la pérdida de heterocigosidad (LoH) de *FH* es la principal alteración genética en tumores de pacientes con mutación germinal de *FH* (69,116). La LoH es una alteración disruptiva que elimina por completo la funcionalidad de alelo alterado. En consecuencia, la naturaleza de la alteración germinal cobraría relevancia para estimar la penetrancia y expresividad del fenotipo clínico asociado. En el presente trabajo, no se ha abordado el estudio de alteraciones a nivel somático, por lo que no tenemos información directa al respecto.

Los LMC son tumores benignos de los músculos *arrector pili*. Estos músculos participan en la termorregulación y en respuesta a emociones fuertes, pero en los humanos su acción se considera un reflejo vestigial. En los pacientes de este estudio, los LMC estaban presentes en el 64,8%, similar a otras series en la literatura (48.6-84%) (57,58,117). Algunos pacientes fueron diagnosticados erróneamente de cicatrices post-acné u otras lesiones cutáneas crónicas, como han descrito previamente varios autores (50,77,78,117). Muchos de los familiares de los casos índice fueron diagnosticados por dermatólogos tras la prueba genética positiva, ya que no eran conscientes de las lesiones. Los pacientes con VP y VPP *missense* presentaron una mayor frecuencia de LMC que aquellos con VP de tipo LoF, lo que hasta ahora no se ha descrito en otras series. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la incidencia acumulada cuando se estratifica por tipo *missense* vs. LoF. Dos pacientes han sido diagnosticados de leiomiomas cutáneos (1,7%), frecuencia baja tal y como se ha publicado (77,118).

Casi todas las mujeres (77-100%) con LHRCC desarrollan LMU, más numerosos, grandes y a una edad más temprana que los casos esporádicos. En nuestra serie, el 90,3% de las mujeres fueron diagnosticadas de LMU a edad similar a la descrita (50,59,70,77,119–122) observándose

una mayor frecuencia en mujeres portadoras de VP y VPP *missense* que en aquellas con VP de tipo LoF, y esto tampoco se había descrito antes. No se ha demostrado diferencias entre tipos de VP en la incidencia acumulada. En algunos casos la miomectomía fue el tratamiento quirúrgico, pero se realizó histerectomía al 55,4% de las mujeres a una edad media de 34,4 años, como el mejor tratamiento para sus síntomas. Los leiomiomas esporádicos se desarrollan durante el periodo reproductivo de la mujer, remitiendo habitualmente tras la menopausia (61), y muestran una mayor expresión de receptores de estrógenos y progesterona y factores angiogénicos HIF en comparación con el miometrio normal (63). Los LMU de pacientes con HLRCC están más vascularizados y muestran más sobreexpresión de HIF1 y VEGF que los leiomiomas esporádicos (66,67). Esto debe ser tenido en cuenta por los ginecólogos para prevenir complicaciones hemorrágicas en el momento de la cirugía. Se ha descrito transformación a leiomiosarcomas, aunque las nuevas directrices diagnósticas clasifican estos tumores como leiomiomas atípicos, no malignos (62,69,77). Una paciente de esta serie fue diagnosticada de leiomiosarcoma uterino a los 21 años, y sobretratada con radioterapia después de la histerectomía.

Se ha establecido la asociación entre QR y CR (71). En el síndrome HLRCC el 36% de pacientes presentan QR, a una edad más temprana que los casos esporádicos (69). El uso de la clasificación de Bosniak para los QR no parece adecuado en estos pacientes debido al mayor riesgo de transformación maligna. En nuestra serie, el 37,3% de los pacientes tenían QR y 7/19 de los CR tenían componentes quísticos confirmados. Los pacientes con VP y VPP *missense* presentaban QR con mayor frecuencia que aquellos con VP de tipo LoF. Esta diferencia no se ha descrito en otras series. No se observaron diferencias en la incidencia acumulada por tipo de variante.

Los CR no son una única enfermedad, sino varias enfermedades diferentes con distintos patrones histológicos y pronósticos, en los que el complejo HIF es la piedra angular de la

patogénesis (26,33), y deben considerarse enfermedades metabólicas. En el síndrome Von Hippel – Lindau y en los CR esporádicos, las mutaciones germinales y somáticas en el gen VHL conducen a la regulación al alza del complejo HIF, con acción pro-angiogénica.

Tanto en el HLRCC como en el síndrome de paraganglioma/feocromocitoma hereditario (causado por mutaciones en los genes del complejo SDH), hay sobreexpresión de HIF en los tejidos tumorales. Ambos síndromes afectan al ciclo de Krebs, y en ambos se produce una inhibición de las hidroxilasas PHD y la consiguiente estabilización de HIF por el fumarato y el succinato acumulados. Sin embargo, debe haber otros mecanismos para explicar las diferentes manifestaciones clínicas (123). El riesgo publicado de desarrollar CR en pacientes con HLRCC es del 15-34%, con una media de edad de 44 años; más frecuente en hombres, generalmente unilateral y diagnosticado en estadios avanzados con una evolución extremadamente agresiva (50,69,77,78,80,84,117,119,120,124,125). En nuestra serie, la tasa fue inferior, del 10,9%. Esta baja tasa podría ser más realista que las publicadas en otras series seleccionadas por el diagnóstico de CR. La mediana de edad en nuestros pacientes es menor (37,4 años), incluyendo cuatro casos menores de 25 años. El tabaquismo, la hipertensión y la obesidad son factores de riesgo establecidos para el CR, que puede reducirse modestamente mediante la actividad física. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas para estos factores en este estudio.

Durante muchos años, el CR papilar tipo 2 se ha asociado específicamente con el síndrome HLRCC, pero diferentes comunicaciones han descrito otros patrones morfológicos como el tubuloquístico, el de conductos colectores y de células claras (en nuestra serie cuatro casos). En la clasificación de la OMS de 2016 de Tumores del Sistema Urinario de la OMS, se propuso el CR asociado a HLRCC (código 8311/3) (21) como una nueva entidad con características patológicas variables, pero con una arquitectura papilar específica con citoplasma eosinófilo abundante, núcleos grandes, nucleolos muy prominentes, halos

perinucleolares y generalmente grado Fuhrman de tres a cuatro. Esto subraya la importancia de buscar características subcelulares en histopatología y el uso de técnicas inmunohistoquímicas para detectar la presencia de residuos de 2SC o la ausencia de FH para evitar diagnósticos erróneos. A diferencia de otras series publicadas, en nuestro estudio la mayoría de los pacientes con CR diagnosticados en estadios I-II tuvieron una supervivencia similar a los casos esporádicos. La media de supervivencia fue superior a la publicada en otra serie (15,5 vs. 7,3 años) (58).

No hay resultados de ensayos clínicos de fase III de tratamiento específico para el cáncer renal asociado a FH, por lo que el tratamiento es igual que para otros tipos de CR, basado en terapia antiangiogénica y de inmunoterapia. Un estudio fase II en pacientes con CR papilar 1 y 2 avanzado o metastásico tratados con Sunitinib como terapia de primera línea alcanzó una mediana de supervivencia global de 17,8 meses para el subtipo 1 (IC 95%: 5,7-26,1) y 12,4 meses para el subtipo 2 (IC 95%: 8,2-14,3) (126). En otro estudio fase II con Bevacizumab y Erlotinib en pacientes con CR asociado a FH y carcinoma papilar esporádico metastásicos la tasa de respuesta global fue del 51% (IC del 95%: 40-61) en todos los pacientes y del 64% (IC del 95%: 49-77) en la cohorte de HLRCC, y la mediana de supervivencia sin progresión fue de 14,2 meses (IC del 95%: 11,4-18,6) en todos los pacientes, y de 21,1 meses (IC del 95%: 15,6-26,6) en los pacientes con HLRCC (127). Varios ensayos en fases iniciales I-II para pacientes con CR asociado a FH se están llevando a cabo (128–130). La inmunoterapia ha mostrado resultados prometedores en pacientes con CR papilar. La combinación de Savolitinib y Durvalumab consiguió una mediana de supervivencia global de 12,3 meses (IC 95% 5,8-21,3) (131). En nuestro estudio, los pacientes con CR metastásicos tratados con antiangiogénicos con o sin inmunoterapia obtuvieron una mediana de supervivencia global de 35 meses.

Las recomendaciones de cribado o diagnóstico precoz de CR en individuos con síndrome HLRCC, consisten en la realización de RM renal preferiblemente una vez al año a partir de los 8-10 años de edad, aunque el riesgo es bajo hasta los 20 años (85,125). El TC también resulta útil,

aunque implica mayor exposición a radiación lo que en la medida de lo posible debería ser evitado. Dados los resultados de este estudio, apoyamos esta recomendación, especialmente en pacientes con la VP FH (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) entre los que se han diagnosticado los casos más jóvenes de CR (a los 10, 20 y 24 años). No se recomienda el cribado sólo con ecografía, ya que las lesiones pueden ser isoecoicas y no detectarse. Por otra parte, los criterios de Bosniak (132) para clasificar los QR por el riesgo de que se malignicen a CR no deberían utilizarse en estos pacientes.

Se ha asociado un mayor riesgo de otros tumores a este síndrome, como adenomas y carcinomas adrenocorticales, tumor de Wilms, tumor de células de Leydig, tumor del estroma gastrointestinal, cistadenomas ováricos, feocromocitomas y paragangliomas (86,87,120). La posibilidad de feocromocitomas y paragangliomas debe tenerse en cuenta en los pacientes con diagnóstico de lesiones de las glándulas suprarrenales detectadas por pruebas de imagen. Hasta la fecha, no se ha diagnosticado ningún caso de feocromocitomas o paragangliomas en nuestra serie, aunque nueve (5,9%) pacientes presentaban lesiones compatibles con adenoma suprarrenal, con una edad media de 55,1 años (rango 46,6-59,8). Los estudios radiológicos reportan una frecuencia de alrededor del 4,5% de este tumor en la población general (133). No se ha observado un aumento de la incidencia de otros tipos de cánceres en este estudio.

La detección de variantes patogénicas recurrentes en una población determinada sugiere la posibilidad de que se trate de una mutación fundadora, que implica que todas las familias que presentan la alteración están genéticamente relacionadas y proceden de un ancestro común. Alternativamente, podría tratarse de un *hotspot* que indicaría que las distintas familias que lo presentan no están genéticamente relacionadas. Para evidenciar si una variante recurrente en una población concreta tiene un efecto fundador, la estrategia metodológica utilizada es el análisis de haplotipos, que consiste en genotipar un conjunto de polimorfismos (SNP y/o microsatélites) con un alto porcentaje de heterocigosidad, que se encuentren

circundando la variante potencialmente fundadora a estudio. Si diferentes individuos portadores de la variante a estudio procedentes de diferentes familias, aparentemente no relacionadas, comparten un haplotipo común de un tamaño significativo, se asume que están genéticamente relacionados y tienen un origen común. El tamaño del haplotipo mínimo común entre diferentes individuos es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde que se generó dicha mutación, ya que hay mayor oportunidad de recombinación en la región que contiene la mutación cuantas más generaciones transcurren desde la generación de la mutación al momento actual. Si el resultado del análisis de haplotipos presenta una gran variabilidad entre diferentes individuos sin identificar un haplotipo común, se rechazaría la hipótesis de mutación fundadora y se asumiría que se trata de eventos mutacionales independientes, probablemente debido a un comportamiento de *hotspot*.

Hemos confirmado un haplotipo común compartido en 27 individuos, de 27 diferentes familias, portadores de la VP FH (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) y probado que en la provincia de Alicante el síndrome HLRCC es frecuente debido al efecto fundador de esta variante, con una prevalencia estimada de 6,33/100.000 habitantes, la mayor reportada hasta el momento. Esta misma VP se ha descrito previamente en pacientes de origen español en otras series publicadas (78,134). Hemos podido datar el evento mutacional entre los años 1370-1720, que en su mayor parte corresponde al periodo histórico de la Edad Moderna en España.

En los portadores de la VP FH (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser), de tipo *missense*, se confirman las mayores frecuencias de LMC, LMU y QR en comparación con los portadores de variantes LoF. Sin embargo, la frecuencia de CR es del 10,9%, una tasa inferior a la de otras series publicadas (12,4% a 34%) (56,58,59,77,117,120). Esta baja tasa puede indicar un riesgo de CR más real que el publicado en otras series de pacientes, en las que habría un sesgo de selección. Sin embargo, 3 pacientes fueron diagnosticados con edad inferior a 25 años. A pesar de la baja frecuencia del cáncer renal, la edad temprana de aparición aconseja el uso de

la RM como procedimiento diagnóstico precoz y se ha demostrado su rentabilidad (41,135). Este grupo representa un modelo *in vivo* único en el que se podrían estudiar las bases metabólicas del desarrollo tumoral, así como el efecto de factores de riesgo externos para el cáncer renal.

No hemos detectado hasta el momento ningún caso de aciduria fumárica en las familias la VP FH (NM_000143.4): c.1118A>G;p.(Asn373Ser).

Como limitaciones de este estudio se podría señalar la falta de información de datos clínicos en algunos individuos y la posible variabilidad en el seguimiento debido a la falta de adherencia a las recomendaciones de diagnóstico precoz, que puede afectar a la precisión en la estimación de los riesgos asociados, especialmente en las manifestaciones clínicas menos graves o llamativas.

La caracterización de una mutación fundadora utilizando un elevado número de portadores es el mejor escenario para la definición de un fenotipo clínico específicamente asociado a dicha alteración, y para el establecimiento más preciso de los riesgos asociados a cada una de las manifestaciones clínicas relacionadas. Además, la alta prevalencia de esta VP fundadora en la población alicantina permite un diagnóstico genético más eficiente en los casos sospechosos de HLRCC, mediante el estudio genético directo.



CONCLUSIONES

Conclusiones correspondientes al objetivo 1

1. Se ha realizado la primera publicación de pacientes con síndrome HLRCC de España, siendo la que mayor número de individuos portadores de VP en el gen *FH* ha reportado.
2. Las manifestaciones son similares a las descritas en otras series, pero hemos encontrado diferencias fenotípicas en los pacientes con mutaciones *missense*, que presentan una mayor frecuencia de LMC, LMU y QR.
3. La frecuencia de CR en esta serie de individuos es inferior a la comunicada en otras series publicadas anteriormente. Se ha analizado la posible influencia de los factores de riesgo establecidos de CR, aspecto que ningún otro grupo ha publicado hasta el momento, aunque dado el pequeño número de casos los resultados no han sido concluyentes.
4. Los QR deben vigilarse estrechamente como posibles precursores de CR, con TC o RM preferiblemente como técnicas de imagen óptimas para la detección precoz de CR.
5. En cuanto a la histopatología el patrón papilar tipo 2 es el más frecuente, pero otros patrones histológicos no excluyen este síndrome.

Conclusiones correspondientes al objetivo 2

6. En la provincia de Alicante existe una alta prevalencia de HLRCC debido a la VP fundadora *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser), confirmada por análisis de haplotipos. Se ha calculado que la VP apareció entre los años 1370 y 1720.
7. Los individuos portadores de esta VP *missense* presentan una mayor frecuencia de LMC, LMU y QR en comparación con las frecuencias descritas en otros individuos portadores de VP tipo LoF. Sin embargo, la frecuencia de CR es inferior.
8. En individuos con sospecha de HLRCC de la provincia de Alicante, el test genético mediante análisis directo de la VP fundadora *FH* (NM_000143.4): c.1118A>G; p.(Asn373Ser) puede ser una herramienta diagnóstica más rápida y eficiente en comparación con la secuenciación completa del gen.

9. Es muy importante ofrecer asesoramiento genético a los portadores heterocigotos de VP en el gen *FH* sobre el riesgo de padecer CR, leiomiomas y sus complicaciones, así como el riesgo de aciduria fumárica en su descendencia si su pareja fuera también portadora o portador heterocigoto.
10. Alertar a los profesionales sanitarios como los médicos de familia, dermatólogos, ginecólogos, neurólogos, radiólogos, patólogos o urólogos es importante para un diagnóstico precoz y correcto de este síndrome.



REFERENCIAS

1. Cancer today [Internet]. [citado 15 de mayo de 2022]. <http://gco.iarc.fr/today/home>
2. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 15 de mayo de 2022]. <https://gco.iarc.fr/>
3. Cancer Tomorrow [Internet]. [citado 12 de diciembre de 2022]. https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=39&populations=908&single_unit=500000
4. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2022. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2022
5. Proyectos | Redecan [Internet]. [citado 10 de julio de 2022]. <https://redcan.org/es/proyectos/14/estimaciones-de-la-incidencia-del-cancer-en-espana-2022>
6. 2022 - Estimación de la incidencia de cáncer en España.pdf [Internet]. [citado 15 de mayo de 2022]. <https://redcan.org/storage/documents/873877e1-af1b-43fe-8d97-0ee1434fe261.pdf>
7. Correa AF, Lane BR, Rini BI, Uzzo RG. *Cancer of the Kidney*. En: De Vita Jr. VT, Lawrence TS y Rosenberg SA, editores. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 11a ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019. p.1826-1862
8. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 29 de octubre de 2018 [citado 15 de mayo de 2022]; <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2018.79.1905>
9. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114:101-8.
10. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*. 2016;70:458-66.
11. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet*. 2008;371:569-78.
12. Huang K lin, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell*. 2018;173:355-370.e14.
13. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary Kidney Cancer Syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21:81-90.
14. Linehan WM, Schmidt LS, Crooks DR, Wei D, Srinivasan R, Lang M, et al. The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discov*. 2019;9:1006-21.

15. Carlo MI, Mukherjee S, Mandelker D, Vijai J, Kemel Y, Zhang L, et al. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2018;4:1228-35.
16. Shuch B, Zhang J. Genetic Predisposition to Renal Cell Carcinoma: Implications for Counseling, Testing, Screening, and Management. *J Clin Oncol.* 2018;36:3560-6.
17. Carlo MI, Hakimi AA, Stewart GD, Bratslavsky G, Brugarolas J, Chen YB, et al. Familial Kidney Cancer: Implications of New Syndromes and Molecular Insights. *Eur Urol.* 2019;76:754-64.
18. Chernoff J. The two-hit theory hits 50. *Mol Biol Cell.* 2021;32:rt1.
19. Robles-Díaz L, Lastra-Aras E. *El consejo genético como proceso y la comunicación*. En: 3ª edición Libro SEOM de Cáncer Hereditario - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [citado 3 de enero de 2023]. <https://seom.org/publicaciones/publicaciones-seom/cancer-hereditario/207453-3-edicion-libro-seom-de-cancer-hereditario>.
20. Resta R, Biesecker BB, Bennett RL, Blum S, Estabrooks Hahn S, Strecker MN, et al. A New Definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force Report. *J Genet Couns.* 2006;15:77-83.
21. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70:93-105.
22. Williamson SR, Gill AJ, Argani P, Chen YB, Egevad L, Kristiansen G, et al. Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference On Molecular Pathology Of Urogenital Cancers. III. Molecular Pathology of Kidney Cancer. *Am J Surg Pathol.* julio de 2020;44:e47-65.
23. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019;30:706-20.
24. Signoretti S, Flaifel A, Chen YB, Reuter VE. Renal Cell Carcinoma in the Era of Precision Medicine: From Molecular Pathology to Tissue-Based Biomarkers. *J Clin Oncol.* 2018;36:3553-9.
25. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013;499:43-9.
26. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2016;374:135-45.
27. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology [Internet]. *F1000Research*; 2018 [citado 9 de diciembre de 2022]. <https://f1000research.com/articles/7-307>
28. Huang JJ, Hsieh JJ. The Pan-Omics Landscape of Renal Cell Carcinoma and Its Implication on Future Clinical Practice. *Kidney Cancer.* 2020;4:121-9.

