

Universidade de São Paulo – USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP
Pós-Graduação em Genética

Jessica Oliveira de Santis

Investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA.

Ribeirão Preto

2021

Jessica Oliveira de Santis

Investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Área de concentração: Ciências Biológicas I (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Santis, Jessica Oliveira de

Investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA.

Ribeirão Preto, 2021

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

1. Câncer de endométrio; 2. Câncer hereditário; 3. Variantes germinativas; 4. Histórico familiar.

Apoio financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do projeto escrito sob o processo número 2013/08135-2, e foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O aluno obteve apoio financeiro através de bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Jessica Oliveira de Santis

Investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Área de concentração: Ciências Biológicas I (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Parecer: _____, ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico à Ciência, tão questionada
e nossa esperança nesse momento de desinformação

Dedico à Maria Helena, que me apresentou Deus,
a fé de querer continuar e nunca desistir, e me apoiou por toda vida

Dedico à Carlos (*In memoriam*), que nunca me deixou
e me mostrou que por esforço e dedicação podemos conquistar o mundo

AGRADECIMENTOS

EM ESPECIAL, agradeço ao Prof. Dr. Victor Ferraz, por toda orientação, que me proporcionou aprender sobre ciência; por ter aplicado tanta energia e disponibilidade durante todas as etapas do meu Mestrado; pela sua ética e esforço em ensinar o respeito que os pacientes merecem. Obrigada por mostrar que nossa dedicação a pesquisa envolve humanidade para lidar com pacientes e famílias. Agradeço por estar presente, pelas respostas rápidas, pelas soluções de problemas que apareceram, pelas inúmeras correções, e principalmente por acreditar e confiar a mim o desenvolvimento deste projeto.

EM ESPECIAL, a todas as pacientes que concordaram em participar desse projeto, assim como suas famílias, que muitas vezes vieram em apoio às pacientes e contribuíram imensamente ao projeto. Obrigada pela superação e pela força que vocês demonstraram, desde o diagnóstico do câncer, até o momento em que pedi para recordarem de uma fase tão difícil. Agradeço e afirmo que sem vocês, este projeto não seria possível, e espero poder retribuir o quanto puder.

Agradeço imensamente a minha família, Maria Helena (mãe), Larissa (irmã), Arthur (sobrinho) que me apoiaram e me guiaram durante esses dois anos. Foram anos da faculdade, uma mudança de cidade, etapas e mais etapas a serem atingidas, e isso não seria possível sem o apoio e a presença de vocês. Agradeço a minha mãe por todo café compartilhado que me acalmou por esses anos. A minha família de São Paulo, Terezinha, Nivaldo, Aparecida e Rômulo, e minha família de Ourinhos, Maria, Dárcio, Helena e Rodrigo, meus sinceros agradecimentos pelo suporte e por cuidarem de todos enquanto estou longe para poder concluir o Mestrado.

Agradeço meus colegas de Mestrado, Reginaldo Rosa e Adara Sousa, que dividiram todo esse processo comigo, me apoiaram imensamente e ouviram todos meus devaneios. A Reginaldo, agradeço especialmente pela ajuda no desenvolvimento das metodologias, você foi um professor de diversas formas, e sei que esse projeto não seria tão completo sem seu apoio.

Agradeço a Vitor Leão, que foi meu companheiro e maior suporte durante meu Mestrado. Você me dedicou seu tempo, seus conselhos, seus ouvidos, seu trabalho, e principalmente, seu carinho e amor, estando presente nos momentos bons e ruins, algo que nunca vou esquecer. Obrigada por ter conversado sobre meu projeto, corrigido

diversas vezes, editado (e melhorado) as figuras deste trabalho e do artigo derivado destes dados. Para todo auxílio que precisei, foi você a quem procurei, e sempre recebi sua ajuda. Ao meu companheiro, amigo e namorado, meu eterno obrigada. Agradeço também a sua família, Nilma, Juliane e Alberto, que me acolheram e receberam todas as vezes, torcendo por mim em cada etapa da minha pós-graduação.

Agradeço ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética pela infraestrutura e assistência, o que me permitiu aprender e crescer como pós-graduanda. De forma especial, agradeço à Susie Nalon, que é uma pessoa imprescindível para os alunos, e me auxiliou em diversas vezes, sempre respondendo dúvidas e medos durante nossa caminhada acadêmica.

Agradeço as agência de fomento que financiaram esse projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pela bolsa de estudos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro utilizado para a execução deste trabalho.

Agradeço a todos professores e colegas do Departamento de Genética, que contribuíram para minha formação, tanto durante as disciplinas com palestras e aulas ministradas, quanto no apoio em dificuldades que compartilhamos durante a pós-graduação.

Agradeço a todos funcionários e técnicos dos ambientes em que trabalhei durante o Mestrado. No Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (FMRP/USP) agradeço imensamente a Sandra e Daiana por toda ajuda e disponibilidade. No Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) no Hemocentro de Ribeirão Preto, agradeço a Greice, Adriana, Anne e Kamilla, que me auxiliaram de forma imensurável com etapas metodológicas essenciais para esse projeto. No Centro de Medicina Genômica (CMG), agradeço a todas funcionárias que me acolheram no início do projeto. No Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto agradeço, em especial, a Márcia e Fátima que sempre se disponibilizaram a nos ajudar, e a todos os residentes que nos receberam com respeito e abertura, o que me fez sentir confortável neste ambiente para trabalhar.

Agradeço profundamente aos amigos que a pós-graduação me apresentou, em especial a Isabella, Camila, Ádamo, Graziella, Natália e Felipe Canto que me ajudaram diversas vezes, compartilhando suas experiências e conhecimentos, além de sua compreensão com as frustrações que enfrentamos. Vocês responderam diversas questões que me ajudaram a terminar esse projeto, além de disponibilizar seu tempo para me ensinar práticas de laboratório. Agradeço em adicional aos nossos cafés, conversas e risadas, que foram fundamentais para mim. A caminhada com vocês é bem mais leve.

Agradeço também a Mariana, Stefany e Vinicius, amigos que conheci em Ribeirão Preto, e me acolheram, cuidaram e aconselharam durante os últimos três anos. Minha trajetória não seria a mesma sem vocês, e cheguei até aqui por poder aproveitar a companhia de vocês.

Finalmente, à todos mais que direta e indiretamente contribuíram para minha jornada até aqui, meu mais sincero obrigada.

*“The revolution in cancer research
can be summed up in a single sentence:
cancer is, in essence, a genetic disease”*

(VOGELSTEIN; KINZLER, 2004)

RESUMO

SANTIS, Jessica Oliveira de. **Investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Câncer de endométrio (CE) é o tipo mais comum de neoplasia do sistema ginecológico na mulher. Em cerca de 5% dos casos, tumores endometriais têm etiologia hereditária, causados por variantes germinativas. Na maioria dos casos, as variantes em pacientes com CE são identificadas nos genes do sistema de reparo de malpareamento de DNA (MMR), e portanto, em mulheres diagnosticadas com síndrome de Lynch (SL). Porém outras síndromes e outros genes não associados a síndromes, já foram descritos em famílias com casos de câncer de endométrio. Embora existam estudos associando CE com síndromes de predisposição a câncer, uma parcela significativa dos casos não são diagnosticados, e isso pode ser justificado pela sobreposição dos casos de SL. Este estudo teve como objetivo identificar variantes germinativas em genes associados a síndromes de predisposição ao câncer, em mulheres com CE que apresentem tumores proficientes para o sistema MMR e histórico pessoal e familiar de câncer. Um total de 42 mulheres concordaram em fazer a parte da casuística de pacientes com tumores proficientes. Foi realizada a coleta do histórico pessoal e familiar de câncer, e as pacientes foram classificadas como de alto ou baixo risco para predisposição ao câncer, baseado em critérios clínicos do histórico de câncer adaptados da Sociedade de Ginecologia Oncológica (SGO). Os casos de alto risco foram sequenciados por um painel de 40 genes associados a predisposição ao câncer para identificação de variantes germinativas. As variantes foram anotadas de acordo com sua patogenicidade, e foram consideradas variantes significativas aquelas classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas e variantes de significado incerto (VUS). Casos com variantes germinativas patogênicas em heterozigose foram encaminhadas para sequenciamento de variantes somáticas, para auxiliar na elucidação da etiologia do tumor. Das 42 pacientes, 26 (61,9%) foram classificadas como de alto risco e 16 (38,1%) como de baixo risco. A idade média ao diagnóstico das pacientes foi de 58 anos, e como era esperado nas características tumorais, a histologia endometrióide (92,8%) e o diagnóstico em grau I (76,2%), foram as mais comuns. Foi observada uma diferença entre a média de idade de mulheres classificadas de alto risco e baixo risco ($p = 0.0572$). Invasão do tumor em mais de 50% do miométrio está associado com a idade ao diagnóstico, encontrado em maior frequência em mulheres diagnosticadas com mais de 50 anos ($p = 0,0090$). As características clínicas mais raras, como diagnóstico antes dos 50 anos, histologias não-endometrióides e grau de estadiamento avançado, foram identificadas em pacientes de alto risco. Como resultado da análise germinativa, foram identificadas 18 variantes significativas em 12/26 pacientes sequenciadas. Três variantes foram classificadas como patogênicas, *MLH3*:p.S1037*, *MUTYH*:p.G396D e *SEC23B*:p.R550*, e quinze classificadas como variantes de significado incerto, todas em heterozigose. Em uma paciente foi identificada uma variação em número de cópias no gene *PTEN*, com uma duplicação dos éxons 6 a 9. As variantes nos genes *MLH3* e *PTEN* ainda não foram relatadas na literatura, enquanto a variante em *SEC23B* nunca foi relatado em CE. Em quatro pacientes foram identificadas mais de uma variante, incluindo duas pacientes com variantes patogênicas. A análise de variantes somáticas identificou mutações em genes em concordância com o germinativo com 3/4 casos sequenciados. Como conclusão, foram identificadas variantes germinativas em genes não pertencentes ao sistema MMR, trazendo consigo a possibilidade de estudos de novas causas genéticas ao câncer de endométrio. Os achados deste projeto apoiam o conceito de que mulheres com tumores de endométrio estáveis, que apresentem histórico pessoal ou familiar de câncer, devem ser consideradas para investigação e aconselhamento genético.