29. Hsieh JJ, Le V, Cao D, Cheng EH, Creighton CJ. Genomic classifications of renal cell carcinoma: a critical step towards the future application of personalized kidney cancer care with pan-omics precision: Categorical classification of renal cell carcinoma by integrated-omics. *J Pathol*. 2018;244:525-37.
30. Chappell JC, Payne LB, Rathmell WK. Hypoxia, angiogenesis, and metabolism in the hereditary kidney cancers. *J Clin Invest*. 2019;129:442-51.
31. The Cancer Genome Atlas - Cancers Selected for Study - NCI [Internet]. 2018 [citado 3 de noviembre de 2022]. <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/studied-cancers>
32. Linehan WM, Ricketts CJ. The metabolic basis of kidney cancer. *Semin Cancer Biol*. 2013;23:46-55.
33. Schmidt LS, Linehan WM. Genetic predisposition to kidney cancer. *Semin Oncol*. 2016;43:566-74.
34. Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol* [Internet]. 2012 [citado 3 de julio de 2022];2. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00085/abstract>
35. Zheng L, Cardaci S, Jerby L, MacKenzie ED, Sciacovelli M, Johnson TI, et al. Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nat Commun*. 2015;6:6001.
36. Runtemund J, Rübenthaler J, von Münchhausen N, Ingenerf M, Grawe F, Biechele G, et al. Diagnostic Workup for Patients with Solid Renal Masses: A Cost-Effectiveness Analysis. *Cancers*. 2022;14:2235.
37. Urso L, Castello A, Rocca GC, Lancia F, Panareo S, Cittanti C, et al. Role of PSMA-ligands imaging in Renal Cell Carcinoma management: current status and future perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022;148:1299-311.
38. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol*. 2016;69:660-73.
39. Ballard BD, Guzman N. Renal Mass. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 3 de diciembre de 2022]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567761/>
40. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernández-Pello S, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol*. 2019;75:799-810.
41. Maher ER. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol*. 2018;36:1891-8.
42. van Leeuwen RS, Ahmad S, Links TP, Giles RH. Von Hippel-Lindau Syndrome. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 3 de abril de 2022]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1463/>

43. Sattler EC, Steinlein OK. Birt-Hogg-Dubé Syndrome. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 3 de abril de 2022]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1522/>
44. RESERVED IUAR. Orphanet: Education [Internet]. [citado 7 de junio de 2022]. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education.php?lng=EN>
45. Schmidt C, Sciacovelli M, Frezza C. Fumarate hydratase in cancer: A multifaceted tumour suppressor. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98:15-25.
46. Freifeld Y, Ananthakrishnan L, Margulis V. Imaging for Screening and Surveillance of Patients with Hereditary Forms of Renal Cell Carcinoma. *Curr Urol Rep.* 2018;19(10):82.
47. Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, Firuzi O. HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019;56:533-66.
48. Reed WB, Walker R, Horowitz R. Cutaneous leiomyomata with uterine leiomyomata. *Acta Derm Venereol.* 1973;53:409-16.
49. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:3387-92.
50. Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EEM, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30:406-10.
51. Kamihara J, Schultz KA, Rana HQ. FH Tumor Predisposition Syndrome. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 3 de abril de 2022]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1252/>
52. Coman D, Kranc KR, Christodoulou J. Fumarate Hydratase Deficiency. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 3 de abril de 2022]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1506/>
53. Dik E, Naamati A, Asraf H, Lehming N, Pines O. Human Fumarate Hydratase Is Dual Localized by an Alternative Transcription Initiation Mechanism. *Traffic.* 2016;17:720-32.
54. The FH gene homepage - Global Variome shared LOVD [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2022]. <https://databases.lovd.nl/shared/genes/FH>
55. Bayley JP, Launonen V, Tomlinson IPM. The FH mutation database: an online database of fumarate hydratase mutations involved in the MCUL (HLRCC) tumor syndrome and congenital fumarase deficiency. *BMC Med Genet.* 2008;9:20.
56. Chayed Z, Kristensen LK, Ousager LB, Rønlund K, Bygum A. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma: a case series and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16:34.
57. Muller M, Ferlicot S, Guillaud-Bataille M, Le Teuff G, Genestie C, Deveaux S, et al. Reassessing the clinical spectrum associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell

- carcinoma syndrome in French *FH* mutation carriers: MULLER et al. *Clin Genet*. 2017;92:606-15.
58. Forde C, Lim DHK, Alwan Y, Burghel G, Butland L, Cleaver R, et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer: Clinical, Molecular, and Screening Features in a Cohort of 185 Affected Individuals. *Eur Urol Oncol*. 2020;3:764-72.
 59. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, Tyrer JP, Calonje E, Manek S, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. *Arch Dermatol*. 2005;141:199-206.
 60. Berendes U, Kühner A, Schnyder UW. Segmentary and disseminated lesions in multiple hereditary cutaneous leiomyoma. *Humangenetik*. 1971;13:81-2.
 61. Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22:571-88.
 62. Sanz-Ortega J, Vocke C, Stratton P, Linehan WM, Merino MJ. Morphologic and Molecular Characteristics of Uterine Leiomyomas in Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cancer (HLRCC) Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:74-80.
 63. Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science*. 2005;308:1589-92.
 64. Ciarmela P, Islam MdS, Reis FM, Gray PC, Bloise E, Petraglia F, et al. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2011;17:772-90.
 65. Commandeur AE, Styer AK, Teixeira JM. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Hum Reprod Update*. 2015;21:593-615.
 66. Tal R, Segars JH. The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. *Hum Reprod Update*. 2014;20:194-216.
 67. Pollard P, Wortham N, Barclay E, Alam A, Elia G, Manek S, et al. Evidence of increased microvessel density and activation of the hypoxia pathway in tumours from the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *J Pathol*. 2005;205:41-9.
 68. Vanharanta S, Pollard PJ, Lehtonen HJ, Laiho P, Sjöberg J, Leminen A, et al. Distinct expression profile in fumarate-hydratase-deficient uterine fibroids. *Hum Mol Genet*. 2006;15:97-103.
 69. Lehtonen HJ. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet*. 2006;43:523-6.
 70. Lehtonen HJ. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: update on clinical and molecular characteristics. *Fam Cancer*. 2011;10:397-411.
 71. Bonsib SM. Renal Cystic Diseases and Renal Neoplasms: A Mini-Review. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1998-2007.

72. Henske EP, Cornejo KM, Wu CL. Renal Cell Carcinoma in Tuberous Sclerosis Complex. *Genes*. 2021;12:1585.
73. Degheili JA, Tanios B, Nasser M. Renal and Lung Cysts in Birt-Hogg-Dubé Syndrome: A Continuum of the Same Disorder. *Cureus*. 2021;13:e18878.
74. Adam J, Yang M, Bauerschmidt C, Kitagawa M, O'Flaherty L, Maheswaran P, et al. A Role for Cytosolic Fumarate Hydratase in Urea Cycle Metabolism and Renal Neoplasia. *Cell Rep*. 2013;3:1440-8.
75. Ristau BT, Kamat SN, Tarin TV. Abnormal Cystic Tumor in a Patient with Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome: Evidence of a Precursor Lesion? *Case Rep Urol*. 2015;2015:303872.
76. Muller M, Guillaud-Bataille M, Salleron J, Genestie C, Deveaux S, Slama A, et al. Pattern multiplicity and fumarate hydratase (FH)/S-(2-succino)-cysteine (2SC) staining but not eosinophilic nucleoli with perinucleolar halos differentiate hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma-associated renal cell carcinomas from kidney tumors without FH gene alteration. *Mod Pathol*. 2018;31:974-83.
77. Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML, et al. Mutations in the Fumarate Hydratase Gene Cause Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer in Families in North America. *Am J Hum Genet*. 2003;73:95-106.
78. Gardie B, Remenieras A, Kattygnarath D, Bombled J, Lefevre S, Perrier-Trudova V, et al. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J Med Genet*. 2011;48:226-34.
79. Kiuru M, Launonen V, Hietala M, Aittomäki K, Vierimaa O, Salovaara R, et al. Familial Cutaneous Leiomyomatosis Is a Two-Hit Condition Associated with Renal Cell Cancer of Characteristic Histopathology. *Am J Pathol*. 2001;159:825-9.
80. Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, Marston Linehan W. The Morphologic Spectrum of Kidney Tumors in Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma (HLRCC) Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:1578-85.
81. Bardella C, El-Bahrawy M, Frizzell N, Adam J, Ternette N, Hatipoglu E, et al. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status: Aberrant succination of proteins in FH-deficient cells. *J Pathol*. 2011;225:4-11.
82. Yang M, Ternette N, Su H, Dabiri R, Kessler B, Adam J, et al. The Succinated Proteome of FH-Mutant Tumours. *Metabolites*. 2014;4(3):640-54.
83. Udager AM, Alva A, Chen YB, Siddiqui J, Lagstein A, Tickoo SK, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC): a rapid autopsy report of metastatic renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:567-77.
84. Menko FH, Maher ER, Schmidt LS, Middelton LA, Aittomäki K, Tomlinson I, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment. *Fam Cancer*. 2014;13:637-44.

85. Lattouf JB, Pautler SE, Reaume MN, Kim RH, Care M, Green J, et al. Structured assessment and followup for patients with hereditary kidney tumour syndromes. *Can Urol Assoc J.* 2016;10:214.
86. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, Cascón A, Menara M, Khalifa E, et al. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet.* 2014;23:2440-6.
87. Matyakhina L, Freedman RJ, Bourdeau I, Wei MH, Stergiopoulos SG, Chidakel A, et al. Hereditary Leiomyomatosis Associated with Bilateral, Massive, Macronodular Adrenocortical Disease and Atypical Cushing Syndrome: A Clinical and Molecular Genetic Investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:3773-9.
88. Bulku A, Weaver TM, Berkmen MB. Biochemical Characterization of Two Clinically-Relevant Human Fumarase Variants Defective for Oligomerization. *Open Biochem J.* 2018;12:1-15.
89. Ajalla Aleixo MA, Rangel VL, Rustiguel JK, de Pádua RAP, Nonato MC. Structural, biochemical and biophysical characterization of recombinant human fumarate hydratase. *FEBS J.* 2019;286:1925-40.
90. Zyla RE, Hodgson A. Gene of the month: FH. *J Clin Pathol.* 2021;74:615-9.
91. Shorthouse D, Hall MWJ, Hall BA. Computational Saturation Screen Reveals the Landscape of Mutations in Human Fumarate Hydratase. *J Chem Inf Model.* 2021;61:1970-80.
92. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41:211-8.
93. Ooi A, Wong JC, Petillo D, Roossien D, Perrier-Trudova V, Whitten D, et al. An Antioxidant Response Phenotype Shared between Hereditary and Sporadic Type 2 Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell.* 2011;20:511-23.
94. Sandhu IS, Maksim NJ, Amouzougan EA, Gallion BW, Raviele ALJ, Ooi A. Sustained NRF2 activation in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and in hereditary tyrosinemia type 1 (HT1). *Biochem Soc Trans.* 2015;43:650-6.
95. Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, da Costa ASH, Gaude E, et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature.* 2016;537:544-7.
96. Jefatura del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica [Internet]. Sec. 1, Ley 14/2007 jul 4, 2007 p. 28826-48. <https://www.boe.es/eli/es/l/2007/07/03/14>
97. ORDEN 5/2015, de 5 de junio, de la Consellería de Sanidad. DOGV núm. 7559 de 29.06.2015) [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2022]. https://dogv.gva.es/portal/ficha_disposicion_pc.jsp?sig=005856/2015&L=1
98. GPC_563_Cancer_Hereditario_Comunitat_Valenciana_2017.pdf [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2022]. https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_563_Cancer_Hereditario_Comunitat_Valenciana_2017.pdf

99. Curation results for Gene-Disease Validity [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2022]. https://search.clinicalgenome.org/kb/gene-validity/CGGV:assertion_59e42ccd-2b0b-441c-8529-6eb1e9dde330-2020-05-14T002334.007Z
100. Dunnen JT. Sequence Variant Descriptions: HGVS Nomenclature and Mutalyzer. *Curr Protoc Hum Genet* [Internet]. julio de 2016 [citado 14 de diciembre de 2022];90(1). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphg.2>
101. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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*. 2015;17:405-24.
102. VarSome The Human Genomics Community [Internet]. VarSome. 2015 [citado 11 de diciembre de 2022]. <https://varsome.com/>
103. FH[gene] - ClinVar - NCBI [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2022]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=FH%5Bgene%5D&redir=gene>
104. Chan TL, Chan YW, Ho JWC, Chan C, Chan ASY, Chan E, et al. MSH2 c.1452-1455delAATG is a founder mutation and an important cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the southern Chinese population. *Am J Hum Genet*. 2004;74:1035-42.
105. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50:D988-95.
106. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12:996-1006.
107. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki [Internet]. [citado 28 de mayo de 2022]. <https://www.wma.net/es/que-hacemos/etica-medica/declaracion-de-helsinki/>
108. BOE.es - BOE-A-2018-16673 Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. [Internet]. [citado 28 de mayo de 2022]. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2018-16673>
109. Jefatura del Estado. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica [Internet]. Sec. 1, Ley 14/2007 jul 4, 2007 p. 28826-48. <https://www.boe.es/eli/es/l/2007/07/03/14>
110. Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, et al. Screening for a *BRCA2* Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes. *J Clin Oncol*. 2007;25:2027-34.
111. Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_orden_alfabetico.pdf [Internet]. [citado 3 de enero de 2023]. https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_orden_alfabetico.pdf

112. Lu E, Hatchell KE, Nielsen SM, Esplin ED, Ouyang K, Nykamp K, et al. Fumarate hydratase variant prevalence and manifestations among individuals receiving germline testing. *Cancer*. 2022;128:675-84.
113. Shuch B, Li S, Risch H, Bindra RS, McGillivray PD, Gerstein M. Estimation of the carrier frequency of fumarate hydratase alterations and implications for kidney cancer risk in hereditary leiomyomatosis and renal cancer. *Cancer*. 2020;126:3657-66.
114. FH | gnomAD v3.1.2 | gnomAD [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2022]. https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG0000091483?dataset=gnomad_r3
115. The FH gene homepage - Global Variome shared LOVD [Internet]. [citado 14 de diciembre de 2022]. <https://databases.lovd.nl/shared/genes/FH>
116. Popp B, Erber R, Kraus C, Vasileiou G, Hoyer J, Burghaus S, et al. Targeted sequencing of FH-deficient uterine leiomyomas reveals biallelic inactivating somatic fumarase variants and allows characterization of missense variants. *Mod Pathol*. 2020;33:2341-53.
117. Wei MH, Toure O, Glenn GM, Pithukpakorn M, Neckers L, Stolle C, et al. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2006;43:18-27.
118. Wang C, Tetzlaff M, Hick R, Duvic M. Reed syndrome presenting with leiomyosarcoma. *JAAD Case Rep*. 2015;1:150-2.
119. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3387-92.
120. Muller M, Ferlicot S, Guillaud-Bataille M, Le Teuff G, Genestie C, Deveaux S, et al. Reassessing the clinical spectrum associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome in French FH mutation carriers. *Clin Genet*. 2017;92:606-15.
121. Wei MH. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2005;43:18-27.
122. Stewart L, Glenn GM, Stratton P, Goldstein AM, Merino MJ, Tucker MA, et al. Association of Germline Mutations in the Fumarate Hydratase Gene and Uterine Fibroids in Women With Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer. *Arch Dermatol*. 2008;144:1584-92.
123. Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. 2005;14:2231-9.
124. Grubb RL, Franks ME, Toro J, Middleton L, Choyke L, Fowler S, et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer: A Syndrome Associated With an Aggressive Form of Inherited Renal Cancer. *J Urol*. 2007;177:2074-80.
125. Trpkov K, Hes O, Agaimy A, Bonert M, Martinek P, Magi-Galluzzi C, et al. Fumarate Hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma Is Strongly Correlated With Fumarate Hydratase Mutation and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:865-75.

126. Ravaud A, Oudard S, Fromont MD, Chevreau C, Gravis G, Zanetta S, et al. First-line treatment with sunitinib for type 1 and type 2 locally advanced or metastatic papillary renal cell carcinoma: a phase II study (SUPAP) by the French Genitourinary Group (GETUG)†. *Ann Oncol.* 2015;26:1123-8.
127. Srinivasan R, Gurram S, Al Harthy M, Singer EA, Sidana A, Shuch BM, et al. Results from a phase II study of bevacizumab and erlotinib in subjects with advanced hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) or sporadic papillary renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38:5004-5004.
128. National Cancer Institute (NCI). A Phase 2 Study of Bevacizumab, Erlotinib and Atezolizumab in Subjects With Advanced Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) Associated or Sporadic Papillary Renal Cell Cancer [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 nov [citado 8 de diciembre de 2022]. Report No.: NCT04981509. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04981509>
129. Jonsson Comprehensive Cancer Center. A Phase 2 Study of Pamiparib (BGB-290) Plus Temozolomide for Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 oct [citado 8 de diciembre de 2022]. Report No.: NCT04603365. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04603365>
130. Novartis Pharmaceuticals. A Phase I/Ib, Open-label, Multi-center Study of DFF332 as a Single Agent and in Combination With Everolimus or IO Agents in Patients With Advanced/Relapsed ccRCC and Other Malignancies With HIF2 α Stabilizing Mutations [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 oct [citado 8 de diciembre de 2022]. Report No.: NCT04895748. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04895748>
131. Suarez Rodriguez C, Larkin JMG, Patel P, Valderrama BP, Rodriguez-Vida A, Glen H, et al. Overall survival results for durvalumab and savolitinib in metastatic papillary renal cancer. *J Clin Oncol.* 20 de febrero de 2020;38:619-619.
132. Graumann O, Osther SS, Osther PJS. Characterization of complex renal cysts: A critical evaluation of the Bosniak classification. *Scand J Urol Nephrol.* 2011;45:84-90.
133. Hammarstedt L, Muth A, Wängberg B, Björnelid L, Sigurjónsdóttir HA, Götherström G, et al. Adrenal lesion frequency: A prospective, cross-sectional CT study in a defined region, including systematic re-evaluation. *Acta Radiol.* 2010;
134. Lehtonen HJ, Blanco I, Piulats JM, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA. Conventional renal cancer in a patient with fumarate hydratase mutation. *Hum Pathol.* 2007;38:793-6.
135. Thompson AJ, Alwan YM, Ramani VAC, Evans DG, Maher ER, Woodward ER. Cost-effectiveness model of renal cell carcinoma (RCC) surveillance in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC). *J Med Genet.* 2022;jmedgenet-2021-108215.

ANEXO I





Artículo 1 del presente compendio:

Revista: Cancers (Basel). 2020 ;12:3277. **DOI:** 10.3390/cancers12113277.



Article

Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome in Spain: Clinical and Genetic Characterization

A. Beatriz Sánchez-Heras ^{1,*}, Adela Castillejo ², Juan D. García-Díaz ³ , Mercedes Robledo ^{4,5}, Alexandre Teulé ⁶, Rosario Sánchez ⁷, Ángel Zúñiga ⁸, Enrique Lastra ⁹, Mercedes Durán ¹⁰ , Gemma Llorc ¹¹, Carmen Yagüe ¹², Teresa Ramon y Cajal ¹³, Consol López San Martín ¹³, Adrià López-Fernández ¹⁴, Judith Balmaña ¹⁴, Luis Robles ¹⁵, José M. Mesa-Latorre ³, Isabel Chirivella ¹⁶ , María Fonfria ¹⁷, Raquel Perea Ibañez ¹, M. Isabel Castillejo ², Inés Escandell ¹⁸, Luis Gomez ¹⁹, Pere Berbel ²⁰ and Jose Luis Soto ² 

¹ Cancer Genetic Counselling Unit, Medical Oncology Department, Hospital General Universitario de Elche, 03203 Elche, Spain; perea_mar@gva.es

² Molecular Genetics Unit, Hospital General Universitario de Elche, 03203 Elche, Spain; castillejo_ade@gva.es (A.C.); castillejo_isa@gva.es (M.I.C.); soto_jos@gva.es (J.L.S.)

³ Clinical Genetics Unit, Department of Internal Medicine, University Hospital Príncipe de Asturias, 28805 Alcalá de Henares, Spain; juandedios.garcia@salud.madrid.org (J.D.G.-D.); jmesa@salud.madrid.org (J.M.M.-L.)

⁴ Hereditary Endocrine Cancer Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), 28029 Madrid, Spain; mrobledo@cni.es

⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, 28029 Madrid, Spain

⁶ Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, 08908 Hospitalet de Llobregat, Spain; ateule@iconcologia.net

⁷ Unidad Multidisciplinar de Enfermedades de Baja Prevalencia, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Hospital General Universitario de Alicante, 03015 Alicante, Spain; sanchez_rosmar@gva.es

⁸ Unit of Genetics, Hospital Universitario Politécnico La Fe, 46026 Valencia, Spain; zunyiga_ang@gva.es

⁹ Unidad de Consejo Genético en Cáncer Hereditario, Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario de Burgos, 09006 Burgos, Spain; elastra@saludcastillayleon.es

¹⁰ Genética del Cáncer, Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM-UVA-CSIC), 47003 Valladolid, Spain; merche@ibgm.uva.es

¹¹ Hereditary Cancer Unit, Medical Oncology Department, Corporació Sanitària Universitària Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain; gllort@tauli.cat

¹² Hereditary Cancer Unit, Medical Oncology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, 08191 Rubí, Spain; cyague@cst.cat

¹³ Medical Oncology Department, Hospital Santa Creu i Sant Pau, 08091 Barcelona, Spain; tramon@santpau.cat (T.R.y.C.); clopezsa@santpau.cat (C.L.S.M.)

¹⁴ Hereditary Cancer Genetics Group, Medical Oncology Department (VHIO), Hospital Universitario Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; adlopez@vhio.net (A.L.-F.); jbalmana@vhio.net (J.B.)

¹⁵ Unidad de Cáncer Familiar, Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; luis.robles@salud.madrid.org

¹⁶ Department of Medical Oncology, INCLIVA Biomedical Research Institute, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; chirivella_isa@gva.es

¹⁷ Cancer Genetic Counselling Unit, Medical Oncology Department, Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón, 12002 Castellón, Spain; mfonfria@uji.es

¹⁸ Servicio de Dermatología, Hospital General Universitario de Elda, 03600 Elda, Spain; escandell_ine@gva.es

¹⁹ Urology Department, Hospital Universitario Sant Joan de Alicante, 03550 Sant Joan de Alicante, Spain; l.gomez@umh.es

²⁰ Departamento de Histología y Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, 03550 Sant Joan de Alicante, Spain; pere.berbel@umh.es

* Correspondence: sanchez_ana@gva.es; Tel.: +34-966-616-791

Received: 2 October 2020; Accepted: 4 November 2020; Published: 5 November 2020



Simple Summary: Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) syndrome is a very rare hereditary disorder characterized by cutaneous leiomyomas (CLMs), uterine leiomyomas (ULMs), renal cysts (RCys) and renal cell cancer (RCC), with no data on its prevalence worldwide. No genotype-phenotype associations have been described. The aim of our study was to describe the genotypic and phenotypic features of the largest series of patients with HLRCC from Spain reported to date. Of 27 *FH* germline pathogenic variants, 12 were not previously reported in databases. Patients with missense pathogenic variants showed higher frequencies of CLMs, ULMs and RCys, than those with loss-of-function variants. The frequency of RCCs (10.9%) was lower than those reported in the previously published series.

Abstract: Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC) is a very rare hereditary disorder characterized by cutaneous leiomyomas (CLMs), uterine leiomyomas (ULMs), renal cysts (RCys) and renal cell cancers (RCCs). We aimed to describe the genetics, clinical features and potential genotype-phenotype associations in the largest cohort of fumarate hydratase enzyme mutation carriers known from Spain using a multicentre, retrospective study of individuals with a genetic or clinical diagnosis of HLRCC. We collected clinical information from medical records, analysed genetic variants and looked for genotype-phenotype associations. Analyses were performed using R 3.6.0. software. We included 197 individuals: 74 index cases and 123 relatives. CLMs were diagnosed in 65% of patients, ULMs in 90% of women, RCys in 37% and RCC in 10.9%. Twenty-seven different pathogenic variants were detected, 12 (44%) of them not reported previously. Patients with missense pathogenic variants showed higher frequencies of CLMs, ULMs and RCys, than those with loss-of-function variants ($p = 0.0380$, $p = 0.0015$ and $p = 0.024$, respectively). This is the first report of patients with HLRCC from Spain. The frequency of RCCs was lower than those reported in the previously published series. Individuals with missense pathogenic variants had higher frequencies of CLMs, ULMs and RCys.

Keywords: leiomyomas; hereditary leiomyomatosis; *FH* gene; missense pathogenic variants, renal cell cancer

1. Introduction

More than 200 hereditary cancer susceptibility syndromes associated with specific gene mutations are known: some of these are very rare. Genetic counselling and testing allow individuals to know their risks, make choices for cancer screening, prevention and—in some forms of cancers—targeted treatment therapies. Moreover, the study of hereditary tumours has improved understanding of the molecular basis of tumorigenesis and in developing therapeutic target agents, especially for renal cancers.

In 1973, Reed et al. [1] described two families whose members presented with cutaneous leiomyomas (CLMs) and uterine leiomyomas (ULMs) with an autosomal dominant pattern of inheritance, and a 20-year-old patient with renal cell cancer (RCC). First, it was named multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis or Reed syndrome. In 2001, Launonen et al. [2] proposed the term hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC; OMIM #150800). In 2002, Tomlinson et al. [3] proved that germline heterozygous pathogenic variants in the gene encoding fumarate hydratase (*FH*) cause this syndrome, adding to the group of known hereditary renal cancer genes such as *VHL*, *MET*, *TSC1*, *TSC2*, *FLCN* and *SDH*.

Pathogenic variants in *FH* generate inactivated fumarase or fumarate hydratase enzyme (FH) and lead to failure of the tricarboxylic acid cycle (TCA), essential in cellular respiration to harvest or release energy. Heterozygous carriers have an increased risk of CLMs and ULMs that rarely become leiomyosarcomas, renal cysts (RCys) and RCCs [2–8] and other tumours such as paragangliomas or suprarenal adenomas [9,10]. Homozygous carriers of *FH* suffer fumarate hydratase deficiency (FHD);

OMIM 606812) or fumaric aciduria characterized by facial and brain abnormalities and very serious encephalopathy [11]. The development of these patients is severely affected, with little life expectancy, so it is very important to offer appropriate genetic counselling to heterozygous carriers.

Studies on more than 300 affected families have been published worldwide, but with no data on prevalence [8,12]. Several large series have been published in the USA and Europe, but until now there are no reports of cases of HLRCC in Spain, although the data of some patients have been included in other series [7,8,13,14]. Here, we describe the clinical and genetic characteristics of carriers of *FH* mutations in the largest series of patients diagnosed to date with HLRCC in Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Data Collection

We included patients with clinical criteria of HLRCC and confirmed family diagnosis by genetic testing on confirmed and obligated carriers between 2009 and 2019 from 11 different centers in Spain. We created a database to collect clinical information from the medical records, such as presence and age of diagnosis of CLMs, ULMs, leiomyosarcoma, RCys and RCCs, hysterectomy and age at surgery, treatment of RCCs, presence and age of diagnosis of other tumours, presence of risk factors for RCCs such as high blood pressure, tobacco use (smoking or passive smoking) and obesity (defined as a body mass index >30 kg/m²), and if they did vigorous physical activity, defined as playing sports more than 3 days per week (as a possible trigger of tumour development by increasing metabolic energy demand). RCCs and other cancers were confirmed by histopathology of resected tumours. RCys and adrenal adenomas were diagnosed by imaging procedures such as computed tomography scans, magnetic resonance imaging or ultrasonography. Some RCys were confirmed by histopathology of resected tumours.

2.2. Detection of Germline Mutations

DNA from peripheral blood samples was used for *FH* genetic testing. The whole coding sequence and intron-exon boundaries were analysed by polymerase chain reaction amplification and Sanger sequencing for single nucleotide variants and insertion/deletion type of variants. Copy number variations/variants were analysed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) according to the manufacturer's protocol (SALSA MLPA Probemix P198, MRC-Holland, The Netherlands). Alternatively, next-generation sequencing and further confirmation of findings by Sanger sequencing or MLPA, depending on the variant type, were also performed in a subset of cases. Similarly, relatives at risk were tested using Sanger sequencing or MLPA. The variants were described using the current version of human genomic variant search nomenclature [15], considering LRG_504t1 (NM_000143.3) as the transcript reference sequence. The clinical significance of variants was assessed using the American College of Medical Genetics and Genomics criteria [16]. Over 70 genomic databases were considered through the VarSome [17] data mining tool, including ClinVar [18]. ClinVar provides supporting evidence on the relationships among human genetic variations and phenotypes.

All patients with a genetic diagnosis gave written informed consent for genetic testing according to the Spanish legislation. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital General Universitario de Elche on 25 January 2018 (code PI 42/2017).

2.3. Statistics

Statistical analyses were performed using R statistical software version 3.6.0 (R Foundation for Statistical Computing). Concerning the descriptive analysis, the qualitative variables are presented as percentages, the continuous quantitative variables are described as the mean and standard deviation (SD) or as the median and the interquartile range (IQR). Categorical variables were compared using chi-squared and Fisher's exact tests and multivariate logistic regression. Odds ratio (OR) was calculated to estimate the strength of association between variables. Confidence level used was 95% confidence

interval (95%CI). Significance was accepted at $p \leq 0.05$. Cumulative incidence of events was estimated with the cumulative hazard function. Overall survival was estimated by Kaplan-Meier method.

3. Results

We identified 197 heterozygous carriers of 27 germline variants in *FH*: 74 index cases and 123 relatives belonging to 74 different families. There were 113 women (57.4%) and 84 men (42.6%), with a mean age of 51.1 years (SD 13.4). All 27 variants were class five or four: 13 missense, five frameshift, four large deletions, three splice-site and two nonsense variants. Twelve (44%) were not previously reported in databases [16,17,19] (Table 1, Table S1).

Table 1. Genotype and phenotype characteristics of HLRCC families.

| Variant | Class | Variant Type | No. Families/ No. Individual (Male; Female) | CLM * | ULM * | RCy * | RCC * | Origin |
|---------------------------------------|-------|--------------|---|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| <i>No. affected patients/Total no</i> | | | | | | | | |
| Del FH | 5 | LoF | 2/6 (4; 2) | 2/6 | 1/2 | 2/6 | 0/6 | Spain |
| Del exon 2 | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | Spain |
| c.139C > T | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | ? | 0/1 | Spain |
| c.267 + 1_267 + 10del | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | Spain |
| c.301C > T | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | Spain |
| c.349G > C | 4 | Missense | 2/3 (1; 2) | 2/2 | 2/2 | ? | 0/3 | Spain |
| c.395delT | 5 | LoF | 1/16 (5; 11) | 1/15 | 6/10 | 0/14 | 2/16 | Spain |
| c.553delC | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | ? | ? | Spain |
| c.555 + 1G > A | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | Spain |
| c.563A > G | 4 | Missense | 1/2 (1; 1) | 1/2 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | Spain |
| c.575C > T | 4 | Missense | 4/11 (4; 7) | 11/11 | 7/7 | 5/11 | 0/11 | Spain |
| c.697C > T | 4 | Missense | 5/10 (5; 5) | 5/9 | 4/4 | 3/6 | 0/6 | Spain |
| c.698G > A | 5 | Missense | 4/7 (2; 5) | 4/6 | 4/4 | 1/1 | 1/3 | Spain |
| c.703C > T | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | ? | ? | ? | 0/1 | Spain |
| c.845G > T | 4 | Missense | 3/6 (2; 4) | 5/5 | 3/4 | 3/4 | 1/5 | Spain |
| c.893del | 5 | LoF | 1/2 (0; 2) | 2/2 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | Spain |
| c.905-2A > G | 5 | LoF | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 1/1 | 0/1 | Spain |
| c.965T > G | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | Spain |
| c.974delG | 5 | LoF | 1/3 (1; 2) | 1/1 | ? | 0/1 | 1/1 | Spain |
| Del exon 8 | 5 | LoF | 3/6 (1; 5) | 4/5 | 4/4 | 3/6 | 1/6 | Spain |
| c.1112A > G | 4 | Missense | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 | Perú |
| c.1118A > G | 5 | Missense | 31/104 (51; 53) | 64/99 | 50/51 | 36/85 | 10/101 | Spain |
| c.1126delC | 5 | LoF | 1/6 (4; 2) | 5/6 | 2/2 | 0/6 | 0/6 | Spain |
| c.1189G > A | 4 | Missense | 2/2 (0; 2) | 1/2 | 2/2 | 0/2 | 0/2 | Colombia |
| c.1217A > C | 4 | Missense | 1/1 (1; 0) | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 | Cuba |
| c.1240A > G | 4 | Missense | 1/1 (0; 1) | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | Belarus |
| Del exon 9 | 5 | LoF | 1/1 (0; 1) | ? | 1/1 | ? | 1/1 | Spain |
| | | | 74/197 (84; 113) | 118/182 (64.8%) | 93/103 (90.3%) | 57/153 (37.3%) | 19/175 (10.9%) | |
| Loss of Function | | | 17/47 (16; 31) | 21/41 (51.2%) | 18/25 (72.0%) | 8/38 (24.8%) | 6/42 (14.3%) | |
| Missense | | | 57/150 (68; 82) | 97/141 (68.8%) | 75/78 (96.1%) | 49/115 (42.6%) | 13/133 (9.8%) | |

HLRCC, Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer; CLM, cutaneous leiomyomas; ULM, uterine leiomyomas; RCy, renal cysts; RCC, renal cell cancer; LoF, Loss of Function; * Confirmed clinical information; ?, no information.

One hundred and four patients from 31 non-related families were heterozygotic carriers of the pathogenic variant c.1118A > G; p.Asn373Ser: 53 women and 51 men. Twenty-two families (95 individuals) originated from the province of Alicante in the south-east of Spain. Considering the population of Spanish origin in this province, the estimated prevalence is 6.7/100,000 inhabitants.

In looking for genotype-phenotype associations, the pathogenic and probably pathogenic genetic variants were classified into two groups: (a) loss of function, which includes those disruptive variants that would generate truncated proteins or loss of protein expression (nonsense, frameshift, consensus splice site and large deletions) and (b) missense variants, where the predicted functional effect would be milder.

3.1. Cutaneous Leiomyomas

One hundred and eighteen of 182 patients with dermatologic examination results presented with CLMs (64.8%), 69 women (58.5%) and 49 men (41.5%). The median age of appearance or diagnosis was 36.2 years, (IQR 28.0–48.3) (Figure 1). Two cases (1.7%)—one woman and one man—developed cutaneous leiomyosarcoma at the age of 46 years and 56 years, respectively. The frequency of CLMs was higher in individuals with missense than those with loss-of-function (LoF) variants (68.8% vs. 51.2%; $p = 0.038$; OR 0.47, (95%CI 0.23–0.96)) (Table 2). The cumulative incidence of CLM stratified by variant type did not show significant differences (Figure S1). Univariate analyses and multivariate logistic regression analysis did not reveal differences according to gender, blood pressure status, tobacco use, obesity or use of vigorous physical activity (Tables S2 and S3).

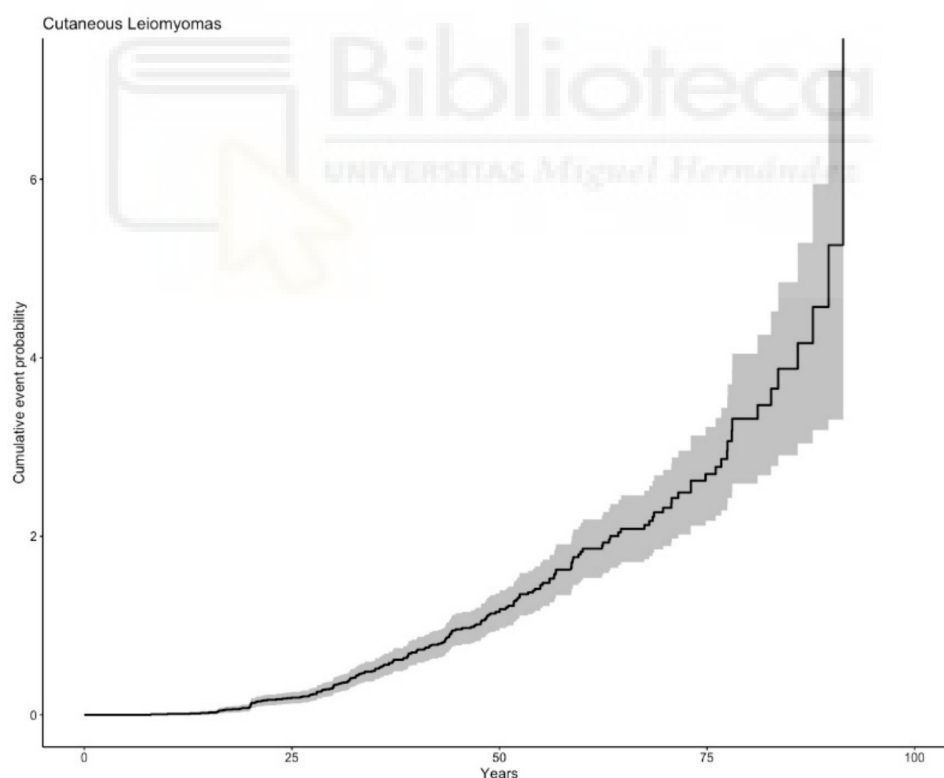


Figure 1. Cumulative incidence of cutaneous leiomyomas.

3.2. Uterine Leiomyomas

Of 103 women with gynaecological examinations, 93 (90.3%) had ULMs, at a median age of 30.7 years (IQR 24.9–34.2) (Figure 2). The frequency of ULMs was higher in individuals with missense than those with LoF variants (96.2% vs. 72%; $p = 0.001$; OR 0.10, (95%CI 0.02–0.43)) (Table 2). The cumulative incidence of ULM stratified by variant type did not show significant differences (Figure S2). The univariate analyses and multivariate logistic regression did not find differences according to blood pressure status, tobacco

use, obesity or use of vigorous physical activity (Tables S2 and S3). Hysterectomy was performed in 55.4% of women, at a median age of 34.4 years (IQR 32.0–38.9). In one patient aged 21 years, the pathological diagnosis was leiomyosarcoma (1.3%), and she received pelvic radiotherapy after surgery. A recent pathology review has confirmed the diagnosis of atypical leiomyoma in this case.

Table 2. Phenotype/Genotype associations.

| Clinical Manifestations | Missense No. Affected/Total (%) | LoF No. Affected/Total (%) | OR (95%CI) | <i>p</i> -Value * |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| CLM | 97/141 (68.8) | 21/41 (51.2) | 0.47 (0.23–0.96) | 0.038 |
| ULM | 75/78 (96.1) | 18/25 (72.0) | 0.10 (0.02–0.43) | 0.001 |
| RCy | 49/115 (42.6) | 8/38 (21.0) | 0.35 (0.15–0.85) | 0.017 |
| RCC | 13/133 (9.7) | 6/42 (14.2) | 1.53 (0.55–4.34) | 0.412 |

CLM, cutaneous leiomyomas; ULM, uterine leiomyomas; RCys, renal cysts; RCC, renal cell cancer; LoF, loss of function; OR, odds ratio; C: confidence interval; * χ^2 test.

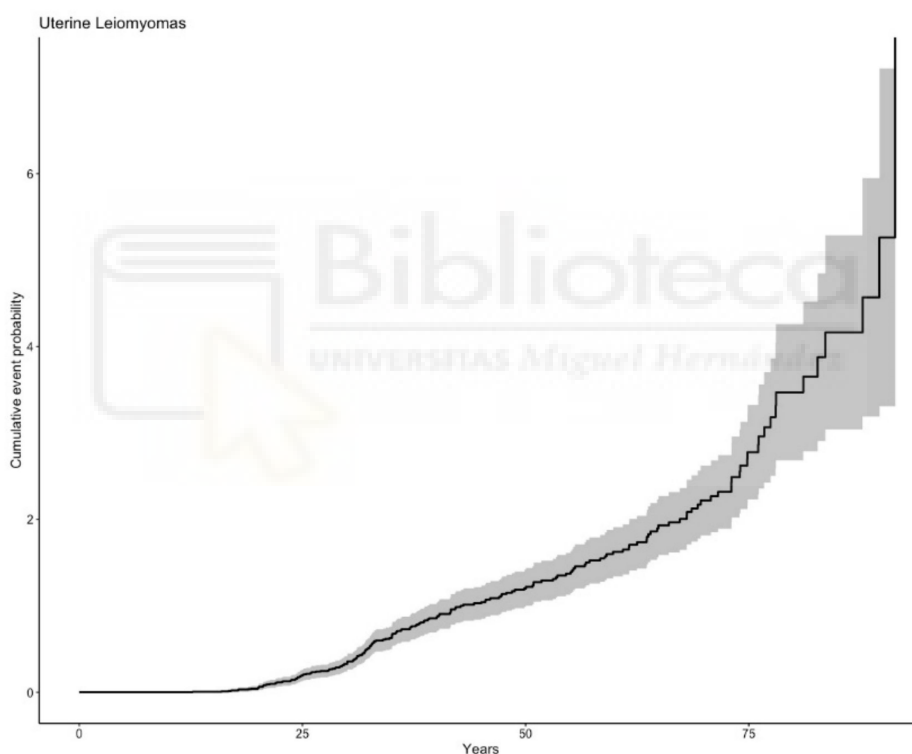


Figure 2. Cumulative incidence of uterine leiomyomas.

3.3. Renal Cysts

Of 153 patients with radiological records, 57 (37.3%) presented with RCys, 33 women (58%) and 24 men (42%), at a median age of 53.3 years (IQR 37.2–62.9). One operated patient presented with a haemorrhagic renal cyst with atypia. The frequency was higher in individuals with missense than those with LoF variants (42.6% vs. 21.1%; $p = 0.017$; OR 0.35, (95%CI 0.15–0.85)) (Table 2). The cumulative incidence of RCy stratified by variant type did not show significant differences (Figures S3 and S4). Univariate analysis showed no differences according to gender, blood pressure status or vigorous physical activity, but subjects with tobacco use ($p = 0.076$) and obesity ($p = 0.058$) showed a trend to develop RCys. The multivariate logistic regression did not find differences according to blood pressure status, tobacco use, obesity or use of vigorous physical activity (Tables S2 and S3). A logistic regression model including type of variant and tobacco exposure showed that patients with LoF variants had

less risk of developing RCys with tobacco exposure compared with patients with missense variants, but this lacked statistical significance (adjusted OR 2.05, (95%CI 0.96–4.39)) (Table 3).