Palavras-chave: Câncer de endométrio; câncer hereditário; variantes germinativas; histórico de câncer.

ABSTRACT

SANTIS, Jessica Oliveira de. **Investigation of hereditary predisposition to cancer in women with endometrial cancer proficient for the DNA mismatch repair system.** 2021. Dissertation (Master of Science) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Endometrial cancer (EC) is the most common type of gynecological system neoplasm in women. In about 5% of cases, endometrial tumors have a hereditary etiology, caused by germline variants. In most cases, germline variants in patients with EC are identified in the genes of the DNA mismatch repair system (MMR), and therefore, in women diagnosed with Lynch syndrome (LS). Still, other syndromes and other genes not associated with syndromes have already been described in families with cases of endometrial cancer. Whilst there are studies associating EC with cancer predisposition syndromes, a significant portion of the cases are not diagnosed, and this can be justified by the overlap of LS cases. This study aimed to identify germline variants in genes associated with cancer-predisposing syndromes, in women with EC who have proficient tumors for the MMR system and personal and family history of cancer. A total of 42 women agreed to be part of the casuistic of patients with proficient tumors. Personal and family history of cancer was collected, and the patients were classified as high or low risk for cancer predisposition, based on clinical criteria from cancer history adapted from the Society of Gynecology Oncology (SGO). High-risk cases were sequenced by a panel of 40 genes associated with cancer predisposition to identify germline variants. The variants were noted according to their pathogenicity, and were considered significant variants those classified as pathogenic, probably pathogenic and variants of uncertain significance (VUS). Cases with pathogenic germline variants in heterozygosis were referred for sequencing of somatic variants, to elucidate the tumor etiology. Of the 42 patients, 26 (61.9%) were classified as high risk and 16 (38.1%) as low risk. The mean age at diagnosis of the patients was 58 years, and, as expected in tumor characteristics, endometrioid histology (92.8%) and grade I diagnosis (76.2%) were the most common. A difference was observed between the average age of women classified as high risk and low risk ($p = 0.0572$). Tumor invasion in more than 50% of the myometrium is associated with age at diagnosis, found more frequently in women diagnosed with more than 50 years ($p = 0.0090$). The rarest clinical features, such as diagnosis before the age of 50, non-endometrioid histologies and tumor advanced degree, were identified in high-risk patients. As a result of the germline analysis, 18 significant variants were identified in 12/26 sequenced patients. Three variants were classified as pathogenic, *MLH3*:p.S1037*, *MUTYH*:p.G396D and *SEC23B*:p.R550*, and fifteen were classified as variants of uncertain significance, all in heterozygosis. In one patient, a copy number variation in the *PTEN* gene was identified, a duplication of exons 6 to 9. Variants in the *MLH3* and *PTEN* genes have not yet been reported in the literature, while the *SEC23B* was never reported in EC. In four patients, more than one variant were identified, including two patients with pathogenic variants. The analysis of somatic variants identified mutations in genes in agreement with germline in 3/4 sequenced cases. As a conclusion, germline variants were identified in genes not belonging to the MMR system, bringing with it the possibility of studying new genetic causes of endometrial cancer. The findings of this project support the concept that women with stable endometrial tumors, who have a personal or family history of cancer, should be considered for genetic investigation and counseling.

Keywords: Endometrial cancer; hereditary cancer; germline variants; cancer history.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de lâmina histológica corada com eosina/hematoxilina (H/E). (a-c) Carcinomas endometrióides de (a) grau arquitetural 1, (b) grau arquitetural 2, (c) grau arquitetural 3, (d) carcinoma seroso de alto grau, (e) carcinoma de células claras. Adaptado de (SANDERSON; MOULLA; FEGAN, 2019).....**25**

Figura 2. Gráfico Kaplan-Meier de sobrevida geral de pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio de alto grau. POLE mutated, tumores ultramutados com variantes no gene POLE; MSI, tumores hipermutados com instabilidade de microssatélite; CN-low \neg , CE com baixa taxa de mutação e baixa frequência de CNV; CN-high, CE com baixa taxa de mutações e alta taxa de CNV. Fonte: (PIULATS; GUERRA; GIL-MARTIN; ROMAN-CANAL et al., 2017).....**27**

Figura 3. Representação de resultado de instabilidade em uma análise de microssatélite usando três marcadores, BAT25, BAT26 e BAT40. O material tumoral apresenta um aumento do número de picos em comparação ao tecido normal (MEYER; BROADDUS; LU, 2009).....**39**

Figura 4. Representação resultado de marcação imunohistoquímica para proteínas do sistema MMR. A, Marcação parcial da proteína MLH1, representando perda clonal em heterozigose. B, Marcação positiva/normal da proteína MSH2. C, Perda total da expressão de PMS2. D, Marcação normal da proteína MSH6. Adaptado de (KATO; SATO; SUGAWARA; TAKAHASHI et al., 2016).....**40**

Figura 5. Fluxograma descritivo das convocações e formação da casuística. A determinação do *status* do tumor para sua proficiência ao sistema MMR foi realizado por ROSA *et al.* (2020), utilizando as técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e instabilidade de microssatélite (MSI). Foram selecionadas 100 pacientes com tumores proficientes para o sistema MMR (MSS), e após a exclusão dos casos de óbitos, as pacientes foram contatadas por telefone e convidadas a participar do projeto. Ao final, 42 pacientes concordaram em participar e formaram a casuística deste projeto.....**68**

Figura 6. Eletroferograma da validação das variantes, os nucleotídeos afetados em cada caso estão destacados em azul. (A) MLH3: c.3110delC (chr14:g.75513249G>-), a variante é uma deleção de base única (G), que gera um frameshift na leitura do gene. Por ter sido encontrada em heterozigose, os picos do eletroferograma após a variante apresentam a leitura dos dois alelos (normal e mutado), causando dois picos em cada base a partir da deleção; (B) MUTYH: c.1187G>A (chr1:g.45797228C>T), a variante foi identificada em heterozigose, caracterizada pela troca de um C para um T, na imagem destacada com dois picos na mesma base, um pico azul e um pico vermelho; (C) SEC23B: c.1648C>T (chr20:18523799C>T), a variante também foi detectada em heterozigose,

representado por dois picos, vermelho e azul, a troca de um citosina (C) para uma timina (T).....84

Figura 7. Resultado do MLPA após análise com Coffalyser.Net. (A) Resultado de uma das amostras controle, onde todas as sondas (pontos pretos) estão dentro do limite (linhas azul e vermelha) e no nível 1, que indica a presença de dois alelos para o gene; (B) Resultado da amostra da paciente (P05) em que foi observado a duplicação, no gráfico representada pelos pontos azuis, que indicam sondas que foram anotadas no nível 1,5, o que demonstra que 3 cópias das sondas foram identificadas, o que representa uma duplicação dos éxons 6 a 9 no gene PTEN, em heterozigose.....87

Figura 8. Gráfico demonstrativo da frequência dos cânceres relatados pelas pacientes no histórico familiar. O câncer com maior incidência foi o de mama, seguido por intestino, próstata e pescoço. Para alguns tumores não foi possível elucidar origem específica, como por exemplo tumores de “intestino” e “cabeça”, pois as pacientes não tinham o diagnóstico exato e os familiares em questão não foram tratados pelo Hospital das Clínicas.....97

Figura 9. Heredogramas destacando a história familiar de câncer de pacientes que apresentam variantes patogênicas da linha germinativa. A paciente índice está destacada com uma seta. Foram registrados o tipo de câncer, a idade na entrevista e a idade ao diagnóstico. (A) Heredograma da paciente P03, caso em que foi identificada uma variante patogênica em MLH3. A paciente relatou uma extensa história familiar de câncer tanto na linhagem materna quanto na paterna. (B) Linhagem familiar da paciente P08, que apresentava história pessoal e familiar de câncer. Os casos de câncer ocorreram apenas na linhagem paterna, e todos os casos de câncer de mama relatados foram diagnosticados antes dos 50 anos. A paciente não relatou a idade no momento do diagnóstico da tia com leucemia devido à perda de contato. (C) Heredograma que representa o histórico de câncer da paciente P11. Os antecedentes de câncer eram exclusivos da linhagem materna, e todos foram diagnosticados após os 50 anos de idade.....101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios clinicopatológicos para identificação da síndrome de Lynch.....	34
Quadro 2. Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS et al., 2007).....	36
Quadro 3. Critérios para diagnóstico para síndrome de Muir-Torre (SCHWARTZ; TORRE, 1995).....	42
Quadro 4. Critérios para diagnóstico para síndrome de Cowden (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2019; PILARSKI; BURT; KOHLMAN; PHO et al., 2013).....	46
Quadro 5. Critérios para diagnóstico de Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase (BELLIDO; PINEDA; AIZA; VALDES-MAS et al., 2016).....	49
Quadro 6. Critérios para diagnóstico de HBOC (NELSON; PAPPAS; ZAKHER; MITCHELL et al., 2014).....	55
Quadro 7. Critérios de classificação de predisposição hereditária a câncer de endométrio. (adaptados da Sociedade de Oncologia Ginecológica) (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS et al., 2007).....	69
Quadro 8. Descrição dos genes inclusos no desenho do painel.....	70
Quadro 9. Nomes e links dos sites com bancos de dados públicos que foram utilizados para anotação das variantes, e seu respectivo uso.....	77
Quadro 10. Critérios do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (ACMG) utilizados para classificação das variantes germinativas.....	79
Quadro 11. Regras para combinar critérios para classificação de variantes. Legenda: VUS, variante de significado incerto. Legenda: VUS, variante de significado incerto.....	81
Quadro 12. <i>Primer</i> específicos para as mutações utilizados para validação das variantes patogênicas identificadas no sequenciamento de nova geração.....	82
Quadro 13. Programa do termociclador para a reação de MLPA.....	85
Quadro 14. <i>Pipeline</i> para análise de dados germinativos e somáticos.....	89

Quadro 15. Características histopatológicas, clínicas e critérios atendidos pelas 26 pacientes incluídas na análise de variantes germinativas. Caixas destacadas em cinza indicam critérios atendidos, e para o critério (2), está descrito qual foi o segundo câncer e a idade em que a paciente foi diagnosticada.....**96**

Quadro 16. Descrição das variantes pontuais encontrada e classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS.....**99**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características clínicopatológicas das 42 pacientes da casuística (total), e dos subgrupos de pacientes de alto e baixo risco para predisposição a câncer de endométrio.....**94**
- Tabela 2.** Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função da idade ao diagnóstico.....**104**
- Tabela 3.** Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função do risco para câncer.....**105**
- Tabela 4.** Valores de significância estatística (Valor de p) e de Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (inferior = L95; superior = U95) para os testes par-a-par das amostras estratificadas em função da idade.....**106**
- Tabela 5.** Valores de significância estatística (Valor de p) e de Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (inferior = L95; superior = U95) para os testes par-a-par das amostras estratificadas em função do risco para a predisposição ao câncer de endométrio.....**107**
- Tabela 6.** Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função do risco para câncer.....**108**

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa (letra do alfabeto grego)
δ	Delta (letra do alfabeto grego)
ϵ	Épsilon (letra do alfabeto grego)
°C	graus Celsius
μ l	microlitro
mL	mililitro
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
ng	nanograma
pb	Pares de base
mutações/Mb	Mutações por 1 milhão de pares de bases
AC1	Critérios de Amsterdam I
AC2	Critérios de Amsterdam II
ACMG	Colégio Americano de Genética e Genômica Médica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCR	Câncer colorretal
CE	Câncer de endométrio
CMMRD	Síndrome de Deficiência Constitucional do Reparo de Pareamento
CNV	Variação no Número de Cópias
CS	Síndrome de Cowden
DBS	Quebra de fita dupla
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptores de Estrógeno
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
G1/S	Gap1/Synthesis
G2/M	Gap2/Mitosis
H/E	Hematoxilina/Eosina
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HBOC	Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário
HNPCC	Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipoide
HR	Recombinação Homóloga

IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IHQ	Imunohistoquímica
IMC	Índice de Massa Corpórea
InDels	Inserções e Deleções
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
LOF	Perda de função
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas dependente de Ligação
MMR	Reparo de Malpareamento de DNA
mRNA	RNA mensageiro
MSI	Instabilidade de Microssatélite
MSI-H	Instabilidade de Microssatélite Alta
MSI-L	Instabilidade de Microssatélite Baixa
MSS	Estabilidade de Microssatélite
MTS	Síndrome de Muir-Torre
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PJS	Síndrome de Peutz-Jeghers
PPAP	Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase
QI	Quociente de Inteligência
SGO	Sociedade Americana de Oncologia Ginecológica
SL	Síndrome de Lynch
SNP	Variantes de Nucleotídeos Únicos
Ta	Temperatura de annealing
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCGA-THCA	The Cancer Genome Atlas Thyroid Cancer
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMX	Tamoxifeno
UTR	Regiões não traduzidas
VCF	Formato de Chamada de Variantes
VUS	Variantes de Significado Incerto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer de Endométrio (CE)	22
1.1.1 Epidemiologia	22
1.1.2 Classificação histopatológica	23
1.1.3 Classificação molecular	25
1.1.4 Fatores de risco	27
1.2 Predisposição genética	29
1.3 Síndromes de Predisposição a CE ligadas a disfunção do sistema MMR	31
1.3.1 Sistema de reparo de malpareamento de DNA (MMR)	31
1.3.2 Síndromes de Lynch	32
1.3.2.1 Síndromes de Muir-Torre.....	41
1.3.3 Síndrome de Deficiência Constitucional do Reparo de Pareamento	43
1.4 Síndromes de Predisposição a CE sem acometimento do sistema MMR	45
1.4.1 Síndrome de Cowden	45
1.4.1.1 PTEN e via de sinalização.....	47
1.4.2 Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase	48
1.4.2.1 POLE e POLD1	50
1.4.3 Síndrome de Peutz-Jeghers	51
1.4.3.1 STK11 e via de sinalização	53
1.4.4 Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC)	54
1.4.4.1 BRCA1 e BRCA2.....	56
1.4.5 Síndrome de Li-Fraumeni	58
1.4.5.1 TP53 e via de sinalização.....	60
1.4.6 Outros genes associados a síndromes de predisposição a CE	61
Justificativa	62
2. OBJETIVOS	65
2.1 Objetivo Geral	65
2.2 Objetivos específicos	65
3. MATERIAL E MÉTODOS	67
3.1 Ética	67
3.2 Casuística	67
3.3 Coleta de histórico familiar e pessoal	68
3.4 Análise germinativa	69
3.4.1 Extração de DNA genômico	69
3.4.2 Desenho do painel de genes	70
3.4.3 Preparo da biblioteca	71

3.4.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) por NextSeq.....	74
3.4.5 Análise dos dados do NGS	74
3.4.6 Classificação das variantes.....	78
3.4.7 Validação das variantes	81
3.4.7.1 Validações das variantes pontuais (Sequenciamento de Sanger)	81
3.4.7.2 Validações das variações em número de cópias (MLPA).....	85
3.5 Análise somática	88
3.5.1 Extração de DNA tumoral	88
3.5.2 NGS do material tumoral.....	88
3.5.3 Análise de dados do sequenciamento do tumor.....	90
3.6 Análise estatística.....	90
4. RESULTADOS	93
4.1 Características clinicopatológicas da casuística	93
4.2 Histórico pessoal e familiar de câncer.....	95
4.3 Análise de variantes germinativas.....	98
4.4 Análise de variantes somáticas.....	103
4.5 Análise estatística.....	103
5. DISCUSSÃO	110
6. CONCLUSÕES.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	129
8. APÊNDICES	159
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	159
8.2 Gráficos de cobertura média dos sequenciamentos.....	162
8.2.1 Cobertura do sequenciamento germinativo	162
8.2.1.1 Cobertura do sequenciamento por amostra.....	162
8.2.1.2 Cobertura do sequenciamento por gene do painel.....	162
8.2.2 Cobertura do sequenciamento somático.....	163
8.2.2.1 Cobertura do sequenciamento por amostra.....	163
8.2.2.2 Cobertura do sequenciamento por gene do painel.....	163
8.3 Heredogamas das pacientes de alto risco para predisposição ao CE.....	164
9. ANEXOS	185
9.1 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP... 185	
9.1.1 Aprovação do projeto original.....	185
9.1.2 Aprovação da emenda do projeto.....	188
9.2 Carta de autorização de uso do tecido fixado em formalina e embebido em blocos de parafina.....	192

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Endométrio (CE)

O útero é um órgão pertencente ao sistema reprodutor feminino, dividido anatomicamente em colo, istmo e corpo. Tumores originados no corpo uterino apresentam características clínicas e etiologia distintas dos tumores de colo de útero. Em sua grande maioria, cânceres de corpo uterino tem sua origem endometrial, sendo que os casos não endometriais não superam os 5% de todos os casos relatados, que incluem sarcoma de estroma endometrial e leiomiomasarcoma de útero (DANIELS, 2012).

1.1.1 Epidemiologia

Câncer de corpo de útero é considerado como a neoplasia invasiva mais comum em mulheres. No Brasil, sua incidência para o triênio 2020-2022, foi estimada em 6.540 novos casos, com um risco estimado de 6,07 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Em escala mundial, foram estimados cerca de 400 mil novos casos de câncer de corpo de útero para o ano de 2020, com um aumento na incidência para 2040, quando estima-se o registro de aproximadamente 580 mil novos casos (FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; MATHERS *et al.*, 2019).

A maior concentração dos casos ocorre em países com alto IDH (Índice de Desenvolvimento Humano), sendo que as maiores taxas de incidência são observadas na América do Norte e Europa. No Brasil, as maiores incidências são identificadas nas Regiões Sudeste (7,45/100 mil) e Sul (6,53/100 mil) (INCA, 2019).

Com relação a mortalidade, tem sido relatado que este tipo de câncer apresenta uma taxa de 74.000 mortes por ano, como estimativa mundial (HUSSEIN; SOSLOW, 2018). No Brasil, a taxa bruta de mortalidade é de 1,77/100 mil, sendo que em 2017, um total de 1.827 mortes foram declaradas. A taxa de mortalidade é consideravelmente menor que a taxa de incidência desse tipo de câncer, e isso pode ser justificado por uma alta taxa de sobrevivência em comparação com outros cânceres. Cerca de 80% das pacientes diagnosticadas com câncer do corpo do útero atingem a sobrevivência de cinco anos (INCA, 2019). Ao contrário da incidência, que é maior em países desenvolvidos, a mortalidade por câncer de corpo do útero é maior em países em desenvolvimento (FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; MATHERS *et al.*, 2019).