Table 3. Multivariate logistic regression model for Renal Cyst, variant type and tobacco variables.

| Variable | RCy | |
|--------------|------------------|-------------------|
| | OR (95%CI) | <i>p</i> -value * |
| Variant type | | |
| Missense | Ref. | |
| LoF | 0.23 (0.08–0.65) | 0.005 |
| Tobacco | | |
| No | Ref. | |
| Yes | 2.05 (0.96–4.39) | 0.065 |

RCy: Renal Cyst; LoF: Loss of Function; OR: Odds Ratio; * Wald's test.

3.4. Renal Cell Cancers

Of 175 patients with confirmed clinical information, 19 presented with RCC (10.9%), 11 men and eight women; fourteen were index cases. Seven of them also presented with RCys. One patient was diagnosed with two synchronous bilateral RCCs. The median age at diagnosis was 37.4 years ((IQR 30.2–53.2), range 10–67) (Figure 3). Ten cases were heterozygote carriers of the pathogenic variant c.1118A > G; p.Asn373Ser, three of them at a very early age (a boy at 10 years, a young man at 20 years and a woman with bilateral RCCs at 24 years). No significant differences were observed according to the type of variant, sex, blood pressure status, tobacco use or obesity in the univariate and multivariate logistic regression model, but those undertaking vigorous physical activity showed a non-significant trend to develop RCCs in the multivariate logistic regression model ($p = 0.067$) (Tables S2 and S3).

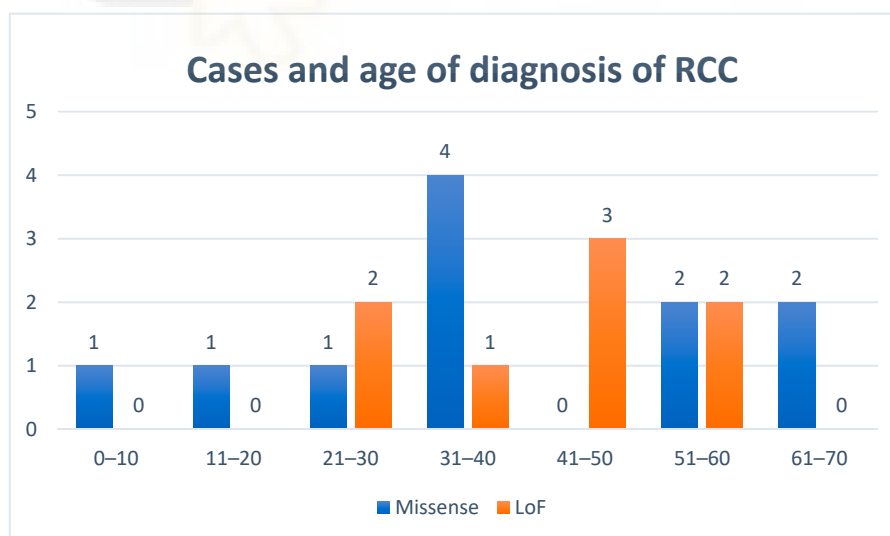


Figure 3. Age at diagnosis of renal cell cancer. RCC, renal cell cancer.

Histopathology revealed various patterns of RCCs. Papillary morphology was the most frequent ($n = 14$): 10 cases of type 2 papillary and four papillary type without further subclassification. Four were clear cell carcinoma and two were unclassified. Seven tumours presented with cystic components. One case was diagnosed after genetic testing by imaging screening over an RCy considered previously to be benign. According to the initial presentation, six were stage I, two were stage II, three were stage III, four were stage IV, and in four cases this information was not available. The median overall

survival (mOS) was 8.01 years (95%CI 4.0–12.8). For patients with stages I and II, the mOS was not reached, and the mean overall survivals were 15.5 years (95%CI 9.6–21.4). In patients with stages III and IV, the mOS was 2.9 years (95%CI 1.4–4.4) (Figure 4).

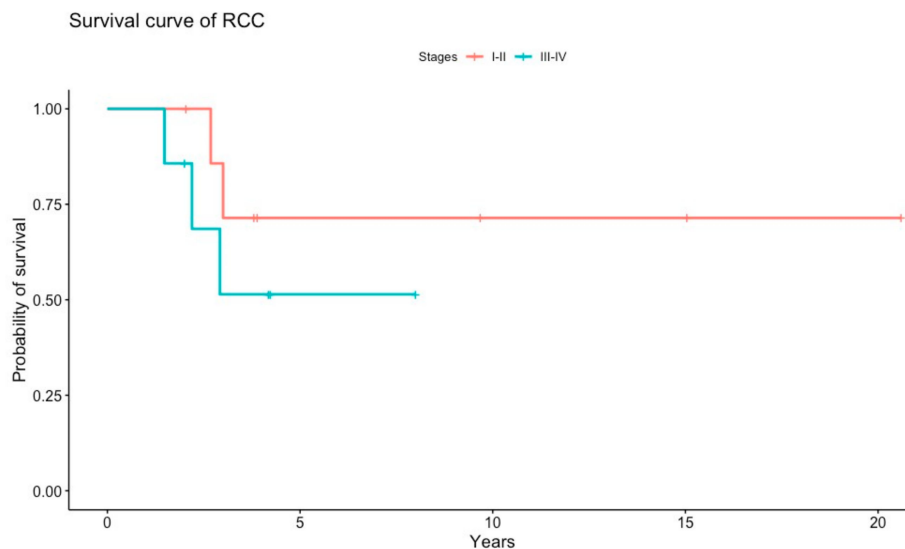


Figure 4. Kaplan-Meier estimates of overall survival of patients with renal cell cancer stages I and II vs. stages III and IV. RCC, renal cell cancer.

Seven patients with metastatic disease received medical treatments (anti-angiogenics with and without immunotherapy) with a mOS of 34.9 months (95%CI: 29.0–40.9) (Figure 5). One patient with a stage I RCC recurred and died at 32.1 months. Of two patients with stage III RCC who recurred, one is alive with complete remission. Two of four patients with stage IV RCC are alive and ongoing treatment at 24 and 50.7 months, respectively. One patient with a stage I RCC had synchronous advanced bladder cancer and died at 35.9 months from diagnosis.

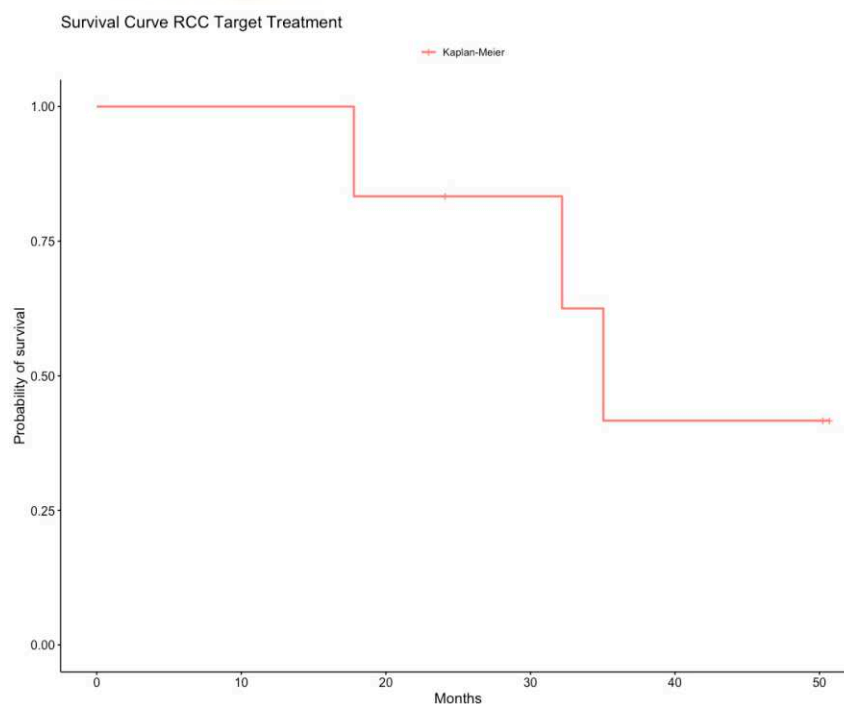


Figure 5. Kaplan-Meier estimates of overall survival of renal cell cancer in patients treated with target treatment (anti-angiogenic and immunotherapy). RCC, renal cell cancer.

3.5. Other Tumours

Twenty-seven of 171 patients with confirmed clinical information (15.8%), 13 women and 14 men, presented with other different tumours, some of them with two. Of 153 patients with radiological records, nine were diagnosed with adrenal adenomas (5.9%), at a median age of 55.1 years (IQR 46.6–59.8). Malignant tumour types were five prostate cancers, three bladder cancers, two colon cancers, two breast cancers, two cutaneous basal cell carcinomas, two cutaneous squamous cell carcinomas, two non-Hodgkin lymphomas, one melanoma, one lung cancer, one pancreatic cancer and one carcinoid tumour.

4. Discussion

HLRCC is a very rare form of genodermatosis characterized by the presence of CLMs, ULMs and renal tumours. Despite its high penetrance [2–8], it is frequently underdiagnosed because the skin lesions can be scarce and patients do not seek medical advice. There are no data on its prevalence, and it is considered a rare disease [12]. We found that in Alicante, a province in the south-east of Spain, this syndrome is frequent probably because of a founder mutation, c.1118A > G; p.Asn373Ser, and we calculated a prevalence of 6.33/100,000 people. This mutation has been described previously in other series with patients of Spanish origin [7,14].

FH is located on chromosome 1q42.1, with 1533 nucleotides and 10 exons. It encodes two isoforms of FH, one localized in mitochondria that participates in the TCA cycle catalysing the hydration of fumarate to l-malate, and one in the cytosol that participates in the urea cycle and arginine metabolism [20]. Around 180 pathogenic variants and 82 likely pathogenic types causing HLRCC or FHD have been reported, mainly missense mutations, but there are also frameshift, nonsense, splicing and deletion variants [17,19]. Here we describe 27 pathogenic/likely pathogenic variants, 12 (44%) of them not previously reported in databases [18,21]. Fourteen variants were classified as disruptive pathogenic variants (named LoF), and 13 were missense pathogenic variants.

FH is a homotetramer protein with four active sites of interaction, all of them evolutionarily conserved, formed by amino acid residues 176–193, 228–247 and 359–381. Mutations that affect these regions or the protein structure decrease its enzymatic capacity [22]. Total loss of FH function might be lethal for cells because of its essential role in cellular metabolism. Thus, if the germline mutation generates total loss of function, such as a premature stop codon or large rearrangements, only those somatic second hits with a partial inactivation such as missense or in-frame indel mutations will have a potential oncogenic effect with cells retaining residual enzymatic function. Loss of heterozygosity has been described as the most frequent event for inactivation of the second allele in RCCs and ULMs from patients with HLRCC [2,23]. With these considerations in mind, we hypothesized an association among missense germline pathogenic variants and the HLRCC clinical phenotype. We found significant associations with ULMs, CLMs and RCys, but not with RCCs; however, because of the small number of cases, no firm conclusions can be drawn. Further studies are needed to evaluate potential differences in penetrance related to the type of genetic variant in *FH*.

Several mechanisms may be involved in the development of these tumour types. A deficit of FH leads to blockage of the TCA, with the accumulation of fumarate and succinate, and a decrease in oxidative phosphorylation. To compensate for this, there is a metabolic shift to aerobic glycolysis for energy production that increases lactate and reactive oxygen species (ROS) levels [24]. ROS and high levels of fumarate inhibit the degradation of hypoxia-inducible factor alpha (HIF α) by O₂-dependent prolyl hydroxylases leading to a situation of pseudohypoxia [25,26]. The accumulation of fumarate and succinate produces succination in cysteine residues of proteins, S-(2-succinyl) cysteine (2SC), such as the transcription factor Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), resulting in upregulation of genes involved in the antioxidant response such as those encoding nuclear erythroid 2-like 2 transcription factor (NRF2) that leads to cell proliferation [27,28]. In addition, elevated levels of fumarate cause epigenetic suppression of a family of anti-metastatic microRNAs such as MIR200, leading to epithelial-to-mesenchymal transition, a phenotypic switch that promotes tumour formation and metastasis [29].

CLMs are benign tumours that arise from the arrector pili musculature. These muscles participate in thermoregulation and in response to strong emotions, but in humans their action is considered a vestigial reflex. In our patients, CLMs were present in 64.8%, similar to other series in the literature (48.6–84%) [6–8,30]. Some patients were previously misdiagnosed as having post-acne scarring or other chronic cutaneous lesions as described by several authors [3,4,6,7]. Many of the relatives of our patients were diagnosed by dermatologists after positive genetic testing because they did not notice the lesions. Patients with missense variants presented with a higher frequency of CLMs than those with LoF variants, which have not been described hitherto in other series. However, no significant differences were observed in the cumulative incidence when stratified by variant type. Two patients developed cutaneous leiomyosarcomas (1.7%), although few such cases have been described [4,31].

Almost all women (77–100%) with LHRCC develop numerous and large ULMs at a younger age than sporadic ones. In our series, 90.3% of women were diagnosed with leiomyomas at similar ages to those described previously [2–9,32]. We observed a higher frequency in women with missense compared with LoF variants, and this has also not been described before. Variant types did not show differences in the cumulative incidence. In some cases, myomectomy was the surgical treatment, but hysterectomy was performed in 55.4% at a mean age of 34.4 years as the best treatment for their symptoms. Transformation to leiomyosarcomas have been described, but new diagnostic guidelines actually classify these tumours as atypical leiomyomas [4,9,23]. Sporadic leiomyomas develop during the reproductive period and regress after menopause [33] and show increased expression of oestrogen and progesterone receptors and hypoxia-induced angiogenic factors (HIF) compared with normal myometrium [34]. The ULMs of patients with HLRCC are more vascularized and show more overexpression of HIF1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) than do sporadic leiomyomas [35,36], and this should be considered by gynaecologists to prevent haemorrhagic complications at the time of surgery.

An association between RCys and RCCs has been postulated [37]. Patients with inherited RCC syndromes as Von Hippel Lindau syndrome, tuberous sclerosis complex, and HLRCC also develop RCys. In the general population, the prevalence of RCys is 4.6–8.2% compared with 36% in patients with HLRCC, presenting at a younger age [9]. A study in *FH*-deficient mice demonstrated that RCys formation is mediated by NERF2 but is hypoxia-inducible factor (HIF)-independent [38]. Benign cyst models in *FH*-deficient cells show 2SC staining, suggesting that such cysts are the precursor lesions of RCCs [39]. The use of the Bosniak classification for RCys does not seem to be adequate in these patients because of the higher risk of malignancy. In our series, 37.3% of the patients had RCys, and 7/19 of RCCs had confirmed cystic components. Patients with missense variants presented with RCys more frequently than those with LoF variants. This difference has not been described in other series. No differences in the cumulative incidence were detected by variant type.

RCCs are not a single disease but several different diseases with different histological patterns and prognoses, in which HIFs are the main cornerstones in pathogenesis [40,41]. RCCs must be considered metabolic diseases. In VHL syndrome and sporadic RCCs, germline and somatic mutations in the *VHL* gene lead to upregulation of proangiogenic HIF through the VHL tumour suppressor pathway. In both HLRCC and hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome (caused by mutations in the succinate dehydrogenase complex, *SDH*, genes), there is overexpression of HIF in tumour tissues. Both syndromes affect the TCA cycle, and in both there is an inhibition of prolyl hydroxylases and consequent HIF stabilization by accumulated fumarate or succinate. However, there must be other mechanisms involved to explain the different clinical manifestations [42]. The published risk of developing RCCs in patients with HLRCC is 15–34%, at a mean of 44 years of age; more frequent in men; usually unilateral and most often diagnosed at advanced stages with extremely aggressive evolution [2–9,43–46]. In our series, the rate was lower at 10.9%. This low rate might be more realistic than in other published series selected by the diagnosis of RCCs. The median age in our patients is lower (37.4 years), including four cases younger than 25 years old. Tobacco smoking, hypertension and obesity are established risk factors for RCC, which can be modestly reduced by physical activity.

RCC incidence is two-fold higher in men than in women [47]. No significant differences were found for these factors.

For many years, type 2 papillary RCC has been associated specifically with HLRCC, but different communications have described other types as tubulocystic carcinoma, collecting duct renal carcinoma, oncocytic or even clear cell carcinoma (in our series four cases). In the 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System, this was proposed as a new entity, named HLRCC-associated RCC (code 8311/3) [48], with variable pathological features but with a specific papillary architecture with abundant eosinophilic cytoplasm, large nuclei, very prominent nucleoli, perinucleolar halos and usually Fuhrman grade three to four. This emphasizes the importance of looking for subcellular characteristics in histopathology and the use of immunohistochemical techniques for detecting 2SC residues or FH to avoid misdiagnosis. Unlike other published series, in our study the majority of patients with RCCs diagnosed as stages I–II had similar survival to sporadic cases. The mean of survival was longer than that published in another series (15.5 vs. 7.3 years) [30].

There are no data published of results of specific treatment phase III clinical trials for this syndrome, so the treatment must be based on antiangiogenic and immunotherapy approaches as in other subtypes of RCCs. Ravaud et al. [49] published a phase II study on patients with advanced or metastatic papillary type 1 and 2 RCCs treated with sunitinib as a first-line therapy. The mOS was 17.8 months (95% CI 5.7–26.1) and 12.4 (95% CI 8.2–14.3) months for types 1 and 2, respectively. Srinivasan et al. [50] presented a phase II study in the American Society of Clinical Oncology meeting of 2020 with bevacizumab and erlotinib for patients with metastatic HLRCC-associated RCCs and metastatic sporadic papillary RCCs. The overall response rate was 51% (95% CI 40–61) in all patients, and 64% (95% CI 49–77) in the HLRCC cohort; the median progression-free survival was 14.2 months (95% CI, 11.4–18.6) in all patients, and 21.1 months (95% CI, 15.6–26.6) in the HLRCC cohort. A phase I/II trial using vandetanib and metformin in patients with advanced RCCs associated with HLRCC or a *SDH* mutation, and sporadic/non-HLRCC papillary type RCCs is ongoing [51]. Immuno-oncology treatment has shown promising results in patients with papillary RCCs. Patients treated with a combination of savolitinib and durvalumab had a mOS of 12.3 months (95% CI 5.8–21.3) [52]. In our series, patients with metastatic RCCs treated with antiangiogenic therapy with or without immunotherapy had a mOS of 35 months.

Other tumours have been associated with this syndrome, such as adrenocortical adenomas and carcinomas, Wilm's tumour, Leydig cell tumours, gastrointestinal stromal tumours, ovarian cystadenomas, pheochromocytomas and paragangliomas [8,10,53]. The risk of pheochromocytomas and paragangliomas must be taken into account in those patients with a diagnosis of adrenal tumours made by imaging procedures. To date, we have not diagnosed any cases of pheochromocytomas or paragangliomas in our series. We observed nine (5.9%) patients with adrenal adenomas, at a median age of 55.1 years (range 46.6–59.8). Radiological studies report a frequency of this tumour of around 4.5% in general populations [54]. We did not find any increased incidences of other cancer types.

However, our study had limitations because of the lack of complete clinical information for some patients. Nevertheless, this is one of the largest series ever published of patients with HLRCC. Our objective is to continue a prospective phase to evaluate phenotypes and the results of screening RCCs in at-risk patients.

In the Second Symposium on Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cancer held in Paris in 2013, the consensus recommended—preferably—yearly renal MRI scans beginning at 8–10 years of age, although the risk is low up to age 20 [46,55]. Given our results, we support this, especially in patients with the mutation c.1118A>G who have RCCs at 10, 20 and 24 years of age. Screening with ultrasonography alone is not recommended because the lesions may be isoechoic and not detected. Bosniak criteria [56] to classify RCys are not reliable in these patients.

There are many questions about this syndrome. Why are the clinical manifestations so characteristic? Why are other smooth muscle tissues and localizations not affected? Is it possible to stop neoplastic transformation by targeting the altered metabolic route? We believe that research should focus on the embryonic development of these tissues. For instance, nephronectin, an extracellular matrix protein,

binds $\alpha\beta 1$ integrin in early kidney development and in arrector pili muscle progenitors [57,58]. Animal models have been designed to investigate some of the predisposition to RCC syndromes, such as Eker rats with pathogenic variants in the *TSC2* gene, German Shepherd dogs with pathogenic variants in the *BHD* gene and *FH*-deficient mice [59,60]. All these syndromes show some similarities in associated tumours (RCys and RCCs, uterine myomas and cutaneous lesions).