1.1.2 Classificação histopatológica

Câncer de endométrio (CE) se origina no revestimento interno do útero, e em sua maioria, a partir de células epiteliais do endométrio, sendo classificados como adenocarcinomas. Tradicionalmente, CE são classificados em dois tipos patogênicos, tipo I e II, baseados em características clínicas e metabólicas (BOKHMAN, 1983).

O CE de tipo I apresentam um perfil histológico endometrióide e representa mais de 80% dos casos de CE. A presença de citologia atípica, como hiperplasia, está associado a um alto risco de progressão a malignidade, conferindo risco de 40 a 60% para desenvolvimento de CE. Apresentam-se como neoplasias de baixo grau e estão associados à obesidade, hiperplasia endometrial e prognósticos favoráveis, assim como histórico de nuliparidade (mulheres que nunca tiveram filhos), menarca (primeiro fluxo menstrual) precoce, menopausa tardia e uso de Tamoxifeno (droga de indicação antineoplásica que atua como modulador seletivo do receptor de estrógeno). Em particular, está associada a diversos fatores de risco relacionados ao histórico familiar, possivelmente por sua relação com a concentração de estrógeno circulante, o que pode aumentar a exposição do endométrio a este hormônio. A nível molecular, tumores frequentemente apresentam variantes nos genes *PTEN*, *KRAS*, *CTNGB1* e *PIK3CA*.

Tumores do tipo II são independentes de estrógeno e sua histologia é do tipo não-endometrióide, apresentando principalmente carcinomas serosos e de células claras. Seu diagnóstico é mais comumente estabelecido em estadiamento avançado e, conseqüentemente, possuem um prognóstico pior que os CE de tipo I, sendo todos os casos definidos como de alto grau. Diferente dos tumores de tipo I, esse tipo de CE está mais associado a mulheres em pós-menopausa e um endométrio atrófico. Amplificações do gene *HER2* e variantes em *TP53* são variantes frequentemente identificadas nesse tipo tumoral (BUCHANAN; WEINSTEIN; HILLSON, 2009; HUSSEIN; SOSLOW, 2018). Aproximadamente 40% dos óbitos por CE ocorrem em pacientes com tumores do tipo II, ainda que esses estejam presentes em apenas 10 a 20% dos casos (MOORE; FADER, 2011).

Histologicamente, CE são classificados em tipos endometrióide, mucinoso, seroso, de células claras (Figura 1), neuroendócrino, misto, e carcinomas não-diferenciados e dediferenciados. Uma pequena parte dos tumores (menos de 2%) apresenta diferenciação mesenquimal, e são denominados como carcinosarcoma (DEDES; WETTERSKOG; ASHWORTH; KAYE *et al.*, 2011).

Os carcinomas endometrióides são os mais comuns, representando aproximadamente 85% dos casos. Nesses tumores, as células malignas imitam o tecido proliferativo normal do endométrio. De acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (PECORELLI, 2009), podem ser divididos em três graus arquiteturais (1 a 3) dependendo da porcentagem de crescimento de áreas sólidas não morulares/não escamosas. Tumores de grau 1 são compostos quase exclusivamente por glândulas (até 5% de áreas sólidas), tumores de grau 2 apresentam 6-50% de áreas sólidas, enquanto tumores de grau 3 apresentam mais de 50% de áreas sólidas. Tumores com maior grau arquitetural estão associados a um pior prognóstico (BRAUN; OVERBEEK-WAGER; GRUMBO, 2016).

Carcinomas serosos representam de 3 a 10% dos casos de CE, e por apresentarem um comportamento agressivo, acarretam um número alto de mortes. Tem como característica principal uma citologia atípica, que consiste de núcleos de alto grau com nucléolos eosinofílicos e figuras mitóticas atípicas. Em sua arquitetura, mais frequentemente apresentam padrões glandulares e papilares. Todos tumores serosos são classificados como de alto grau (ZHENG; XIANG; FADARE; KONG, 2011). A lesão precursora dos carcinomas serosos é denominada como carcinoma intraepitelial seroso endometrial, e apresenta células morfológicamente idênticas aquelas do carcinoma seroso, porém ficam confinadas a superfícies epiteliais do endométrio, sem evidência de invasão do tecido subjacente (HARIRI; QARMALI; FADARE, 2018; SANDERSON; MOULLA; FEGAN, 2019).

Carcinomas de células claras são raros e representam menos de 5% dos carcinomas de endométrio. Na prática clínica, tumores que apresentam apenas células claras são classificados como de grau 3, porém características clinicopatológicas e moleculares sugerem que carcinomas de células claras são um grupo heterogêneo. Suas células apresentam uma morfologia de núcleos de alto grau, com citoplasma claro que cresce em padrões arquiteturais sólidos e papilares (HAN; SOSLOW; WETHINGTON; LEVINE *et al.*, 2015).

Carcinomas não-diferenciados ou indiferenciados são definidos como tumores sem nenhuma evidência de diferenciação, enquanto tumores diferenciados são compostos por áreas indiferenciadas e áreas de carcinoma endometrióide de grau 1 ou 2. Nesse segundo grupo, o componente endometrióide é idêntico aos carcinomas endometrióides puros. Os componentes indiferenciados são caracterizados por células epiteliais homogêneas, sem diferenciação glandular, que crescem de em padrão sólido

(HOANG; LEE; KARNEZIS; TESSIER-CLOUTIER *et al.*, 2016; YIGIT; EKINCI; HAYRULLAH; OCAL *et al.*, 2018). Os componentes de baixo grau são comumente encontrados na superfície do endométrio, enquanto as áreas indiferenciadas infiltram o miométrio (BELL; ELLENSON, 2019).

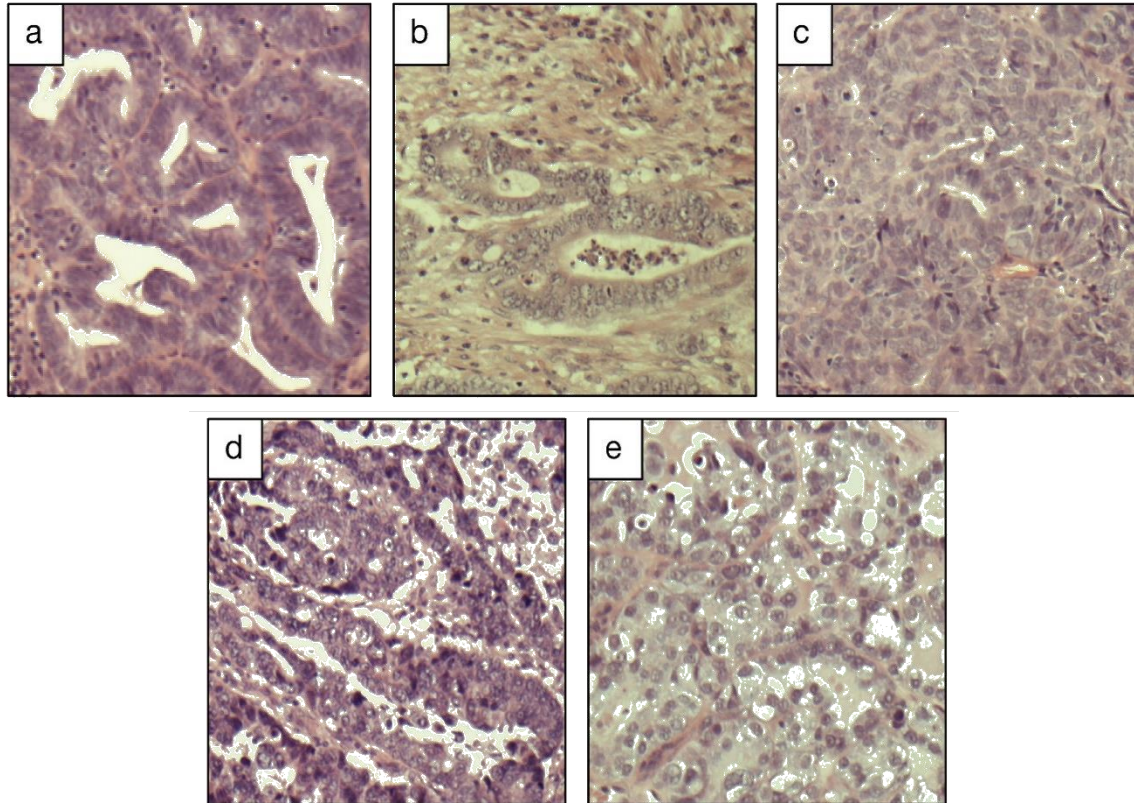


Figura 1. Representação de lâmina histológica corada com hematoxilina/eosina (H/E). (a-c) Carcinomas endometrióides de (a) grau arquitetural 1, (b) grau arquitetural 2, (c) grau arquitetural 3, (d) carcinoma seroso de alto grau, (e) carcinoma de células claras. Adaptado de (SANDERSON; MOULLA; FEGAN, 2019)

1.1.3 Classificação molecular

Em 2013, uma nova classificação foi proposta pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) após análise de 373 CE, observando dados de exoma, transcriptoma, análise de variação no número de cópias (CNV), teste de instabilidade de microssatélite e perfil de metilação (KANDOTH; SCHULTZ; CHERNIACK; AKBANI *et al.*, 2013). Essa classificação inclui quatro grupos: tumores ultramutados com variantes no gene *POLE* (7%); tumores hipermutados com instabilidade de microssatélite (MSI) (28%); CE com baixas taxas de mutação e CNVs (CNV *low*) (39%); e CE com baixa taxa de mutações e alta taxa de CNV (CNV *high*) (26%). A taxa de sobrevivência varia entre os diferentes tumores (Figura 2) (TALHOUK; MCCONECHY; LEUNG; LI-CHANG *et al.*, 2015).

O grupo com tumores ultramutados apresentam variação no domínio exonuclease da DNA-Polimerase *épsilon* (*POLE*), o que resulta em uma taxa de mutações alta, com cerca de 232×10^6 mutações para cada 1 milhão de pares de bases (mutações/Mb). Este grupo representa 10% dos tumores endometrióides, carcinomas de baixo e alto grau, e que apresentam um bom prognóstico e uma baixa incidência de recorrência (HUSSEIN; WEIGELT; LEVINE; SCHOOLMEESTER *et al.*, 2015). As variantes somáticas mais frequentes são identificadas nos genes *PTEN* (94%), *PIK3CA* (71%), *PIK3R1* (65%), *FBXW7* (82%), *ARID1A* (76%), *KRAS* (53%), e *ARID5B* (47%) (BOSSE; NOUT; MCALPINE; MCCONECHY *et al.*, 2018).

Os tumores que apresentam MSI acontecem por alterações no sistema de reparo de malpareamento de DNA (MMR, do inglês, *mismatch repair*), principalmente o silenciamento somático do gene *MLH1* por metilação da região promotora. Ocorre em 30% dos tumores endometrióides de grau 1 a 3, e apresentam uma taxa mutacional de 18×10^6 mutações/Mb. Além das variantes nos genes do sistema MMR, são observadas variantes nos genes *PTEN* (88%), *RPL22* (33%), *KRAS* (35%), *PIK3CA* (54%), *PIK3R1* (40%), e *ARID1A* (37%) (YEN; WANG; FADER; SHIH *et al.*, 2020).

Os outros dois grupos apresentam baixa taxa mutacional ($2,9 \times 10^6$ mutações/Mb), e se diferenciam pela frequência de CNV. Tumores com baixa taxa de CNV apresentam estabilidade de microssatélite (MSS) e incluem mais da metade dos tumores endometrióides de baixo grau. Ao contrário, quase a totalidade (97,7%) dos tumores de histologia serosa e 75% dos carcinomas mistos são no grupo com alta taxa de CNV. Em geral estes tumores exibem o pior prognóstico entre os quatro subgrupos (KUHN; WU; GUAN; WU *et al.*, 2012; YEN; WANG; FADER; SHIH *et al.*, 2020; ZHAO; CHOI; OVERTON; BELLONE *et al.*, 2013). Os genes mais frequentemente mutados nos tumores com baixa taxa CNV são *PTEN* (77%), *CTNNB1* (52%), *PIK3CA* (53%), *PIK3R1* (33%), e *ARID1A* (42%); e tumores com alta taxa de CNV, *TP53* (92%), *PPP2R1A* (22%) e *PIK3CA* (47%), além de instabilidade cromossômica, com ampliações recorrentes nos genes *MYC*, *ERBB2*, *CCNE1*, *FGFR3* e *SOX17* (PIULATS; GUERRA; GIL-MARTIN; ROMAN-CANAL *et al.*, 2017).

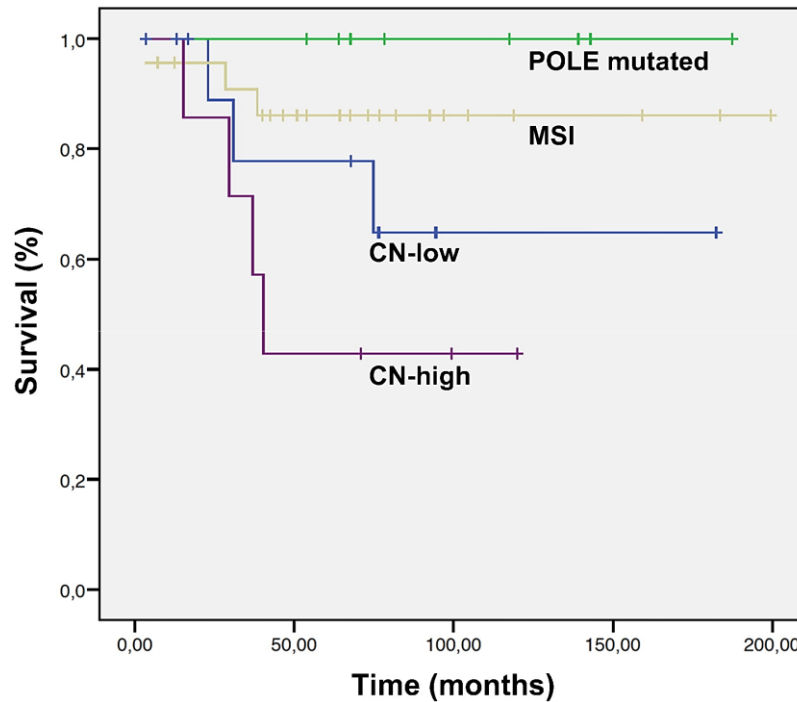


Figura 2. Gráfico Kaplan-Meier de sobrevida geral de pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio de alto grau. *POLE mutated*, tumores ultramutados com variantes no gene *POLE*; *MSI*, tumores hipermutados com instabilidade de microssatélite; *CN-low*, CE com baixa taxa de mutação e baixa frequência de CNV; *CN-high*, CE com baixa taxa de mutações e alta taxa de CNV. Fonte: (PIULATS; GUERRA; GIL-MARTIN; ROMAN-CANAL *et al.*, 2017)

1.1.4 Fatores de risco

Fatores de risco podem aumentar as chances do desenvolvimento de doenças, e incluem fatores ambientais, hábitos de vida e histórico familiar. A idade representa um fator de risco importante para o desenvolvimento de câncer de endométrio, sendo a maioria das mulheres diagnosticadas após os 65 anos. Apenas 15% dos casos acometem mulheres com menos de 50 anos, e menos de 5% ocorrem antes dos 40 anos (SGO; BURKE; ORR; LEITAO *et al.*, 2014; SOLIMAN; OH; SCHMELER; SUN *et al.*, 2005). Enquanto, mulheres mais velhas frequentemente apresentam câncer em alto grau e uma sobrevida geral limitada, alto risco de recorrência e mortalidade (HAG-YAHIA; GEMER; EITAN; RABAN *et al.*, 2020), o diagnóstico do câncer em mulheres com menos de 40 anos é considerado um fator prognóstico positivo, principalmente por características histológicas favoráveis. Porém, tanto em tumores diagnosticados em menor idade, quanto em mulheres com mais de 60 anos, existe uma heterogeneidade significativa, e portanto, podem ocorrer casos de tumores de baixo e alto grau em ambos os grupos (SON; CARR; YAO; RADEVA *et al.*, 2020).

Outros fatores de risco estão associados a alterações nos níveis hormonais. Estrogênio tem função mitogênica no tecido normal do endométrio, levando ao crescimento do tecido durante a fase folicular do ciclo menstrual. O pico de estrogênio é inibido na fase lútea do ciclo pela progesterona, o que diminui a proliferação das células endometriais. De forma consistente com os papéis dos hormônios no crescimento do endométrio, a exposição prolongada de estrogênio sem oposição da progesterona está associada como fator de risco para CE, principalmente de tumores do tipo I (LIANG; SHANG, 2013; ZHOU; ZHANG; YANG; WU *et al.*, 2019).

O uso de estrogênio como terapia de reposição hormonal, prescrito para controle de sintomas comuns que acompanham a menopausa, aumenta de 2 a 20 vezes o risco para desenvolvimento de CE. Em contraste, a prescrição contínua ou intermitente de progesterona reduz significativamente esse risco (EDEY; RUNDLE; HICKEY, 2018).

Outras causas para essa expressão endógena de estrogênio são: anovulação (ausência de ovulação) crônica causada por síndrome de ovário policístico (JIA; YANG; XU; LI *et al.*, 2020); produção de estrogênio por tumor; e conversão excessiva de androstenediona em estrona pelo tecido adiposo, que é posteriormente convertida em estrogênio no endométrio (SGO; BURKE; ORR; LEITAO *et al.*, 2014).

Em associação a essa conversão realizada pelo tecido adiposo, a obesidade é considerada um dos fatores de risco mais importantes e prevalentes, aumentando em 3 vezes o risco de a mulher desenvolver CE (SECORD; HASSELBLAD; VON GRUENIGEN; GEHRIG *et al.*, 2016). Em um estudo recente, a associação entre o índice de massa corpórea (IMC) e câncer de endométrio foi mais forte para tumores desenvolvidos pré-menopausa, em comparação com tumores diagnosticados pós-menopausa, porém este resultado pode estar relacionado a terapias de reposição hormonal (RAGLAN; KALLIALA; MARKOZANNES; CIVIDINI *et al.*, 2019). Para cada 5 kg/m² aumentada no IMC, o risco para câncer de endométrio sobre 1,59 vezes (RENEHAN; TYSON; EGGER; HELLER *et al.*, 2008; SMRZ; CALO; FISHER; SALANI, 2020).