5. Conclusions

This is the first report of a large series of patients with HLRCC syndrome from Spain. The clinical manifestations were similar to those described in other series, but we have found phenotypic differences in patients with missense mutations who have a higher frequency of CLMs, ULMs and RCys. Established risk factors for RCC have been analysed. The frequency of RCCs was lower than those reported in the previously published series. RCys must be closely monitored as potential precursors of RCCs, with CT or preferably MRI as the optimal imaging techniques for the early detection of RCCs. Papillary type 2 is the most frequent in terms of histopathology, but other histological patterns do not exclude this syndrome. In the province of Alicante, there is a higher prevalence. Alerting health professionals such as family doctors, dermatologists, gynaecologists, radiologists, pathologists or urologists might help in early and correct diagnoses and in offering genetic counselling to heterozygous carriers about the risk of RCCs, leiomyomas and their complications, as well as the risk of FHD in offspring.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3277/s1>, Figure S1: Cumulative incidence of cutaneous leiomyomas by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals, Figure S2: Cumulative incidence of uterine leiomyomas by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals, Figure S3: Cumulative incidence of renal cysts, Figure S4: Cumulative incidence of renal cysts by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals, Table S1: *FH* germline variants classifications and phenotype characteristics of HLRCC families, Table S2: Univariate analysis for cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas, renal cysts, renal cell cancer and risk factors, Table S3: Multivariate logistic regression model for cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas, renal cysts, renal cell cancer and risk factors.

Author Contributions: Conceptualization, A.B.S.-H., J.L.S.; data collection, A.B.S.H., A.C., J.D.G.-D., M.R., A.T., R.S., Á.Z., E.L., M.D., G.L., C.Y., T.R.y.C., C.L.S.M., A.L.-F., J.B., L.R., J.M.M.-L., I.C., M.F., R.P.I., M.I.C., I.E., L.G., J.L.S.; literature search, figures, A.B.S.-H., A.C., A.T., I.C., J.L.S.; study design, A.B.S.-H., A.C., J.D.G.-D., M.R., J.L.S.; data analysis, data interpretation, A.B.S.H., J.L.S.; writing—original draft preparation, A.B.S.H.; writing—review and editing, A.B.S.-H., J.L.S., A.C., I.C., L.G., P.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank the patients and their families for participating in this study. The authors thank Alejandro Moya, a member of the statistical team at Hospital General Universitario de Elche.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest in this particular area. In others matters, A. Beatriz Sánchez-Heras has served as consultant or advisory board to Tesaro; has served as speaker to AstraZeneca Spain, GlaxoSmithKline/Tesaro, PharmaMar and Roche; has received travel and/or accommodation grants from Merck Sharp and Dohme and Roche. Luis Robles has served as speaker to Astra-Zeneca. Additionally, Isabel Chirivella has served as consultant or advisory board to Pfizer, Bristol-Myers Squibb, Ipsen, Roche and EusaPharma; has served as speaker to Pfizer, Bristol-Myers Squibb and Ipsen; has received travel and/or accommodation grants from Pfizer.

References

1. Reed, W.B.; Walker, R.; Horowitz, R. Cutaneous leiomyomata with uterine leiomyomata. *Acta Derm. Venereol.* **1973**, *53*, 409–416.
2. Launonen, V.; Vierimaa, O.; Kiuru, M.; Isola, J.; Roth, S.; Pukkala, E.; Sistonen, P.; Herva, R.; Aaltonen, L.A. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3387–3392. [[CrossRef](#)]
3. Tomlinson, I.P.; Alam, N.A.; Rowan, A.J.; Barclay, E.; Jaeger, E.E.; Kelsell, D.; Leigh, I.; Gorman, P.; Lamlum, H.; Rahman, S.; et al. Germline mutations in *FH* predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 406–410.

4. Toro, J.R.; Nickerson, M.L.; Wei, M.H.; Warren, M.B.; Glenn, G.M.; Turner, M.L.; Stewart, L.; Duray, P.; Tourre, O.; Sharma, N.; et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 95–106. [CrossRef]
5. Alam, N.A.; Barclay, E.; Rowan, A.J.; Tyrer, J.P.; Calonje, E.; Manek, S.; Kelsell, D.; Leigh, I.; Olpin, S.; Tomlinson, I.P. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: An underdiagnosed tumor syndrome. *Arch. Dermatol.* **2005**, *141*, 199–206. [CrossRef]
6. Wei, M.H.; Toure, O.; Glenn, G.M.; Pithukpakorn, M.; Neckers, L.; Stolle, C.; Choyke, P.; Grubb, R.; Middleton, L.; Turner, M.L.; et al. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J. Med. Genet.* **2006**, *43*, 18–27. [CrossRef]
7. Gardie, B.; Remenieras, A.; Kattygnarath, D.; Bombled, J.; Lefèvre, S.; Perrier-Trudova, V.; Rustin, P.; Barrois, M.; Slama, A.; Avril, M.F.; et al. French National Cancer Institute. “Inherited predisposition to kidney cancer” network. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J. Med. Genet.* **2011**, *48*, 226–234. [CrossRef]
8. Muller, M.; Ferlicot, S.; Guillaud-Bataille, M.; Le Teuff, G.; Genestie, C.; Deveaux, S.; Slama, A.; Poulalhon, N.; Escudier, B.; Albiges, L.; et al. Reassessing the clinical spectrum associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome in French FH mutation carriers. *Clin. Genet.* **2017**, *92*, 606–615. [CrossRef]
9. Lehtonen, H.J.; Kiuru, M.; Ylisaukko-Oja, S.K.; Salovaara, R.; Herva, R.; Koivisto, P.A.; Vierimaa, O.; Aittomäki, K.; Pukkala, E.; Launonen, V.; et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J. Med. Genet.* **2006**, *43*, 523–526. [CrossRef]
10. Castro-Vega, L.J.; Buffet, A.; De Cubas, A.A.; Cascón, A.; Menara, M.; Khalifa, E.; Amar, L.; Azriel, S.; Bourdeau, I.; Chabre, O.; et al. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 2440–2446. [CrossRef]
11. Allegri, G.; Fernandes, M.J.; Scalco, F.B.; Correia, P.; Simoni, R.E.; Llerena, J.C., Jr.; de Oliveira, M.L. Fumaric aciduria: An overview and the first Brazilian case report. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2010**, *33*, 411–419. [CrossRef]
12. Orphanet Report Series—Rare diseases. Prevalence of Rare Diseases by Decreasing Prevalence, Incidence or Number of Published Cases. January 2020—n 2. Available online: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_or_cases.pdf (accessed on 31 August 2020).
13. Badeloe, S.; van Geel, M.; van Steensel, M.A.; Bastida, J.; Ferrando, J.; Steijlen, P.M.; Frank, J.; Poblete-Gutiérrez, P. Diffuse and segmental variants of cutaneous leiomyomatosis: Novel mutations in the fumarate hydratase gene and review of the literature. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 735–741. [CrossRef] [PubMed]
14. Lehtonen, H.J.; Blanco, I.; Piulats, J.M.; Herva, R.; Launonen, V.; Aaltonen, L.A. Conventional renal cancer in a patient with fumarate hydratase mutation. *Hum. Pathol.* **2007**, *38*, 793–796. [CrossRef] [PubMed]
15. Den Dunnen, J.T.; Dalgleish, R.; Maglott, D.R.; Hart, R.K.; Greenblatt, M.S.; McGowan-Jordan, J.; Roux, A.F.; Smith, T.; Antonarakis, S.E.; Taschner, P.E.M. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 564–569. [CrossRef]
16. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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.* **2015**, *17*, 405–424. [CrossRef]
17. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C.E.; Albarca Aguilera, M.; Meyer, R.; Massouras, A. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. Oxford Bioinformatics, bty897. 30 October 2018. Available online: <https://varsome.com/> (accessed on 22 July 2020).
18. ClinVar. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> (accessed on 22 July 2020).
19. Bayley, J.P.; Launonen, V.; Tomlinson, I.P. The FH mutation database: An online database of fumarate hydratase mutations involved in the MCUL (HLRCC) tumor syndrome and congenital fumarase deficiency. *BMC Med. Genet.* **2008**, *9*, 20. [CrossRef]
20. Dik, E.; Naamati, A.; Asraf, H.; Lehming, N.; Pines, O. Human Fumarate Hydratase Is Dual Localized by an Alternative Transcription Initiation Mechanism. *Traffic* **2016**, *17*, 720–732. [CrossRef]

21. Fokkema, I.F.; Taschner, P.E.; Schaafsma, G.C.; Celli, J.; Laros, J.F.; den Dunnen, J.T. LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 557–563. [\[CrossRef\]](#)
22. Bulku, A.; Weaver, T.M.; Berkmen, M.B. Biochemical Characterization of Two Clinically-Relevant Human Fumarase Variants Defective for Oligomerization. *Open Biochem. J.* **2018**, *12*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
23. Sanz-Ortega, J.; Vocke, C.; Stratton, P.; Linehan, W.M.; Merino, M.J. Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* **2013**, *37*, 74–80. [\[CrossRef\]](#)
24. Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218. [\[CrossRef\]](#)
25. Linehan, W.M.; Rouault, T.A. Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer—Targeting the Warburg effect in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3345–3352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Yang, M.; Su, H.; Soga, T.; Kranc, K.R.; Pollard, P.J. Prolyl hydroxylase domain enzymes: Important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia* **2014**, *2*, 127–142. [\[PubMed\]](#)
27. Ooi, A.; Wong, J.C.; Petillo, D.; Roossien, D.; Perrier-Trudova, V.; Whitten, D.; Min, B.W.; Tan, M.H.; Zhang, Z.; Yang, X.J.; et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 511–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Sandhu, I.S.; Maksim, N.J.; Amouzougan, E.A.; Gallion, B.W.; Raviele, A.L.; Ooi, A. Sustained NRF2 activation in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and in hereditary tyrosinemia type 1 (HT1). *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 650–656. [\[CrossRef\]](#)
29. Sciacovelli, M.; Frezza, C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J.* **2017**, *284*, 3132–3144. [\[CrossRef\]](#)
30. Forde, C.; Lim, D.H.K.; Alwan, Y.; Burghel, G.; Butland, L.; Cleaver, R.; Dixit, A.; Evans, D.G.; Hanson, H.; Lalloo, F.; et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer: Clinical, Molecular, and Screening Features in a Cohort of 185 Affected Individuals. *Eur. Urol. Oncol.* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
31. Wang, C.; Tetzlaff, M.; Hick, R.; Duvic, M. Reed syndrome presenting with leiomyosarcoma. *JAAD Case Rep.* **2015**, *1*, 150–152. [\[CrossRef\]](#)
32. Stewart, L.; Glenn, G.M.; Stratton, P.; Goldstein, A.M.; Merino, M.J.; Tucker, M.A.; Linehan, W.M.; Toro, J.R. Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch. Dermatol.* **2008**, *14*, 1584–1592. [\[CrossRef\]](#)
33. Okolo, S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2008**, *22*, 571–588. [\[CrossRef\]](#)
34. Walker, C.L.; Stewart, E.A. Uterine fibroids: The elephant in the room. *Science* **2005**, *308*, 1589–1592. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tal, R.; Segars, J.H. The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: Potential implications for future therapy. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 194–216. [\[CrossRef\]](#)
36. Pollard, P.; Wortham, N.; Barclay, E.; Alam, A.; Elia, G.; Manek, S.; Poulosom, R.; Tomlinson, I. Evidence of increased microvessel density and activation of the hypoxia pathway in tumours from the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *J. Pathol.* **2005**, *205*, 41–49. [\[CrossRef\]](#)
37. Bonsib, S.M. Renal cystic diseases and renal neoplasms: A mini-review. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 1998–2007. [\[CrossRef\]](#)
38. Adam, J.; Hatipoglu, E.; O’Flaherty, L.; Ternette, N.; Sahgal, N.; Lockstone, H.; Baban, D.; Nye, E.; Stamp, G.W.; Wollhuter, K.; et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: Roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 524–537. [\[CrossRef\]](#)
39. Ristau, B.T.; Kamat, S.N.; Tarin, T.V. Abnormal Cystic Tumor in a Patient with Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome: Evidence of a Precursor Lesion? *Case Rep. Urol.* **2015**, *2015*, 303872. [\[CrossRef\]](#)
40. Schmidt, L.S.; Linehan, W.M. Genetic predisposition to kidney cancer. *Semin. Oncol.* **2016**, *43*, 566–574. [\[CrossRef\]](#)
41. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 135–145. [\[CrossRef\]](#)

42. Pollard, P.J.; Brière, J.J.; Alam, N.A.; Barwell, J.; Barclay, E.; Wortham, N.C.; Hunt, T.; Mitchell, M.; Olpin, S.; Moat, S.J.; et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 2231–2239. [[CrossRef](#)]
43. Grubb, R.L.; Franks, M.E.; Toro, J.; Middelton, L.; Choyke, L.; Fowler, S.; Torres-Cabala, C.; Glenn, G.M.; Choyke, P.; Merino, M.J.; et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: A syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *J. Urol.* **2007**, *177*, 2074–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Merino, M.J.; Torres-Cabala, C.; Pinto, P.; Linehan, W.M. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* **2007**, *31*, 1578–1585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Menko, F.H.; Maher, E.R.; Schmidt, L.S.; Middelton, L.A.; Aittomäki, K.; Tomlinson, I.; Richard, S.; Linehan, W.M. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): Renal cancer risk, surveillance and treatment. *Fam. Cancer* **2014**, *13*, 637–644. [[CrossRef](#)]
46. Trpkov, K.; Hes, O.; Agaimy, A.; Bonert, M.; Martinek, P.; Magi-Galluzzi, C.; Kristiansen, G.; Lüders, C.; Nesi, G.; Compérat, E.; et al. Fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma is strongly correlated with fumarate hydratase mutation and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, *40*, 865–875. [[CrossRef](#)]
47. Scelo, G.; Larose, T.L. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 3574–3581. [[CrossRef](#)]
48. Moch, H.; Cubilla, A.L.; Humphrey, P.A.; Reuter, V.E.; Ulbright, T.M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* **2016**, *70*, 93–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ravaud, A.; Oudard, S.; De Fromont, M.; Chevreau, C.; Gravis, G.; Zanetta, S.; Theodore, C.; Jimenez, M.; Sevin, E.; Laguerre, B.; et al. First-line treatment with sunitinib for type 1 and type 2 locally advanced or metastatic papillary renal cell carcinoma: A phase II study (SUPAP) by the French Genitourinary Group (GETUG). *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 1123–1128. [[CrossRef](#)]
50. Srinivasan, R.; Gurrarn, S.; Al Harthy, M.; Singer, E.A.; Sidana, A.; Shuch, B.M.; Ball, M.W.; Friend, J.C.; Mac, L.; Purcell, E.; et al. Results from a phase II study of bevacizumab and erlotinib in subjects with advanced hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) or sporadic papillary renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38* (Suppl. S15), 5004. [[CrossRef](#)]
51. ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Hereditary+Leiomyomatosis+and+Renal+Cell+Cancer&draw=1&rank=1#rowId0> (accessed on 13 September 2020).
52. Suarez Rodriguez, C.; Larkin, J.M.G.; Patel, P.; Pérez Valderrama, B.; Rodriguez-Vida, A.; Glen, H.; Thistlethwaite, F.; Ralph, C.; Srinivasan, G.; Mendez Vidal, M.J.; et al. Overall survival results for durvalumab and savolitinib in metastatic papillary renal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38* (Suppl. S6), 619. [[CrossRef](#)]
53. Matyakhina, L.; Freedman, R.J.; Bourdeau, I.; Wei, M.H.; Stergiopoulos, S.G.; Chidakel, A.; Walther, M.; Abu-Asab, M.; Tsokos, M.; Keil, M.; et al. Hereditary leiomyomatosis associated with bilateral, massive, macronodular adrenocortical disease and atypical cushing syndrome: A clinical and molecular genetic investigation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 3773–3779. [[CrossRef](#)]
54. Hammarstedt, L.; Muth, A.; Wängberg, B.; Björnelid, L.; Sigurjónsdóttir, H.A.; Götherström, G.; Almqvist, E.; Widell, H.; Carlsson, S.; Ander, S.; et al. Adrenal lesion frequency: A prospective, cross-sectional CT study in a defined region, including systematic re-evaluation. *Acta Radiol.* **2010**, *51*, 1149–1156. [[CrossRef](#)]
55. Lattouf, J.B.; Pautler, S.E.; Reaume, M.N.; Kim, R.H.; Care, M.; Green, J.; So, A.; Violette, P.D.; Saliba, I.; Major, P.; et al. Kidney Cancer Research Network of Canada. Structured assessment and followup for patients with hereditary kidney tumour syndromes. *Can. Urol. Assoc. J.* **2016**, *10*, E214–E222. [[CrossRef](#)]
56. Graumann, O.; Osther, S.S.; Osther, P.J. Characterization of complex renal cysts: A critical evaluation of the Bosniak classification. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **2011**, *45*, 84–90. [[CrossRef](#)]
57. Linton, J.M.; Martin, G.R.; Reichardt, L.F. The ECM Protein Nephronectin Promotes Kidney Development via Integrin alpha8beta1-mediated Stimulation of Gdnf Expression. *Development* **2007**, *134*, 2501–2509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Fujiwara, H.; Ferreira, M.; Donati, G.; Marciano, D.K.; Linton, J.M.; Sato, Y.; Hartner, A.; Sekiguchi, K.; Reichardt, L.F.; Watt, F.M. The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* **2011**, *144*, 577–589. [[CrossRef](#)]

59. Cook, J.D.; Walker, C.L. The Eker rat: Establishing a genetic paradigm linking renal cell carcinoma and uterine leiomyoma. *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 813–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yang, Y.; Valera, V.A.; Padilla-Nash, H.M.; Sourbier, C.; Vocke, C.D.; Vira, M.A.; bu-Asab, M.S.; Bratslavsky, G.; Tsokos, M.; Merino, M.J.; et al. UOK 262 cell line, fumarate hydratase deficient (FH-/FH-) hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma: In vitro and in vivo model of an aberrant energy metabolic pathway in human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2010**, *196*, 45–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Supplementary Materials: Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome in Spain: Clinical and Genetic Characterization

A. Beatriz Sánchez-Heras, Adela Castillejo, Juan D. García-Díaz, Mercedes Robledo, Alexandre Teulé, Rosario Sánchez, Ángel Zúñiga, Enrique Lastra, Mercedes Durán, Gemma Llord, Carmen Yagüe, Teresa Ramon y Cajal, Consol López San Martín, Adrià López-Fernández, Judith Balmaña, Luis Robles, José M. Mesa-Latorre, Isabel Chirivella, María Fonfria, Raquel Perea Ibañez, M. Isabel Castillejo, Inés Escandell, Luis Gomez, Pere Berbel and Jose Luis Soto

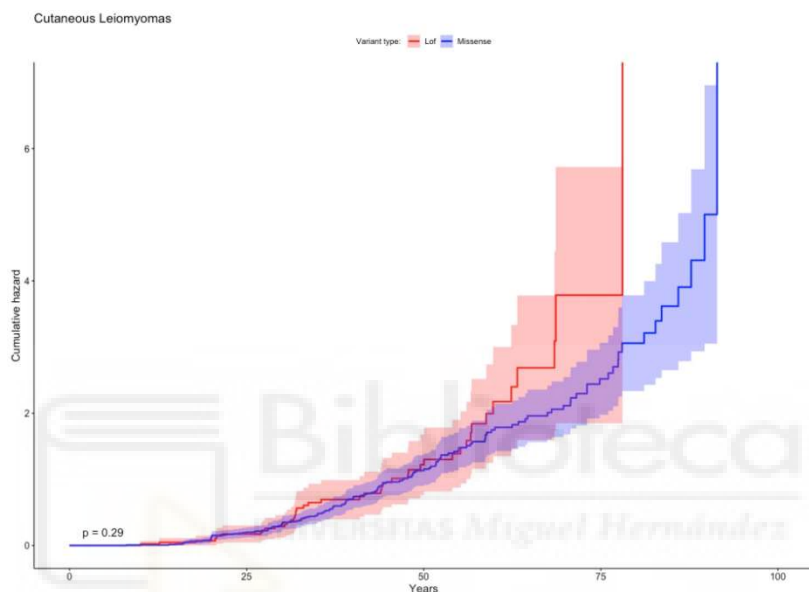


Figure S1. Cumulative incidence of cutaneous leiomyomas by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals.