O antineoplásico Tamoxifeno (TMX), um modulador seletivo do receptor de estrogênio, age como um antagonista de estrogênio no tecido mamário, e é utilizado para tratamento adjuvante em casos de câncer de mama positivos para a expressão de receptores de estrógeno do tipo alfa (ER α , do inglês, *estrogen receptor- α*). Contrariamente, ele atua como um agonista no tecido do endométrio e ósseo. Também pela alta exposição a estrogênio, o uso de tamoxifeno está associado com um aumento de

6 a 8 vezes na incidência de câncer de endométrio (LEE; PIAO; JEON, 2020; SGO; BURKE; ORR; LEITAO *et al.*, 2014).

Diabetes mellitus também está associada com um aumento de 2 vezes no risco para CE, e pode estar relacionada com a obesidade, porém já foi descrita como fator de risco de forma independente (SOLIMAN; WU; TORTOLERO-LUNA; SCHMELER *et al.*, 2006). Todavia, é importante ressaltar que a maioria dos trabalhos que concluem uma associação entre diabetes e o risco para câncer de endométrio não se ajustaram a fatores como obesidade ou índice de massa corpórea, e prática de atividades físicas, que podem confundir os resultados, e portanto, devem ser corrigidos antes de realizar a associação entre diabetes e CE (LUO; BERESFORD; CHEN; CHLEBOWSKI *et al.*, 2014).

Histórico de hipertensão arterial sistêmica (HAS) é outro fator associado ao desenvolvimento de câncer de endométrio. Estudos tem relatado resultados contraditórios sobre essa associação, e assim como a diabetes, as conclusões desses estudos podem ser confundidas devido a outros fatores como obesidade ou outras comorbidades prévias. Uma revisão sistemática e metanálise desses estudos apresenta que HAS pode acarretar um aumento de até 61% no risco relativo para desenvolvimento de câncer de endométrio (AUNE; SEN; VATTEN, 2017; SGO; BURKE; ORR; LEITAO *et al.*, 2014).

Além de fatores ambientais e de hábitos de vida, o histórico familiar é considerado um fator de risco independente, estando relacionados à origem de cerca de 5 a 10% de todos os casos de câncer de endométrio (BUCHYNSKA; IURCHENKO; GLUSHCHENKO; NESINA, 2017; DOLL; ABAL; RIGAU; MONGE *et al.*, 2008; GRUBER; THOMPSON, 1996).

1.2 Predisposição genética

O papel da predisposição genética na suscetibilidade para desenvolvimento de câncer começou a ser observado em algumas famílias, nas quais cânceres específicos parecem ser transmitidos de forma hereditária, e mais tarde, a partir da observação de que um histórico familiar de câncer de primeiro e segundo grau confere um risco aumentado para o desenvolvimento dos mesmos tipos tumorais. Eventualmente, ficou claro que existiam famílias que apresentavam uma forte suscetibilidade para cânceres específicos, como câncer de mama e ovário, colorretal e de endométrio (HODGSON, 2020).

A partir dessas evidências, sugeriu-se que os casos de cânceres familiares observados na população poderiam ser causados pela presença de variantes raras em

genes que conferem essa predisposição ao câncer. Alguns genes foram descritos como de alta penetrância para essa predisposição, e quando associados a tipos específicos de tumores definiram diversas síndromes hereditárias de predisposição ao câncer. Porém, considerando que nem todas as famílias podem ser diagnosticadas com síndromes já conhecidas, entende-se que outros genes também podem estar envolvidos (HODGSON, 2020). Os critérios para identificar os padrões de síndromes hereditárias incluem idade precoce no desenvolvimento do câncer, manifestação da síndrome em diversos membros da família e tumores primários afetando o mesmo órgão. (STADLER; ROBSON, 2015).

As síndromes hereditárias de neoplasias malignas têm origem em células germinais (variante germinativa), e, portanto, depois das divisões celulares, essas alterações se conservam e se mantêm presentes em todas as células do organismo. Em sua maioria, pode-se descrever que ocorre principalmente pela variante em um gene único (herança monogênica). Portanto, síndromes hereditárias de predisposição ao câncer estão presentes em indivíduos que apresentam variantes herdadas, e, por isso, possuem um risco aumentado de desenvolvimento e manifestação de certos tipos de cânceres, principalmente em idade precoce. (RAHNER; STEINKE, 2008).

Um histórico familiar com vários casos de câncer é um dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de tumores, incluindo o câncer de endométrio. Essa característica determina características clínicas e tumorais, que estão envolvidas no prognóstico do câncer (BUCHYNSKA; IURCHENKO; GLUSHCHENKO; NESINA, 2017). Com estimativa variável, é possível observar um aumento do risco de desenvolvimento de CE em mulheres que tenham pelo menos uma familiar de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com histórico de câncer de endométrio. Além do histórico de CE, pode ser associado ao desenvolvimento deste tipo de tumor com agregação familiar com cânceres de outros tipos, como colorretal, mama e ovário (WIN; REECE; RYAN, 2015).

O risco relacionado com histórico familiar em relativos de primeiro grau é reportado de forma inconsistente na literatura, enquanto a associação entre relativos de segundo e terceiro grau apresenta uma maior probabilidade de ser causada por fatores genéticos (WIN; REECE; RYAN, 2015). Algumas síndromes já apresentam uma associação conhecida com câncer de endométrio, como a síndrome de Lynch, associada ao sistema MMR e a mais prevalente entre casos de CE, e demais síndromes como síndrome de Cowden, Peutz-Jeghers, entre outras.

1.3 Síndromes de Predisposição a CE ligadas a disfunção do sistema MMR

1.3.1 Sistema de reparo de malpareamento de DNA (MMR)

Danos ao DNA se acumulam nas células como resultado de processos exógenos ou endógenos. Uma das causas internas da célula são erros que ocorrem durante o metabolismo normal ou aberrante de processamento do DNA, que incluem replicação, recombinação e reparo. Em geral, o processo de replicação de DNA possui uma alta especificidade e fidelidade, porém erros no pareamento podem ocorrer e devem ser corrigidos. Se não ocorrer o reparo, o acúmulo de danos tem potencial para gerar mutações somáticas ou germinativas, que por sua vez, acarretam alterações no fenótipo celular e causam disfunção e doenças. Para prevenir esses efeitos negativos, em células normais, erros no pareamento são corrigidos por sistemas de reparo, como a via de reparo de malpareamento de DNA (MMR). Essa correção previne que as mutações causadas durante a replicação se tornem permanentes nas células em divisão (IYER; PLUCIENNIK; BURDETT; MODRICH, 2006; LI, 2008).

Os principais componentes do sistema MMR foram inicialmente identificados em células procariontes, mais especificamente em bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) (COX; DEGNEN; SCHEPPE, 1972; WAGNER; MESELSON, 1976). Em estudos seguintes, foi observado que todos os organismos eucariontes, incluindo levedura, camundongos e humanos, também possuíam as proteínas do sistema MMR, principalmente os homólogos a MutS (MSHs) e MutL (MLHs). A partir disso, pôde-se concluir que o sistema MMR em eucariotos era muito conservado durante a evolução, e que se diferenciavam do sistema em procariontes, em razão das proteínas do sistema em eucariontes formarem heterodímero para funcionar, enquanto trabalham como homodímeros nas células procariontes (JUN; KIM; BAN, 2006; KOLODNER, 1996; MODRICH; LAHUE, 1996).

O sistema MMR tem função importante nos processos de reparo pós-replicação, também atua durante a meiose em eucariotos, e na maturação e diversificação de imunoglobulinas nos mamíferos. Principalmente, as proteínas MMR promovem estabilidade genômica em todos organismos, por corrigirem malpareamento de nucleotídeos e, inserções e deleções causadas por deslizamento da polimerase durante replicação e recombinação (MUKHERJEE; RIDGEWAY; LAMB, 2010). A taxa de erro da polimerase durante a replicação é de cerca de 10^{-5} por nucleotídeo; quando presente, domínios de revisão da polimerase (exonuclease) conseguem diminuir essa taxa em cerca de 100 vezes, baixando para 10^{-7} por base. Tendo função normal, o sistema MMR reduz

de 100 a 1000 vezes a taxa de erro, chegando de 10^{-9} a 10^{-10} por nucleotídeo (LIU; KEIJZERS; RASMUSSEN, 2017).

A reação típica de MMR em células humanas envolve três etapas principais: detecção do erro e identificação da fita de DNA recém-sintetizadas; excisão do malpareamento; e ressíntese do DNA. O início do processo ocorre quando as proteínas de reconhecimento de malpareamento, MutS α (heterodímero entre MSH2-MSH6), se ligam a base incompatível, o que aciona uma cascata de interação entre os heterodímeros MutS, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), RFC (Fator de Replicação C) e o complexo MutL α (heterodímero de MLH1 e PMS2). Essa interação leva ao recrutamento da exonuclease 1 (Exo1) para realizar a quebra da fita sintetizada no ponto onde ocorreu o malpareamento. A excisão é feita algumas bases antes e depois da base malpareada de forma dependente de MutS α , MutL α e da proteína de replicação A (RPA). Para finalizar o reparo, a polimerase delta (DNA Pol δ) preenche o trecho da fita que foi excisada, usando a fita parental como modelo; nesse processo inclui a interação da polimerase com PCNA, RPA e RFC, seguida pela ligação da quebra pela proteína DNA ligase (HUANG; LI, 2018; TAMURA; KANEDA; FUTAGAWA; TAKESHITA *et al.*, 2019).