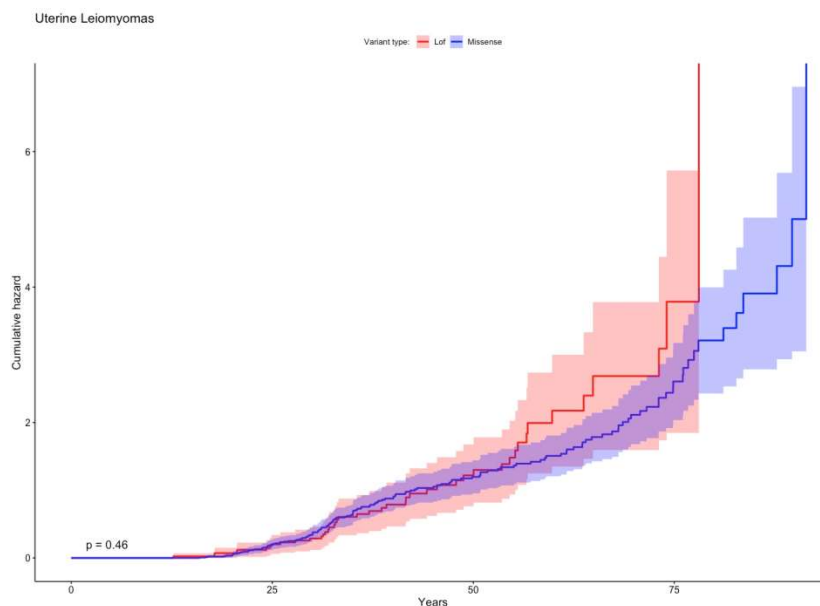


Figure S2. Cumulative incidence of uterine leiomyomas by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals.

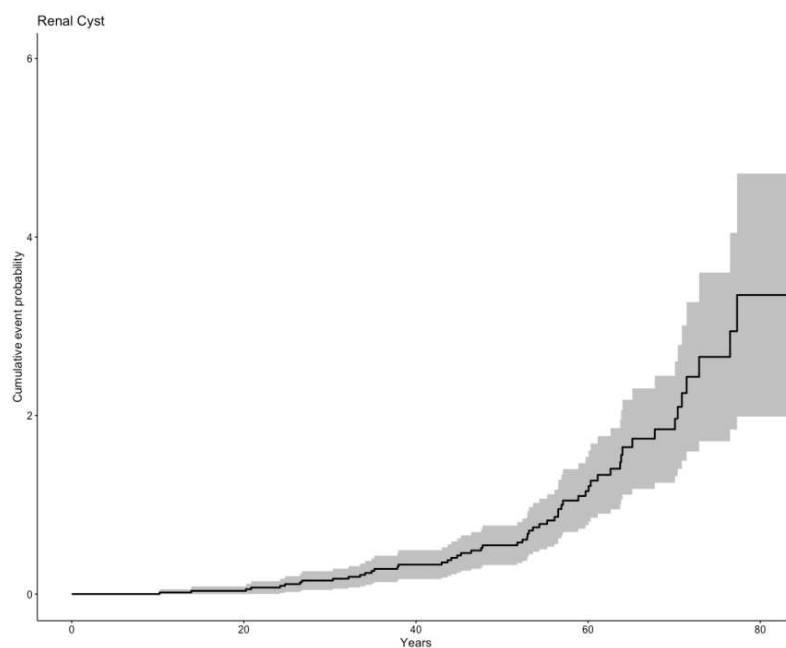


Figure S3. Cumulative incidence of renal cysts.

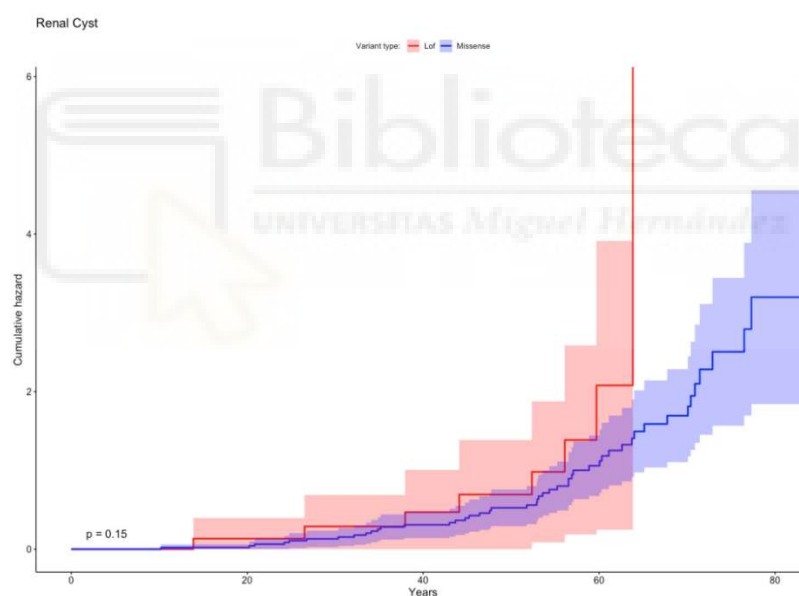


Figure S4. Cumulative incidence of renal cysts by variant type. Light-colored areas represent confidence intervals.

Table S2. Univariate analysis for Cutaneous Leiomyomas, Uterine Leiomyomas, Renal Cysts, Renal Cell Cancer and risk factors.

| Clinical Manifestations | CLM | | ULM | | RCy | | RCC | |
|-------------------------|---------------|----------|--------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|
| | N af / T (%) | p- Value | N af T/ (%) | p- Value | N af / T (%) | p- Value | N af / T (%) | p- Value |
| Variant type | | | | | | | | |
| Missense | 97/141 (68.8) | 0.038* | 75/78 (96.1) | 0.001* | 49/115 (42.6) | 0.017* | 13/133 (9.8) | 0.412* |
| Lof | 21/41 (51.2) | | 18/25 (72) | | 8/38 (21) | | 6/42 (14.3) | |
| Gender | | 0.272* | | - | | 0.566* | | 0.236* |

| | | | | | | |
|--------------|------------------|--------|-----------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Male | 49/81 (60.5) | - | 24/69 (34.8) | 11/79 (14) | | |
| Female | 69/101 (68.3) | - | 33/84 (39.3) | 8/96 (8.3) | | |
| Obesity | | | | | | |
| No | 92/149 (61.7) | 0.669* | 71/80 (88.7) | 47/136 (34.5) | 14/148 (9.5) | 1 [†] |
| Yes | 10/14 (71.4) | | 8/8 (100) | 8/12 (66.6) | 1/13 (7.7) | |
| HBP | | | | | | |
| No | 84/132 (63.6) | 0.848* | 67/76 (88.1) | 40/119 (33.6) | 11/129 (8.5) | 1 [†] |
| Yes | 19/29 (65.5) | | 10/10 (100) | 13/27 (48.1) | 3/30 (10) | |
| Phy.activity | | | | | | |
| No | 82/136 (60.3) | 0.378* | 67/75 (89.3) | 44/123 (35.7) | 9/134 (6.7) | 0.126 [†] |
| Yes | 10/13 (76.9) | | 5/5 (100) | 3/11 (27.3) | 3/13 (23.1) | |
| Tobacco | | | | | | |
| No | 59/102 (57.8) | 0.196* | 55/62 (88.7) | 29/93 (31.2) | 9/102 (8.8) | 0.510* |
| Yes | 35/51 (68.6) | | 18/20 (90) | 21/45 (46.6) | 6/49 (12.2) | |

CLM: cutaneous leiomyomas; ULM: uterine leiomyomas; RCy: renal cyst; RCC: renal cell carcinoma; N af, no. affected; T, total; LoF: Loss of Function; HBP: high blood pressure; Phy.activity: vigorous physical activity; *X² test; [†]Fisher's exact test.

Table S3. Multivariate logistic regression model for Cutaneous Leiomyomas, Uterine Leiomyomas, Renal Cysts, Renal Cell Cancer and risk factors.

| Clinical Manifestations | CLM | | ULM | | RCy | | RCC | |
|-------------------------|------------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|----------------------|----------|
| | OR (95% CI) | p-Value* | OR (95% CI) | p-Value* | OR (95% CI) | p-Value* | OR (95% CI) | p-Value* |
| Variant type | | | | | | | | |
| Missense | Ref. 0,27 | - | Ref. 0,07 | - | Ref. 0,23 | - | Ref. 0,98 | - |
| LoF | (0,11- 0,64) | 0,003 | (0,01- 0,43) | 0,004 | (0,07- 0,64) | 0,013 | (0,23- 4,12) | 0,978 |
| Obesity | | | | | | | | |
| No | Ref. 1,18 | - | Ref. - | - | Ref. 2,51 | - | Ref. 1,16 | - |
| Yes | (0,32- 4,29) | 0,801 | Inf (0, inf) | 0,996 | (0,66- 9,56) | 0,177 | (0,12- 11,45) | 0,896 |
| HBP | | | | | | | | |
| No | Ref. 1,11 | - | Ref. - | - | Ref. 1,44 | - | Ref. 0,97 | - |
| Yes | (0,43- 2,86) | 0,836 | Inf (0, inf) | 0,996 | (0,54- 3,86) | 0,468 | (0,18- 5,19) | 0,968 |
| Phy.activity | | | | | | | | |
| No | Ref. 2,81 | - | Ref. - | - | Ref. 0,83 | - | Ref. - | - |
| Yes | (0,67- 11,71) | 0,156 | Inf (0, inf) | 0,997 | (0,19- 3,59) | 0,804 | 4,21 (0,9- 19,55) | 0,067 |
| Tobacco | | | | | | | | |
| No | Ref. | - | Ref. | - | Ref. | - | Ref. | - |

| | | | | | | | | |
|-----|-------------------------|-------|--------------------------|------|--------------------------|-------|--------------------|-------|
| Yes | 1,55 (0,71- 3,40) | 0,272 | 1,43 (0,13- 15,96) | 0,77 | 2,43 (1,07- 5,509) | 0,033 | 0,93 (0,25-3,5) | 0,916 |
|-----|-------------------------|-------|--------------------------|------|--------------------------|-------|--------------------|-------|

CLM: cutaneous leiomyomas; ULM: uterine leiomyomas; RCy: renal cyst; RCC: renal cell carcinoma; LoF: Loss of Function; OR: Odd Ratio; HBP: high blood pressure; Phy.activity: vigorous physical activity; * Wald's test.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



| NM_000143.3(FH) Variant | Change in protein | Molecular consequence | location | GnomAD | ClinVar (22/06/2020) | FH_LOVD | Evidences for classification VarSome ¹ (22/06/2020) | Clinical significance ² | Type of variant | Nº Families / Nº individuals (males/females) | Origin | Cutaneous leiomyomast | Uterine leiomyomast | Renal cysts | Renal cancer |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------|----------|-------------|------------------------------|------------------------------|--|------------------------------------|-----------------|--|----------|-----------------------|---------------------|-------------|--------------|
| c.1-?_1533A>?del | p.? | Deletion | 1-10 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 2/6(4:2) | Spain | 2/6 | 1/2 | 2/4 | 0/6 |
| c.133-?_267?del | p? | Deletion | Exon 2 | nr | nr | nr | PVS1 | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 |
| c.139C>T | p.Gln477er | Nonsense | Exon 2 | nr | Pathogenic ** | nr | PVS1, PM2, PP3, PPS | 5 | LoF | 2/2(0:2) | Spain | 2/2 | 1/2 | ? | 0/2 |
| c.267+1_267+10delGTAAGTGCCA | p.? | Splicing | Intron 2 | nr | Pathogenic* | Pathogenic | PVS1, PM2, PPS | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 |
| c.301C>T | p.Arg101Ter | Nonsense | Exon 3 | nr | Pathogenic ** | Likely Pathogenic | PVS1, PM2, PP3, PPS | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 |
| c.349G>C | p.Ala117Pro | Missense | Exon 3 | nr | Pathogenic ** | Pathogenic | PS4, PM2, PP1, PP3, PPS | 4 | Missense | 2/2(1:2) | Spain | 2/2 | 2/2 | ? | 0/3 |
| c.395delT | p.Leu132Ter | Frameshit | Exon 4 | nr | Pathogenic* | nr | PVS1, PM2, PP3, PPS | 5 | LoF | 3/16(5:11) | Spain | 1/15 | 6/10 | ? | 2/16 |
| c.553delC | p.Gln185Arg5Ter17 | Frameshit | Exon 4 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 1/1 | ? | ? |
| c.555+1G>A | p.? | Splicing | Intron 4 | nr | Likely pathogenic* | Likely Pathogenic | PVS1, PM2, PP3, PPS | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 |
| c.563A>G | p.Asn188Ser | Missense | Exon 5 | nr | nr | VUS | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense | 1/2(1:1) | Spain | 1/2 | 0/1 | 0/1 | 0/1 |
| c.575C>T | p.Pro192Leu | Missense | Exon 5 | nr | Conflicting interpretations* | VUS | PM1, PM2, PP1, PP3 | 4 | Missense | 4/11(4:7) | Spain | 11/11 | 7/7 | 5/11 | 0/11 |
| c.697C>T | p.Arg233Cys | Missense | Exon 5 | nr | Pathogenic ** | Pathogenic/VUS | PM1, PM2, PP3, PPS | 5 | Missense | 5/10(5:5) | Spain | 5/9 | 4/4 | 3/6 | 0/6 |
| c.698G>A | p.Arg233His | Missense | Exon 5 | 0.000007459 | Pathogenic ** | Pathogenic/VUS | PS3, PM5, PP1, PP3, PPS | 5 | Missense | 4/7(2:5) | Spain | 4/6 | 4/4 | 1/1 | 1/3 |
| c.703C>T | p.His235Tyr | Missense | Exon 5 | 0.000004065 | Likely pathogenic* | nr | PM2, PM5, PP1, PP3, PPS | 4 | Missense | 1/1(0:1) | Spain | ? | ? | ? | 0/1 |
| c.845G>T | p.Gly282Val | Missense | Exon 6 | nr | nr | pathogenic/VUS | PM2, PP3, PP1, PPS | 4 | Missense | 3/6(2:4) | Spain | 5/5 | 3/4 | 3/4 | 1/5 |
| c.893del | p.Ala298Val5Ter31 | Frameshit | Exon 6 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/2(0:2) | Spain | 2/2 | 1/1 | 0/1 | 0/1 |
| c.905-2A>G | p.? | Splicing | Intron 6 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/1(1:0) | Spain | 1/1 | - | 1/1 | 0/1 |
| c.965T>G | p.Val322Gly | Missense | Exon 7 | 0.000003980 | Conflicting interpretations* | nr | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense | 1/1(0:1) | Spain | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 |
| c.974delG | p.Ser325Met5Ter4 | Frameshit | Exon 7 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/1(1:2) | Spain | 1/1 | ? | 0/1 | 1/1 |
| c.1108-?_1236-?del | p.? | Deletion | Exon 8 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 3/6(1:5) | Spain | 4/5 | 4/4 | 3/6 | 1/6 |
| c.1112A>G | p.Lys371Arg | Missense | Exon 8 | nr | nr | nr | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense | 1/1(1:0) | Peru | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 |
| c.1118A>G | p.Asn373Ser | Missense | Exon 8 | nr | Conflicting interpretations* | Pathogenic/VUS | PS3, PS4, PM2, PP1, PP3, PPS | 5 | Missense | 32/109(51:88) | Spain | 64/104 | 55/56 | 36/81 | 10/101 |
| c.1126delC | p.Gln376Ser5Ter5 | Frameshit | Exon 8 | nr | nr | nr | PVS1, PM1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/6(4:2) | Spain | 5/6 | 2/2 | 0/6 | 0/6 |
| c.1189G>A | p.Gly397Arg | Missense | Exon 8 | 0.000004222 | Pathogenic ** | Pathogenic/likely pathogenic | PS3, PM2, PP3, PPS | 4 | Missense | 2/2(0:2) | Colombia | 1/2 | 2/2 | 0/2 | 0/2 |
| c.1217A>C | p.Asn406Thr | Missense | Exon 8 | nr | nr | nr | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense | 1/1(1:0) | Cuba | 1/1 | - | 0/1 | 0/1 |
| c.1240A>G | p.Lys414Glu | Missense | Exon 9 | nr | nr | nr | PM1, PM2, PP2, PP3 | 4 | Missense | 1/1(0:1) | Belarus | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| c.1237-?_1390-?> | p.? | Deletion | Exon 9 | nr | nr | nr | PVS1, PM2, PP3 | 5 | LoF | 1/1(0:1) | Spain | ? | 1/1 | ? | 1/1 |

Supplementary table 1. FH germline variants classifications and phenotype characteristics of HLRC families.

nr: not reported

1: Evidences from VarSome database; PVS_ : pathogenic very strong ; PS_ : pathogenic strong PM_ : pathogenic moderate ; PP_ : pathogenic supporting.

2: ACMG classification criteria. 4: probably pathogenic; 5: pathogenic.

+ Confirmed clinical information

LoF: loss of function

* single submitter or criteria provided with conflicting interpretations

** criteria provided, multiple submitters with no conflicts

ANEXO II

Artículo 2 derivado de la presente Tesis Doctoral pendiente de publicación

Remitido a revista de primer cuartil.

Genetic and clinical characterization of a novel *FH* founder mutation in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome

Authors:

Ana Beatriz Sánchez-Heras^{1*}, Estela Dámaso^{2*}, Adela Castillejo², Mercedes Robledo³, Alexandre Teulé⁴, Conxi Lázaro⁴, Rosario Sánchez-Martínez⁵, Ángel Zúñiga⁶, Adrià López-Fernández⁷, Judith Balmaña⁷, Luis Robles⁸, Teresa Ramon y Cajal⁹, M. Isabel Castillejo², Raquel Perea Ibañez¹, Carmen Martínez Sevilla¹, Andrea Sánchez-Mira², Inés Escandell¹⁰, Luís Gómez¹¹, Pere Berbel¹², José Luis Soto².

Affiliations:

1. Cancer Genetic Counselling Unit, Medical Oncology Department. Hospital General Universitario de Elche. Elche, Alicante. Spain
2. Molecular Genetics Laboratory, Hospital General Universitario de Elche. Elche, Alicante. Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia Region (FISABIO), FISABIO- Elche Health Department, Spain
3. Hereditary Endocrine Cancer, Human Cancer Genetics Programme Spanish National Cancer Centre (CNIO). Madrid. Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, 28029 Madrid, Spain
4. Hereditary Cancer Program, Program in Molecular Mechanisms and Experimental Therapy in Oncology (Oncobell), IDIBELL, Catalan Institute of Oncology, l'Hospitalet del Llobregat, Spain
5. Multidisciplinary Rare disease unit. Internal medicine department. Alicante University General Hospital; Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, Spain.
6. Clinical Genetics Unit, Hospital Politécnico y Universitario La Fe. Valencia. Spain
7. Hereditary Cancer Genetics Group, VHIO, and Medical Oncology Department, Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, Spain
8. Medical Oncology Department. Hospital 12 de Octubre. Madrid, Spain
9. Familiar Cancer Clinic. Medical Oncology Department, Santa Creu i Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain
10. Servicio de Dermatología. Hospital General Universitario de Elda. Elda, Alicante. Spain
11. Urology Department. Hospital General Universitario de Elche. Elche, Alicante. Spain.
12. Departamento de Histología y Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain

*The first two authors contributed equally to this work

Correspondence:

Ana Beatriz Sánchez-Heras, Cancer Genetic Counselling Unit, Medical Oncology Department. Hospital General Universitario de Elche. 03203 Elche (Alicante). Spain. Email: sanchez_ana@gva.es

ABSTRACT

Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome is a rare autosomal dominant hereditary syndrome. Previously, we published the largest cohort of *FH* mutation carriers in Spain and observed a highly recurrent missense heterozygous variant, *FH*(NM_000143.4):c.1118A>G p.(Asn373Ser), in 104 individuals from 31 apparently unrelated families. Here, we aimed to establish its founder effect and characterize the associated clinical phenotype. This was a multicenter, retrospective study of heterozygote carriers of the pathogenic *FH* c.1118A>G variant. Haplotype construction was performed using 38 flanking *FH* polymorphic markers. We collected clinical information from medical records and compared it to *FH* loss-of-function variant carriers. Haplotype analysis confirmed that families shared a common haplotype (32/38 markers) spanning 0.61–0.82 Mb, indicating this recurrent variant was inherited from a founder ancestor. Cutaneous and uterine leiomyomatosis were diagnosed in 64.6% (64/99) and 98% (50/51) of patients, respectively, and renal cell cancer was present in 10.4% (10/96). The pathogenic *FH*_c.1118A>G variant is a Spanish founder mutation that originated 12–26 generations ago. Individuals carrying this founder mutation had a lower frequency of renal cell cancer and a higher frequency of leiomyomas than those in other cohorts of this syndrome. The characterization of founder mutations provides accurate and specific information regarding their penetrance and expressivity.

KEYWORDS

Haplotypes, founder mutation, common ancestor, hereditary leiomyomatosis, *FH*, renal cell cancer, fumarate hydratase, leiomyoma

INTRODUCTION

Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) syndrome (OMIM 605839) was first described by Reed et al. in 1973 [1]. Tomlinson et al. confirmed that it is caused by heterozygous pathogenic variants in the gene encoding fumarate hydratase (*FH*) [2]. As a consequence, the deficient *FH* enzyme leads to tricarboxylic acid cycle failure and energy metabolic alterations. Heterozygous carriers may develop cutaneous leiomyomas (CLM) and uterine leiomyomas (ULM), renal cysts (RCys), and renal cell cancer (RCC) [2–8] and other tumors, such as paragangliomas or suprarenal adenomas [9,10]. Homozygous carriers suffer from *FH* deficiency (OMIM 606812), which is a metabolic disorder presenting with severe encephalopathy and a short life expectancy [11]. Therefore, it is essential to offer genetic counselling to heterozygous carriers of mutations in *FH*.

HLRCC is considered as a rare disease with scarce data available regarding its prevalence [6,12]. We previously published a series of 197 patients from Spain [13], in which we described 27 germline variants in *FH* and observed a highly recurrent missense variant, *FH*(NM_000143.4):c.1118A>G p.(Asn373Ser), in 104 individuals from 31 apparently unrelated families, the majority of whom were from the Alicante province in the southeast of Spain.

Recurrent variants may be generated by independent mutational events, suggesting mutation hotspots, or be inherited from a common ancestor, initially evidenced by a founder effect. Testing for founder variants affords a faster molecular diagnosis by avoiding the screening of all possible gene variants, thus rendering the process more cost-effective. Moreover, the characterization of founder mutations provides a unique model with accurate and specific information regarding the penetrance and expressivity of clinical manifestations, especially in rare diseases, such as HLRCC.

Our aim was to establish the founder effect of the missense pathogenic *FH* c.1118A>G variant and to describe the clinical characteristics associated with its heterozygous carriers.

PATIENTS AND METHODS

Patients and data collection

Carriers and obligate carriers of the *FH* c.1118A>G variant from families with a genetic diagnosis of HLRCC from different hospitals in Spain were included in the present study. All patients gave written informed consent for genetic testing according to the Spanish legislation. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital General Universitario de Elche on January 25, 2018 (code 42/2017).

We collected clinical information from medical records, such as the presence and age of diagnosis of CLM, ULM, RCy, and RCC. RCC was confirmed by histological examination of biopsies or resected tumors. Imaging procedures, such as CT, magnetic resonance imaging, or ultrasound, were used to diagnose RCy. To assess the clinical phenotype associated with this variant and to identify genotype–phenotype correlations, we compared our cohort with individuals carrying loss-of-function (LoF) variants, including large deletions and nonsense, frameshift, and splicing pathogenic variants previously published by our group [13].

Samples

Twenty-seven unrelated *FH*(NM_000143.4): c.1118A>G heterozygous carriers were selected for the haplotype study. In addition, 20 noncancer healthy controls with confirmed absence of this variant were selected as the control population. Isolation of genomic DNA from the peripheral blood of all patients included in the study was performed using a QIAamp DNA Mini Kit and QIAcube (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Haplotype analysis

Haplotype construction was performed using 38 polymorphic markers (microsatellite markers and single-nucleotide variants) flanking *FH* and covering nearly 14 Mb. Ten microsatellite markers covering the *FH* locus were selected from the MapViewer database. Microsatellite markers were selected based on the following criteria: 1) physical position around the *FH* locus, 2) high heterozygosity (>0.5), and 3) inclusion of dinucleotide repeats.

In addition, 28 single-nucleotide variants located around the *FH* locus and exhibiting an allele frequency in the non-Finnish European population (GnomAD) between 0.25 and 0.75 were selected. PCR amplicons including more than one variant were designed when no evidence of linkage was found. The selected markers and their genomic position are presented in Figure S1.

Time of most recent common ancestor (TMRCA) calculation

The age of the mutation was estimated using the single marker method based on the expected decay of linkage, as previously reported [14]. Marshfield genetic distances (cM) and physical distances (Mb) were obtained from the Ensembl and UCSC databases, respectively

[15,16]. Estimation of the most recent common ancestor was performed assuming an average of 25 years between generations.

Statistics analyses

We used the R software (R Foundation for Statistical Computing), version 3.6.0, for the statistical analyses. The qualitative variables are presented as percentages, and the continuous quantitative variables are described as the mean and standard deviation (SD) or as the median and the interquartile range (IQR). Categorical variables were compared using the chi-squared and Fisher's exact tests and multivariate logistic regression. Odds ratio (ORs) were calculated to estimate the strength of the association between variables. The confidence level used was the 95% confidence interval (95% CI). Significance was set at $P < 0.05$. The cumulative incidence of events was estimated using the cumulative hazard function.

RESULTS

Haplotype characterization

For haplotype characterization, index cases were selected from each individual family. We included 20 families from the same geographic area (Alicante province) and seven families from other Spanish regions. Moreover, we included 20 unrelated healthy controls for TMRCA calculations as nonaffected chromosome carriers.

The haplotype analysis confirmed that families shared a common haplotype (32/38 markers) spanning between 0.61 and 0.82 Mb (1.40–1.89 cM) (Table 1). We identified a conserved haplotype that cosegregated with the mutation and was absent in healthy controls. This result strongly suggests that the *FH* c.1118A>G variant is a founder mutation, thus ruling out the recurrent mutation hotspot hypothesis.

The mutation age was estimated using a single marker method [17], with D1S2785 and D1S2842 as main recombinant markers, based on the genotypes observed on affected chromosomes. The estimated number of generations since the appearance of the most recent common ancestor was between 12 and 26 (Table S1). Assuming 25 years per generation, the founder *FH* mutation arose between 300 and 650 years ago (ca. 1370–1720).

TABLE 1 Minimum common haplotype among 20 FH c.1118A>G carrier families (the variant is highlighted in red). All carriers shared a common 0.61–0.82 Mb haplotype (yellow) delimited by the D152785 and D152842 microsatellite markers. The minimum common shared haplotype is indicated at the bottom by an arrow

| # Proband | D152800 | D152670 | rs922305 | D152785 | rs2275742 | rs7520707 | rs2500241 | rs538423 | rs9428497 | rs2502432 | rs2815839 | D15304 | rs665888 | rs6691012 | rs12567677 | D15180 | D15204 | rs2185626 | FH c.1118A>G | rs4660099 | rs4659607 | rs6673988 | rs10926500 | rs955622273 | rs12076929 | rs661244 | D15547 | rs616593 | rs646355 | rs12030661 | rs12033126 | rs6429282 | rs6663216 | rs6663223 | rs6660705 | D152842 | rs2636324 | D152811 | D152682 | | | |
|-----------|---------|---------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|--------|----------|-----------|------------|--------|--------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|------------|----------|--------|----------|----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|---------|-----|-----|---|
| 1 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | 141 | |
| 2 | - | - | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | 141 | |
| 3 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | - | |
| 4 | - | - | - | - | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 5 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 6 | - | - | T | - | - | - | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | 141 | |
| 7 | - | - | - | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 8 | - | - | T | 170 | T | G | - | T | - | - | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | - | | |
| 9 | - | - | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | - | - | - | |
| 10 | - | - | - | - | - | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | A | - | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | | |
| 11 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | - | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | - | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 12 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | 164 | - |
| 13 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | - | |
| 14 | - | 131 | - | - | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 15 | - | - | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | - | - | |
| 16 | - | - | T | - | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | - | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | - | - | - | |
| 17 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 18 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | - | |
| 19 | - | - | - | - | T | - | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | T | 164 | 141 | - | |
| 20 | - | 131 | T | 170 | T | G | C | T | A | A | A | T | 175 | A | G | A | 178 | 170 | G | G | A | A | C | A | C | T | C | 294 | G | C | C | T | A | A | A | A | T | - | - | - | - | |

Minimum shared haplotype (0.61–0.82 Mb)

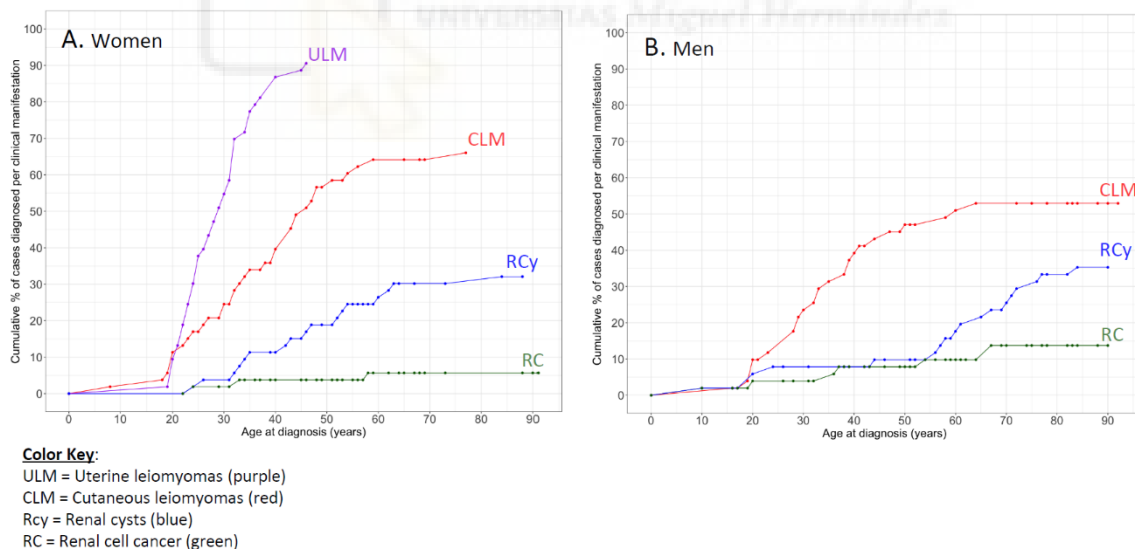
Clinical findings

In total, 104 patients belonging to 31 different families were heterozygous carriers of the *FH* c.1118A>G variant; they comprised 31 index cases and 73 relatives. This group included 53 women (51%) and 51 men (49%) with a mean age of 53.3 (range, 12–91) years; 94 patients from 26 families originated from the province of Alicante in southeast Spain. The estimated prevalence of HLRCC due to founder variant in this province is 6.26/100,000 inhabitants.

Ninety-nine patients had undergone a dermatological examination and 64 presented CLM (64.6%; 36 women, 28 men). The median age of diagnosis was 35.8 (SD, 13.6) years (Figure 1). Compared with patients carrying LoF variants, the frequency of CLM was higher in the present cohort (Table S2). We did not detect differences according to sex. The majority of the relatives were diagnosed with CLM by dermatological examination after positive result on genetic testing. No cases of cutaneous leiomyosarcoma were detected.

Fifty out of the 51 women (98%) who had a gynecological exam had ULM at a median age of 28.7 (SD, 6.8) years (Figure 1). This frequency was higher than that detected in women with LoF variants (Table S2). One case was operated at 21 years because of a growing myoma and received a pathological diagnosis of leiomyosarcoma. She had complementary treatment with pelvic radiotherapy. A new pathological review has diagnosed the lesion as an atypical leiomyoma.

FIGURE 1 Cumulative incidence based on age at diagnosis of different clinical manifestations in *FH* c.1118A>G carriers according to sex: women (A) and men (B). Uterine leiomyomas are indicated in purple, cutaneous leiomyomas in red, renal cysts in blue, and renal cell cancer in green.



RCys were detected in 36 out of the 85 (42.4%) patients who had undergone imaging examinations, 18 (50%) women and 18 (50%) men, at a median age of 50.9 (SD, 19.5) years. These frequencies were higher than those observed in individuals with LoF variants (Table S2). In a patient diagnosed at 21 years of age with a large renal cyst, the pathological examination showed atypia in the cyst wall.

We confirmed the clinical information in 96 patients, 10 of whom presented with RCC (10.4%; seven men and three women). A woman had two synchronous bilateral RCCs. The median age at diagnosis was 40.6 (SD, 20) years, highlighting three cases with onset at a very young age: a boy at 10 years, a young man at 20 years, and the woman with bilateral RCC at 24 years of age. In addition to papillary type 2 pattern, which was the most frequent histological pattern, other patterns included clear cell renal carcinoma, papillary carcinoma, collecting duct carcinoma, and unclassified carcinoma. There were no differences compared with the patients carrying LoF variant.

DISCUSSION

HLRCC is a very rare syndrome included in Orphanet's catalogue of rare diseases [18], with a very low prevalence (1/200,000) [12]. However, it may be underestimated because of misdiagnosis [19,20]. The main manifestations of HLRCC are CLM and ULM. Skin lesions sometimes are sparse, and individuals may think they are stings or acne scars. Moreover, uterine fibroids are relatively frequent in middle-aged women. Therefore, health professionals usually do not suspect that individuals may suffer from HLRCC.

A total of 289 pathogenic and 117 likely pathogenic *FH* variants causing HLRCC or FMRD have been reported in the ClinVar database [[21], accessed on 04/23/2022]]. The cumulative population frequency of these pathogenic and likely pathogenic *FH* variants is 168.54×10^{-6} (64.43×10^{-6} for LoF and 104.11×10^{-6} for missense variants) [22,23].

We previously reported a large series of 197 individuals with a genetic diagnosis of HLRCC [13]. We found a recurrent pathogenic variant, *FH* c.1118A>G p.(Asn373Ser), and showed that it has a founder effect in the Alicante province, with a prevalence of HLRCC of 6.26/100,000 inhabitants, which is the highest reported to date.

In the present work, we reported a haplotype study of this recurrent pathogenic variant identified in 104 individuals belonging to 31 apparently unrelated families, which revealed a common haplotype shared among them with an approximate size of 0.61–0.82 Mb. Considering the recombination rate around the *FH* locus per generation, the estimated number of generations elapsed since the origin of the founder mutation is between 12 and 26. This means that we can date the origin of the mutation between the years 1370 and 1720, which mostly corresponds to the historical period of the Modern Age in Spain.

We also described the clinical phenotype of 104 patients from these 31 families. In a bibliographic review, we only found one article describing an *FH* founder mutation that includes the haplotype study of different HLRCC families. Chuang et al. reported an *FH* splicing founder mutation (c.905-1G>A) that was identified in four families of Iranian origin with eight affected individuals [24]. No probands with RCC or RCy were encountered among those families.

We detected an association between missense germline pathogenic variants and the HLRCC clinical phenotype. Individuals carrying missense pathogenic variants exhibited a higher frequency of CLM, ULM, and RCy than did carriers of LoF variants.

The present results obtained for carriers of the *FH* c.1118A>G missense variant confirmed the higher frequencies of CLM, ULM, and RCy in these individuals compared with carriers of LoF variants. However, the frequency of RCC was 10.9%, which is lower than the other published series (12.4%–34%) [3,6–8,12,25]. This low rate may be more realistic than those of the

published series selected based on the diagnosis of RCC. We described three cases with onset at under 25 years of age. The associated RCC is the most serious manifestation, because of its aggressivity. Despite the low frequency of renal cancer, its early age of onset makes it advisable to use magnetic-resonance-imaging as an early diagnostic procedure, and its cost-effectiveness has been demonstrated [26,27].

One of the inherent limitations of this type of study is the potential variability in the follow-up of individuals carrying the mutation because of the lack of adherence to the recommendations. This may affect the accuracy of the estimation of the associated risks, especially in less severe clinical manifestations.

Studying patients carrying the same pathogenic variant allows a better assessment of the phenotype. This group represents a unique in vivo model in which the metabolic basis of tumor development, as well as the effect of external risk factors for renal cancer can be studied.

The characterization of a founder mutation using a high number of carriers is the best scenario for the definition of a clinical phenotype specifically associated with that alteration, and for the more precise establishment of the risks associated with each of the related clinical manifestations. In addition, the high prevalence of this founder mutation in our population allows a more efficient genetic diagnosis in suspected cases of HLRCC, as this mutation is screened at the beginning of the diagnostic process.

CONCLUSIONS

In the Spanish province of Alicante there is a high prevalence of HLRCC because of the founder mutation *FH* c.1118A>G; p.(Asn373Ser). A haplotype analysis confirmed that families shared a common haplotype, indicating that the recurrent *FH* c.1118A>G variant was inherited from a founder ancestor. We estimated that the variant appeared between the years 1370 and 1720. The patients carrying these missense mutations had a higher frequency of CLM, ULM, and RCy compared with the frequencies described in HLRCC. However, the frequency of RCC was lower than that previously published. In individuals with suspected HLRCC from the province of Alicante, genetic testing by direct analysis of the founder *FH* c.1118A>G; p.(Asn373Ser) mutation may be a faster and more efficient diagnostic tool compared with complete gene sequencing.

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital General Universitario de Elche on January 25, 2018 (code 42/2017).

Consent for publication

Not applicable.

Data availability statement

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Author contributions

Author Contributions: Study concept, design and drafting of the manuscript: ABSH, EDR, JLS, PB. Acquisition of data: ABSH, EDR, AC, AT, MR, RS, AZ, RPI, TRC, CMS, IE, ALF, LR, JLS, MIC, ASM, CL, JB, LG.

Analysis, interpretation of data, and statistical analysis: ABSH, EDR, JLS.

Critical revision of the article for important intellectual content and final approval of the article: All authors.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for participating in this study.

We also thank to Alejandro Moya, member of the statistical team at Hospital General Universitario de Elche.

Competing interests

Authors had no relevant conflicts of interest to this matter.

Ana Beatriz Sanchez-Heras COI are: Consulting or Advisory Role (Clovis), Speakers' Bureau (AstraZeneca Spain; MSD; GlaxoSmithKline; Clovis), congress registration (MSD; GSK).

Funding information

Project founded by *Spanish Society of Medical Oncology Foundation (FSEOM)*. SEOM+1 grant (UGP-19-428).

ABBREVIATIONS

| | | | |
|--------------|---|--------------|-------------------------------------|
| cM | CentiMorgan | ORs | Odds ratio |
| CI | Confidence interval | RCC | Renal cell cancer |
| CLM | Cutaneous leiomyomas | RCys | Renal cysts |
| FH | Fumarate hydratase | STR | Short tandem repeats |
| HLRCC | Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer | SNP | Single nucleotide polymorphism |
| IQR | Interquartile range | SD | Standard deviation |
| LoF | Loss-of-function | TMRCA | Time of most recent common ancestor |
| Mb | Megabase | ULM | Uterine leiomyomas |

REFERENCES

1. Reed WB, Walker R, Horowitz R. Cutaneous leiomyomata with uterine leiomyomata. *Acta Derm Venereol.* 1973;53:409–16.
2. Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EEM, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30:406–10.
3. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, Tyrer JP, Calonje E, Manek S, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. *Arch Dermatol.* 2005;141:199–206.
4. Gardie B, Remenieras A, Kattygnarath D, Bombled J, Lefevre S, Perrier-Trudova V, et al. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J Med Genet.* 2011;48:226–34.
5. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:3387–92.
6. Muller M, Ferlicot S, Guillaud-Bataille M, Le Teuff G, Genestie C, Deveaux S, et al. Reassessing the clinical spectrum associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome in French FH mutation carriers: MULLER et al. *Clin Genet.* 2017;92:606–15.
7. Toro JR, Nickerson ML, Wei M-H, Warren MB, Glenn GM, Turner ML, et al. Mutations in the Fumarate Hydratase Gene Cause Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer in Families in North America. *Am J Hum Genet.* 2003;73:95–106.
8. Wei M-H. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet.* 2005;43:18–27.
9. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, Cascón A, Menara M, Khalifa E, et al. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet.* 2014;23:2440–6.
10. Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA, et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet.* 2006;43:523–6.
11. Coman D, Kranc KR, Christodoulou J. Fumarate Hydratase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2022 Apr 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1506/>
12. Forde C, Lim DHK, Alwan Y, Burghel G, Butland L, Cleaver R, et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer: Clinical, Molecular, and Screening Features in a Cohort of 185 Affected Individuals. *Eur Urol Oncol.* 2020;3:764–72.
13. Sánchez-Heras AB, Castillejo A, García-Díaz JD, Robledo M, Teulé A, Sánchez R, et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome in Spain: Clinical and Genetic Characterization. *Cancers.* 2020;12:E3277.

14. Chan TL, Chan YW, Ho JWC, Chan C, Chan ASY, Chan E, et al. MSH2 c.1452-1455delAATG is a founder mutation and an important cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the southern Chinese population. *Am J Hum Genet.* 2004;74:1035–42.
15. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50:D988–95.
16. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12:996–1006.
17. Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, et al. Screening for a *BRCA2* Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes. *J Clin Oncol.* 2007;25:2027–34.
18. Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf [Internet]. [cited 2022 Apr 16]. Available from: https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf
19. Lu E, Hatchell KE, Nielsen SM, Esplin ED, Ouyang K, Nykamp K, et al. Fumarate hydratase variant prevalence and manifestations among individuals receiving germline testing. *Cancer.* 2022;128:675–84.
20. Shuch B, Li S, Risch H, Bindra RS, McGillivray PD, Gerstein M. Estimation of the carrier frequency of fumarate hydratase alterations and implications for kidney cancer risk in hereditary leiomyomatosis and renal cancer. *Cancer.* 2020;126:3657–66.
21. fumarate hydratase - ClinVar - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=fumarate%20hydratase&cmd=correctspelling>
22. FH | gnomAD v2.1.1 | gnomAD [Internet]. [cited 2022 Apr 30]. Available from: https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000091483?dataset=gnomad_r2_1
23. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinforma Oxf Engl.* 2019;35:1978–80.
24. Chuang GS, Martínez Mir A, Geyer A, Engler DE, Glaser B, Cserhalmi-Friedman PB, et al. Germline fumarate hydratase mutations and evidence for a founder mutation underlying multiple cutaneous and uterine leiomyomata. *American Academy of Dermatology*; 2005 [cited 2022 Apr 30]; Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/39383>
25. Chayed Z, Kristensen LK, Ousager LB, Rønland K, Bygum A. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma: a case series and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16:34.
26. Maher ER. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol.* 2018;36:1891–8.
27. Thompson AJ, Alwan YM, Ramani VAC, Evans DG, Maher ER, Woodward ER. Cost-effectiveness model of renal cell carcinoma (RCC) surveillance in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC). *J Med Genet.* 2022;jmedgenet-2021-108215.