Outras proteínas também fazem parte do sistema MMR, e formam diferentes complexos proteicos, porém a função desses heterodímero ainda não foi totalmente estabelecida. Além de MutS α e MutL α , que representam 90% do conteúdo do sistema MMR funcional, os heterodímeros MutS β (MSH2-MSH3), MutL β (MLH1-PMS1) e MutL γ (MLH1-MLH3) também estão presente nas células humanas (HSIEH; ZHANG, 2017).

1.3.2 Síndromes de Lynch

Grande parte dos casos de CE associados a fatores hereditários são relacionados à síndrome de Lynch (SL), também conhecida como Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipoide (HNPCC, do inglês, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Syndrome*). A SL é descrita como uma afecção hereditária autossômica dominante, causado por alterações genéticas monoalélicas em genes do sistema MMR. Representa de 2 a 6% dos casos de carcinoma de endométrio, e determinar predisposição para outros tipos de câncer, como o colorretal, gástrico, pancreático, de ovário, e outros (WALKOWSKA; KALLEMOSE; JONSSON; JONSSON *et al.*, 2019). Em um estudo

com casuística brasileira, foi observado uma frequência de 4,1% de síndrome de Lynch entre cânceres de endométrio não selecionados, através de uma metodologia de triagem universal (ROSA; SANTIS; TEIXEIRA; MOLFETTA *et al.*, 2020).

As principais variantes germinativas observadas em pacientes com SL são encontradas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, seguido de deleções no gene codificador da molécula de adesão celular epitelial (*EpCAM*, do inglês, *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016; TAKAHASHI; SATO; SUGAWARA; KATO *et al.*, 2017). Cerca de 90% dos casos diagnosticados com síndrome de Lynch apresentam variantes nos genes *MLH1* e *MSH2*. Sendo que em mulheres com as variantes nos genes MMR, o risco acumulado do desenvolvimento de CE é de 20 a 70% (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016), e a prevalência de variantes nesses genes, em tumores de endométrio, variam entre 2 e 5,9% (WANG; MCCRACKEN; LI; XU, 2018).

Estudos avaliando o risco de desenvolvimento de câncer de endométrio por cada gene específico, apresentaram um risco de 27 a 54% para mulheres portadoras de variantes nos genes *MLH1*, risco variando entre 40 e 60% para portadores de variantes em *MSH2*, enquanto mulheres com variantes no gene *MSH6* chegam a um risco de 71% aos 70 anos (AARNIO; SANKILA; PUKKALA; SALOVAARA *et al.*, 1999; HENDRIKS; WAGNER; MORREAU; MENKO *et al.*, 2004; MEYER; BROADDUS; LU, 2009). O diagnóstico da SL e suas variantes em indivíduos, depende da presença de variante nos genes MMR e de critérios clínicos que auxiliam na identificação de famílias de alto risco.

Os primeiros critérios clínicos foram agrupados e chamados de Amsterdam I e II (AC1 e AC2, respectivamente), sendo que o primeiro, descrito em 1991, identifica famílias que apresentam apenas casos de câncer colorretal. Entretanto o Amsterdam II, finalizado em 1999, descreve situações familiares que também envolvam cânceres extracolônicos, e incluem alguns critérios, tais como: três ou mais familiares com cânceres associados à SL (colorretal, endométrio, intestino delgado, renal e ureter), apresentando um parentesco de primeiro grau com um dos outros; com a presença de duas ou mais gerações envolvidas; e um ou mais cânceres diagnosticados até os 50 anos (TAKAHASHI; SATO; SUGAWARA; KATO *et al.*, 2017; TIWARI; ROY; LYNCH, 2016).

Em 1997 foram publicadas as Recomendações de Bethesda (tradução do inglês, *Bethesda Guidelines*), com objetivo de identificar uma gama maior de pacientes em risco,

aumentado a sensibilidade do diagnóstico da SL, avaliando os tumores que deveriam ser testados quanto a instabilidade de microssatélites. As recomendações de Bethesda incluem a investigação de casos que apresentam histórico familiar e câncer em idade precoce. Estes critérios foram revisados e simplificados em 2004, dando origem às Recomendações de Bethesda Revisadas (Quadro 1) (CASTELLS; BALAGUER; CASTELLVI-BEL; GONZALO *et al.*, 2007; LYNCH; SNYDER; SHAW; HEINEN *et al.*, 2015).

Quadro 1. Critérios clinicopatológicos para identificação da síndrome de Lynch.

Critério de Amsterdam I (1991) (VASEN; MECKLIN; KHAN; LYNCH, 1991)

Para diagnóstico de SL é necessário, pelo menos, 3 familiares com câncer colorretal confirmado, sendo:

1. No mínimo, um familiar com parentesco de primeiro grau com os outros dois;
2. No mínimo, duas gerações sucessivas devem ser afetadas;
3. No mínimo, um dos familiares com diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos;
4. O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) deve ser excluído.

Critério de Amsterdam II (1999) (VASEN; WATSON; MECKLIN; LYNCH, 1999)

Para diagnóstico de SL é necessário, pelo menos, 3 familiares com câncer colorretal ou um câncer do espectro da síndrome*, sendo:

1. No mínimo, um familiar com parentesco de primeiro grau com os outros dois;
2. No mínimo, duas gerações sucessivas devem ser afetadas;
3. No mínimo, um dos familiares com diagnóstico de câncer antes dos 50 anos;
4. O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) deve ser excluído nos casos de câncer colorretal;
5. Tumores devem ser confirmados por exames histopatológicos.

Recomendações de Bethesda (1997) (RODRIGUEZ-BIGAS; BOLAND; HAMILTON; HENSON *et al.*, 1997)

Para diagnóstico de SL é necessário que o indivíduo atenda a pelo menos um dos seguintes critérios:

1. Indivíduos com câncer colorretal que preencham os critérios de Amsterdam I;
2. Indivíduos com dois tumores do espectro da síndrome de Lynch, sincrônicos ou metacrônicos;
3. Indivíduos com câncer colorretal e um familiar em primeiro grau com câncer do espectro da síndrome, diagnosticado antes dos 45 anos, e/ou um adenoma colorretal, diagnosticado em idade inferior a 40 anos;
4. Indivíduos com câncer colorretal ou câncer de endométrio diagnosticado abaixo dos 45 anos;

5. Indivíduos com câncer colorretal, no lado direito do intestino grosso, diagnosticado antes dos 45 anos, sendo o tumor de histologia indiferenciada e característica sólida ou cribriforme (células irregulares, com presença de células eosinofílicas grandes com pequenos espaços, similar a glândulas);
6. Indivíduos com câncer colorretal diagnosticado abaixo dos 45 anos, com tumor composto por mais de 50% de células do tipo anel de sinete;
7. Indivíduos com adenomas diagnosticados abaixo dos 40 anos.

Recomendações de Bethesda Revisadas (2004) (UMAR; BOLAND; TERDIMAN; SYNGAL et al., 2004)

Para indicação que um câncer seja testado quanto à presença de instabilidade de microssatélites é necessário que o indivíduo atenda a pelo menos um dos seguintes critérios:

1. Indivíduo diagnosticado com câncer colorretal antes dos 50 anos;
2. Presença de dois cânceres do espectro da síndrome de Lynch, sincrônicos ou metacrônicos, independentemente da idade;
3. Indivíduo diagnosticado com câncer colorretal antes dos 60 anos, com histologia apresentando alta instabilidade de microssatélite (MSI-H);
4. No mínimo, um familiar de primeiro grau diagnosticado com algum câncer do espectro da síndrome de Lynch antes dos 50 anos;
5. No mínimo, dois ou mais familiares de primeiro de segundo grau diagnosticados com algum câncer do espectro da síndrome de Lynch, independentemente da idade.

Legenda: * Tumores do espectro da síndrome de Lynch incluem: endométrio, estômago, ovário, intestino delgado, ureter, pelve renal, cérebro, trato hepatobiliar e tumores sebáceos de pele; MSI-H, da sigla em inglês, *microsatellite instability high*.

Embora os critérios de Amsterdam e as recomendações de Bethesda sejam amplamente utilizados para identificar grupos de risco para síndrome de Lynch, ambos foram desenvolvidos focados em câncer colorretal, e não abrangem todas os casos de câncer de endométrio (SGO; BURKE; ORR; LEITAO *et al.*, 2014). Para atender essa necessidade, em 2007, a Sociedade Americana de Oncologia Ginecológica (SGO, do inglês, *Society of Gynecologic Oncology*) desenvolveu critérios para identificar casos com risco elevado para síndrome de Lynch entre mulheres com cânceres ginecológicos (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS *et al.*, 2007).

Baseado em critérios como idade precoce ao diagnóstico do câncer e histórico familiar de cânceres dentro do espectro da SL, a SGO estabeleceu dois grupos: mulheres com uma probabilidade de 5 a 10% de serem portadoras de variantes germinativas em genes do sistema MMR; e mulheres com probabilidade de 20 a 25% (Quadro 2) (BRUEGL; DJORDJEVIC; BATTE; DANIELS *et al.*, 2014). Para o grupo de mulheres

com 5 a 10% de risco, o aconselhamento genético e o diagnóstico molecular é moderadamente recomendado, porém para mulheres com 20 a 25% de risco para variantes germinativas em genes do sistema MMR, esse manejo genético é fortemente recomendado (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS *et al.*, 2007).

Ao investigar a eficácia desses critérios em um coorte de 76 pacientes com câncer de endométrio que eram portadoras de variantes germinativas associadas a síndrome de Lynch, Ryan e colaboradores (2012) observaram que os critérios da SGO para 5 a 10% de risco foram mais efetivas para identificar corretamente mulheres portadoras de variantes, estando correto em 93% dos casos. Os critérios para 20 a 25% de risco, identificaram corretamente 71% das mulheres (RYAN; MULLIGAN; ARONSON; FERGUSON *et al.*, 2012).