Supplementary Materials: Genetic and clinical characterization of a novel *FH* founder mutation in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome

Ana Beatriz Sánchez-Heras, Estela Dámaso, Adela Castillejo, Mercedes Robledo, Alexandre Teulé, Conxi Lázaro, Rosario Sánchez-Martínez, Ángel Zúñiga, Adrià López-Fernández, Judith Balmaña, Luis Robles, Teresa Ramon y Cajal, M. Isabel Castillejo, Raquel Perea Ibañez, Carmen Martínez Sevilla, Andrea Sánchez-Mira, Inés Escandell, Luís Gómez, Pere Berbel, José Luis Soto.

TABLE S1 The most recent common ancestor age estimation of families carrying the *FH* c.1118A>G founder mutation (highlighted), as assessed based on single marker method calculations

| MARKER | ALLELE SIZE (bp) | FREQUENCY FOR MARKER ALLELE ON | | LD (δ) | PHYSICAL DISTANCE (kb) | GENETIC DISTANCE (cM) | GENETIC DISTANCE (M) | RECOMBINATION FRACTION (θ) | ESTIMATED AGE (generations) |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | | Mutation-Bearing Chromosomes (Pd) | Normal Chromosomes (Pn) | | | | | | |
| D1S2785 | 170 | 0,741 (20/27) | 0,05 (2/40) | 0,727 | 789,091 | 1,24 | 0,0124 | 0,012397458 | 25,6 |
| D1S304 | 174 | 1 (23/23) | 0,450 (18/40) | 1 | 377,182 | - | - | - | - |
| D1S180 | 178 | 0,852 (23/27) | 0,100 (4/40) | 0,836 | 300,639 | - | - | - | - |
| D1S204 | 170 | 1 (27/27) | 0,65 (26/40) | 1 | 59,487 | - | - | - | - |
| rs1060499643 | <i>FH</i> c.1118A>G | 1 (27/27) | 0 (0/40) | - | - | - | - | - | - |
| D1S547 | 294 | 0,888 (24/27) | 0,100 (4/40) | 0,876 | 90,074 | - | - | - | - |
| D1S2842 | 229 | 0,519 (14/27) | 0,05 (2/40) | 0,494 | 1206,855 | 5,95 | 0,0595 | 0,059220722 | 11,6 |

TABLE S2 Phenotype–genotype correlations. Abbreviations: LoF, loss of function; OR, odds ratio; *, χ^2 test

| | c.1118A>G n(%) | LoF^{ref} n(%) | p-value* |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Cutaneous leiomyoma (CLM) | 64 (64.6) | 21 (51.2) | 0.138 |
| Uterine leiomyoma (ULM) | 50 (98.0) | 18 (72.0) | 0.002 |
| Renal cyst (RCy) | 36 (42.4) | 8 (21.1) | 0.022 |
| Renal cell carcinoma (RCC) | 10 (10.4) | 6 (14.3) | 0.716 |

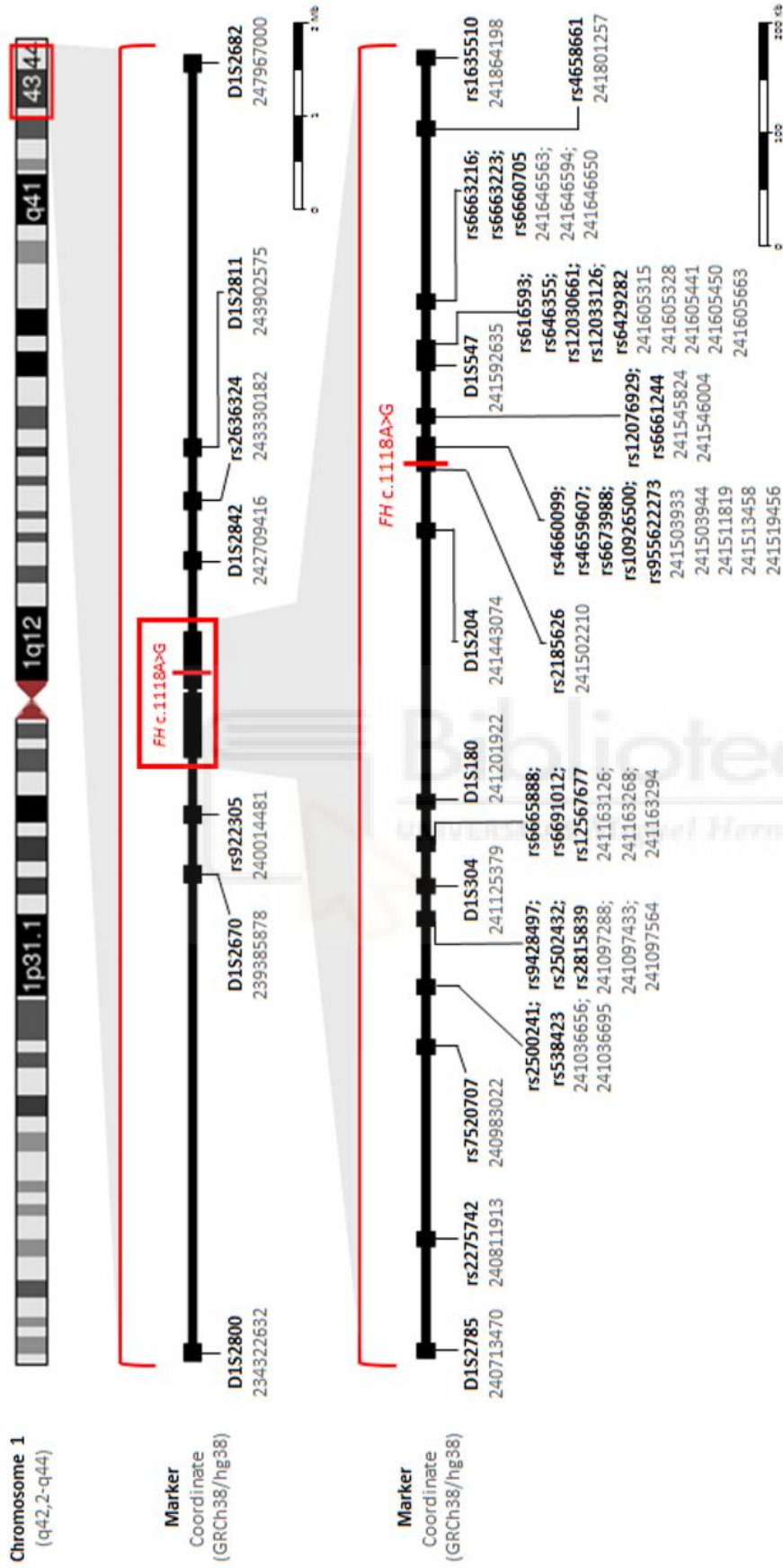


FIGURE S1 Genetic distribution of the 38 polymorphic markers covering 14 Mb around the FH c.1118A>G locus. Genetic markers, both SNPs and STRs, are indicated in black, whereas their genetic position is indicated in grey according to GRCh38/hg38. From top to the bottom, each genetic region marked in red is zoomed below.

ANEXO III

Modelo de consentimiento informado para estudio genético utilizado en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital General Universitario de Elche



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO, DE UTILIDAD CLÍNICA, EN SANGRE PERIFÉRICA Y/O TEJIDO TUMORAL

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Nº DE HC: EL _____ --F-EL _____ UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

SIP:

1.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se le propone es el estudio del gen *FH*, y consistirá en la realización un/unos análisis genético/s a partir de una muestra de sangre para detectar la presencia, ausencia o variantes de uno o varios segmentos de material genético, pudiendo incluir pruebas indirectas para la detección de productos génicos o metabolitos específicos indicativos de cambios genéticos determinados.

2.- OBJETIVO

La finalidad de todos los análisis que se le proponen, así como aquellos que se le pudieran hacer en un futuro es, sobre todo, detectar posibles mutaciones, poder analizar el riesgo familiar y proceder a la correcta caracterización / diagnóstico del cáncer que padece y la optimización del manejo clínico de su enfermedad.

Debe saber, en cualquier caso, que se le informará verbalmente de los resultados de los mismos.

Las muestras destinadas al análisis genético, incluyendo las pruebas indirectas para la detección de productos génicos o metabolitos específicos indicativos de cambios genéticos determinados, se realizarán en los distintos laboratorios acreditados para tal fin de la institución que está tratando su enfermedad: anatomía patológica, análisis clínicos, hematología, microbiología, genética y biología molecular.

Las muestras, una vez procesadas, se almacenarán en el centro Laboratorio de Genética Molecular del Hospital General de Elche durante el tiempo necesario para realizar todo el proceso de análisis descrito y a continuación serán destruidas, salvo que se estime la conveniencia de otros usos para lo que se requerirá, nuevamente, su consentimiento.

En el caso en el que los análisis genéticos se deban hacer fuera de la institución que le está prestando asistencia, sus datos de identificación personales serán debidamente codificados.

3.- BENEFICIOS ESPERADOS

Los resultados del análisis genético se evaluarán teniendo en cuenta los antecedentes clínicos personales y familiares, los resultados de la exploración física, las pruebas complementarias y la

interpretación clínica del personal facultativo. En todo momento será debidamente informado de las repercusiones que los análisis genéticos vayan a tener sobre el manejo clínico de su enfermedad.

Si se demuestra que usted es portador de una variación génica que puede ser heredada, y por tanto transmitida a la descendencia, se le ofrecerá la posibilidad de consejo genético.

4.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN

Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de sus datos genéticos y otros datos personales obtenidos en el estudio.

Estos datos pueden repercutir en algunos miembros de su familia, por lo cual usted valorará la conveniencia de transmitirles dicha información.

5.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de no realizarse el estudio genético es totalmente voluntaria, pudiendo negarse e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Esto no tendrá ninguna repercusión en la asistencia médica que reciba o pueda recibir usted o sus familiares en el centro. Para revocar este consentimiento deberá dirigirse al mismo facultativo con el que firmó el presente consentimiento.

6.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Los datos resultantes de los análisis se almacenarán en el archivo de la unidad del consejo genético. Los profesionales sanitarios del centro tendrán acceso a los datos que consten en su historia clínica en tanto sea pertinente para la asistencia que le presten. El personal que acceda a los datos genéticos en el ejercicio de sus funciones quedará sujeto al deber de secreto de forma permanente.

Ha de saber que la información sobre sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria aplicable.

Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases de datos científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

Los datos genéticos de carácter personal se conservarán durante un periodo mínimo de 5 años, tras los cuales podrá solicitar su cancelación. Para solicitar la cancelación deberá hacerlo por escrito y dirigirse a la dirección médica del centro que trató su enfermedad. En caso que usted no solicitara dicha cancelación, los datos se mantendrán indefinidamente.

7.- DECLARACIONES Y FIRMAS

Declaración del paciente:

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio
enDNI.....
EL.....
F-EL.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio
enDNI.....
.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente

DECLARO

Que la/el Dra/Dr. interlocutor principal del procedimiento con el equipo asistencial (según art. 10.7 L.G.S.), me ha explicado que el cáncer es una enfermedad en la que participan alteraciones a nivel genético que son las responsables de que un tumor se desarrolle.

También se me ha informado que podemos ser portadores de variantes genéticas que pueden predisponer al desarrollo del cáncer.

Manifiesto que estoy satisfecho/a con la información recibida, que se me ha informado verbalmente de los procedimientos de análisis genético a los que voy a ser sometido, que he podido hacer las preguntas que he estimado conveniente, a las que se ha respondido adecuadamente y que comprendo el alcance del procedimiento, por lo que en tales condiciones, **OTORGO LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE MI CONSENTIMIENTO PARA ANÁLISIS GENÉTICO, DE UTILIDAD CLÍNICA, EN SANGRE PERIFÉRICA Y/O TEJIDO TUMORAL.**

En Elche (Alicante) .a.....de..... de 20....

Fdo:

Declaración del profesional de salud:

He informado debidamente

En Elche (Alicante) .a.....de..... de 20....

Fdo.: Dra/Dr.:....., DNI:....., ColegiadoNº:.....

8. AUTORIZACIÓN

- AUTORIZO para que la/s persona/s abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados e implicaciones del estudio.

Nombre:.....
DNI.....Teléfono.....

Nombre:.....
DNI.....Teléfono.....

9. RENUNCIO

- RENUNCIO a ser informado de los resultados del estudio

10. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

D./D^a
de.....años de edad, con domicilio en
y D.N.I. nº como interesado, revoco el consentimiento prestado en fecha....., que doy con esta fecha por finalizado, sin tener que dar explicaciones y sin que esto tenga ninguna repercusión en la asistencia médica que reciba o pueda recibir yo o mis familiares en el centro.

En, a.....de.....de.....
Fdo.:.....

D./D^a
de.....años de edad, con domicilio en
y D.N.I. nº como representante legal de D/D^a....., con DNI....., revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....dey no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

En, a.....de.....de.....
Fdo.:.....

ANEXO IV

Modelo de consentimiento informado para donación de muestra de ADN excedente al Biobanco de Cáncer Familiar y Hereditario de la Comunidad Valenciana



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA
DE SANGRE Y/O TEJIDOS EXCEDENTES PARA INVESTIGACIÓN AL
BIOBANCO DE CÁNCER FAMILIAR
DEL CENTRO SUPERIOR INVESTIGACION SALUD PUBLICA DE VALENCIA

UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ELCHE

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN

1.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de *tejido excedente del proceso diagnóstico histopatológico y/o a partir de una muestra de sangre periférica*. Estas muestras biológicas podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica, científicamente aprobados.

Las muestras que done se almacenarán en el Biobanco de Cáncer Familiar del CSISP que forma parte de la Red Valenciana de Biobancos, autorizado por la administración autonómica y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente que previamente sean aprobados por los comités externos a los que esté adscrito este biobanco, incluyendo el Comité de Ética para la Investigación. En ocasiones dichos estudios se realizarán fuera del centro en el que ha sido atendido/a.

Las muestras seguirán almacenadas en el Biobanco del CSISP hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2.- OBJETIVO

La Conselleria de Sanitat dispone de un Biobanco de Cáncer Familiar donde se depositará sus muestras, constituido con la finalidad de recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados derivados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y medicinas para tratar enfermedades.

3.- BENEFICIOS ESPERADOS

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. Sin embargo, si las investigaciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales pero los costes de conservación y envío se cubrirán sobre una base sin ánimo de lucro.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

4.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN

Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información de la que contamos en este momento y/o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o declinar dicha participación.

Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de sus datos genéticos y otros datos personales obtenidos en la investigación. A estos efectos, se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que tiene a su disposición en el centro en el que está siendo atendido.

Estos datos pueden repercutir en algunos miembros de su familia, por lo cual usted valorará la conveniencia de transmitirles dicha información.

5.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras de tejidos sobrantes y de sangre es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

6.- RIESGOS

Las muestras que se le solicita provienen del excedente de un proceso diagnóstico que ya ha finalizado y se encuentra almacenada en el laboratorio de análisis genético que ha hecho el diagnóstico, por lo que su obtención no implica ningún riesgo para usted.

7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el biobanco para llevar a cabo la investigación descrita en este documento y el cumplimiento de sus obligaciones legales.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras de tejidos y/o sangre o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de codificación, esto es, desligando la información que le identifica sustituyéndolo por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, y de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 9) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al biobanco el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de documento acreditativo de su identidad.

BIOBANCO CANCER FAMILIAR CSISP

8.- DECLARACIONES Y FIRMAS

Declaración del donante:

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio
enDNI.....

EL.....

F-EL.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en
.....DNI.....en

calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente

DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores que trabajen con ellas.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas o distribuidas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo.
- Que en cualquier momento, yo, mi Representante Legal, o Tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007 de investigación biomédica, de 3 de julio, puedo solicitar información sobre los datos genéticos y otros datos personales que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

CONSIENTO

-Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos

-Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de

Muestras de *tejido del proceso diagnóstico histopatológico y/o sangre periférica excedente.*

-Que yo, mi Representante Legal o Tutor, accedo (márquese sí o no) a que el personal de la Red Valenciana de biobancos me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras

Sí

No

En Elche (Alicante) a.....de..... de 20...

Fdo:

Declaración del profesional de salud:

He informado debidamente al donante

En Elche (Alicante) a.....de..... de 20...

Fdo. Dra..... DNI:..... Colegiado Nº

SOLICITUD DE INFORMACIÓN DE DATOS GENÉTICOS RESULTADO DE LAS
INVESTIGACIONES

RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

BIOBANCO CÁNCER FAMILIAR

UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER DEL HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARIO DE ELCHE

DONANTE:

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio
enDNI.....

EL.....

F-EL.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio
en.....DNI.....en
calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente

SOLICITO



Ser informado/a del resultado de las investigaciones de la donación voluntaria realizada en fecha
.....de.....de....., si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

En Elche, a.....de.....de 20...

Fdo. D./Dña.....

ANEXO V

Aprobación o informe favorable del Comité Ético de la Investigación, CEIC, del Hospital General Universitario de Elche de realización del estudio



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. Leticia Soriano Irigaray, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital General Universitario de Elche.

CERTIFICA


Que este Comité ha evaluado la propuesta referida al estudio titulado **“Caracterización de una posible nueva mutación fundadora en el gen de la fumarato hidratasa (FH) asociada al Síndrome de Leiomiomatosis Múltiple y Cáncer Renal Hereditario”**, (código de registro PI 42/2017) cuyo Investigador Principal es el Dra. Ana Beatriz Sánchez Heras del servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Elche.

Que en este estudio:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado (si aplica).
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.

Que los miembros del CEIm, en su reunión del 17 de Diciembre 2019 (acta 12_2019), tras la lectura y evaluación del proyecto, deciden emitir **Informe Favorable** para su realización en este centro.

Lo que firmo en Elche a 23 de diciembre de 2019



Fdo.: Dña. Leticia Soriano Irigaray
Secretaria CEIm HGU de Elche

CEIm Hospital General Universitario de Elche
Camino de la Almazara, nº 11 · 03203 ELCHE · Tel. 966 61 61 74 · Fax. 966 61 61 45
Ceic_elx@gva.es

AGRADECIMIENTOS

*The cosmos is within us.
We are made of star-stuff.
We are a way for the universe to know itself.
Carl Sagan*

A Andrés, mi compañero de vida. Por su apoyo incondicional, por su dedicación, por resolver nuestra vida del día a día, por estar siempre a mi lado. A Clara y Daniel, que vinieron a acompañarnos y completar nuestra existencia. Son nuestra herencia y futuro.

A mis padres, por sus múltiples sacrificios y esfuerzos para conmigo. A Carlos, Rosa y toda mi familia por su apoyo.

A José Luís, por su trabajo, energía, optimismo y saber hacer junto con Estela, Isa, Adela y Víctor, y a todos los colaboradores del maravilloso equipo de la Unidad de Genética Molecular del Hospital General Universitario de Elche.

A Pere, quien me hizo creer en esta tesis. Por sus conversaciones y reflexiones, por compartir su familia y sus aficiones. Encendió la mecha de este proyecto.

A Luís, por su apoyo y buenos consejos, siempre dispuesto a ayudar y resolver dudas.

A Raquel y Carmen, por su trabajo, esfuerzo y acompañamiento en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer, junto con Cati y Pilar.

A Alejandro Moya, por su inestimable ayuda en los aspectos estadísticos de esta tesis.

A todas las colaboradoras y colaboradores firmantes de los artículos y comunicaciones que han resultado de esta tesis.

A la Sección SEOM de Cáncer Familiar y Hereditario por su labor en el ámbito del cáncer familiar y hereditario.

A la Fundación SEOM por su apoyo económico a través de la beca Suma+1 2019.

A mis compañeras y compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Elche, por su apoyo y ayuda en mi labor asistencial.

A las y los pacientes, y sus familiares, por su participación en este proyecto que surgió de la preocupación por ellos.