Quadro 2. Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS *et al.*, 2007).

Com probabilidade de 5 a 10% de serem portadoras de variantes germinativas em genes do sistema MMR.

O preenchimento de um dos seguintes critérios enquadra o paciente no grupo:

1. Indivíduo diagnosticado com câncer de endométrio ou colorretal antes dos 50 anos;
2. Indivíduo com câncer de endométrio ou ovário, com um outro câncer do espectro da síndrome de Lynch, diagnosticado de forma sincrônica ou metacrônica antes dos 50 anos.
3. Indivíduos com câncer de endométrio ou colorretal e um familiar em primeiro grau com câncer do espectro da síndrome*, diagnosticado antes dos 50 anos;
4. Indivíduos com câncer de endométrio ou colorretal diagnosticado em qualquer idade, com dois ou mais familiares de primeiro ou segundo grau diagnosticados em qualquer idade com câncer do espectro da síndrome;
5. Indivíduo com familiar em primeiro grau que preencha algum dos critérios anteriores.

Com probabilidade de 20 a 25% de serem portadoras de variantes germinativas em genes do sistema MMR.

O preenchimento de um dos seguintes critérios enquadra o paciente no grupo:

1. Indivíduo diagnosticado com câncer de endométrio ou câncer colorretal que preencha os critérios de Amsterdam II;
2. Indivíduo com câncer de endométrio ou câncer colorretal sincrônico ou metacrônico, sendo o primeiro diagnosticado antes dos 50 anos;

3. Indivíduo com câncer de ovário ou câncer colorretal sincrônico ou metacrônico, sendo o primeiro diagnosticado antes dos 50 anos;
4. Indivíduo com câncer de endométrio ou câncer colorretal com tumor apresentando deficiência para o sistema MMR, evidenciado por instabilidade de microssatélites ou com imuno-histoquímica mostrando perda da expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2.
5. Indivíduo com um familiar em primeiro grau com variante conhecida em algum gene do sistema MMR.

Legenda: * Tumores do espectro da síndrome de Lynch incluem: endométrio, estômago, ovário, intestino delgado, ureter, pelve renal, cérebro, trato hepatobiliar e tumores sebáceos de pele.

Considerando que a detecção de variantes nos genes MMR é um processo complexo, e que há um amplo espectro de possíveis variantes, houve necessidade de identificar outras técnicas de diagnóstico molecular que pudessem triar os pacientes com maior probabilidade para serem portadores da síndrome de Lynch, sendo esses casos encaminhados para sequenciamento das variantes. Para isso foram indicadas a avaliação da presença das proteínas do sistema MMR no tumor pela imunohistoquímica e a instabilidade de microssatélite (MSI, do inglês, *microsatellite instability*) (VASEN; BLANCO; AKTAN-COLLAN; GOPIE *et al.*, 2013).

Regiões de microssatélites são compostas por repetições em tandem de curtas sequências de DNA, que podem ser constituídas por unidades de 1 a 6 nucleotídeos. Essas repetições estão distribuídas por todo o genoma e ocorrem com uma frequência maior do que esperado simplesmente ao acaso, com uma alta taxa de polimorfismo (ELLEGREN, 2004). Ao contrário das regiões não repetidas no DNA, o polimorfismo nas regiões de microssatélites ocorre principalmente por variabilidade em comprimento ao invés de variações na sequência dos nucleotídeos. Outro contraste importante é a alta taxa de heterozigosidade e a presença de alelos múltiplos nos *loci* de microssatélites. Essas variações causam o malpareamento das bases, gerando fragmentos não pareados, que ocorrem quando um nucleotídeo da fita senso não se parecia corretamente com a fita anti-senso. Inserções e deleções nos microssatélites localizados em regiões codificadoras podem gerar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (em inglês, *frameshift*) que levem a tradução de proteínas truncadas (JIRICNY, 2006; VILAR; GRUBER, 2010).

Microssatélites estão propensos ao acúmulo de mutações, principalmente causadas pela derrapagem da polimerase no decorrer dos processos de replicação do DNA (*DNA polymerase slippage*), erros que geralmente são reparados pelo sistema MMR (HONG, 2018). Deficiência nesse sistema de reparo causa um acúmulo de mutações no

DNA, o que resulta em instabilidade de microssatélites, que está associada a quadros de hipermutabilidade, câncer e resistência quimioterápica. A instabilidade de microssatélites está relacionada à expansão ou contração das repetições no DNA, e são utilizados como marcadores para diversos estudos de genética populacional e de doenças associadas ao quadro, o que é o caso de cânceres como colorretal e endometrial, tumores clássicos dentro do espectro da síndrome de Lynch (ELLEGREN, 2004; JIA; GUO, 2013; SAMOWITZ, 2008).

A avaliação de instabilidade em tumores ocorre pela determinação da presença de variações nas regiões de nucleotídeos repetidos (microssatélites), sendo essa variação chamada de instabilidade de microssatélite. A detecção desse fenômeno é realizada pela comparação no tamanho do fragmento amplificado, por PCR (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), da região entre células normais e tumorais (Figura 3). Tumores que apresentam diferentes tamanhos dos encontrados em tecido normal são considerados como tumores com presença de instabilidade de microssatélite, sendo essa presença podendo ser considerada alta (MSI-H, H do inglês, *high*) ou baixa (MSI-L, L do inglês, *low*). Tumores que não apresentam diferença de tamanho são considerados como tumores com estabilidade de microssatélite (MSS, do inglês, *microsatellite stable*).

Altos níveis de MSI detectados no DNA tumoral podem representar duas causas principais: síndrome de Lynch ou alguma etiologia esporádica que cause a metilação, e subsequente silenciamento da transcrição do promotor do gene *MLH1* (MEYER; BROADDUS; LU, 2009). Mais de 95% dos tumores associados a síndrome de Lynch apresentam instabilidade de microssatélite, em contrapartida a 10-15% de MSI em tumores esporádicos (MARTIN-LOPEZ; FISHEL, 2013; MEYER; BROADDUS; LU, 2009).

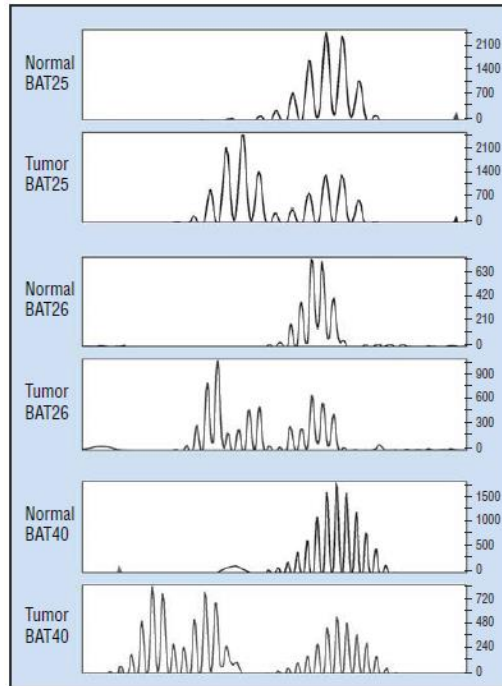


Figura 3. Representação de resultado de instabilidade em uma análise de microssatélite usando três marcadores, BAT25, BAT26 e BAT40. O material tumoral apresenta um aumento do número de picos em comparação ao tecido normal (MEYER; BROADDUS; LU, 2009).

No câncer de endométrio, a instabilidade de microssatélites está presente em 15 a 25% das pacientes de uma coorte não selecionada. A maioria dos tumores que apresentam esse fenótipo estão relacionados a metilação somática do promotor do gene *MLH1*. Entre os pacientes que atendem aos critérios clínicos de Síndrome de Lynch, um grupo significativo (40-50% das famílias diagnosticadas com SL) não apresentam instabilidade ou variantes nos genes do sistema MMR, considerados como microssatélite estável (MSS) (BASIL; GOODFELLOW; RADER; MUTCH *et al.*, 2000; STEWART, 2013).

A testagem de instabilidade de microssatélite em câncer de endométrio possui uma questão associada a variantes no gene *MSH6*. Tumores originados de variantes nesse gene comumente apresentam um fenótipo de baixa instabilidade de microssatélite ou estáveis, o que se apresenta como um resultado discordante a variante. Entre pacientes com CE, a probabilidade de identificar mulheres com variantes germinativas em *MSH6* é cinco vezes maior, quando comparado com casos de câncer colorretal (DE LEEUW; DIERSSEN; VASEN; WIJNEN *et al.*, 2000).

Além da MSI, a imunohistoquímica (IHQ) também pode ser utilizada para identificar deficiência no sistema MMR em tumores através da análise de expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 no tumor (BRUEGL; DJORDJEVIC; BATTE; DANIELS *et al.*, 2014). Imunohistoquímica é uma das técnicas auxiliares mais

importantes na caracterização de neoplasias, tendo função em especificar subtipos de tumores dentro de um mesmo tipo de câncer, o que é significativo no manejo da paciente. Atualmente, a técnica é muito utilizada no diagnóstico patológico pós-cirúrgico e usado para determinar o tipo celular do câncer e possível origem de um câncer metastático com tumor primário desconhecido ou indeterminado (IDIKIO, 2009).

A imunohistoquímica é uma técnica para identificação de marcadores de célula ou tecido denominados antígenos, por meio de interações entre antígeno e anticorpo, sendo o anticorpo específico para o marcador a ser investigado, sendo a seleção do anticorpo é baseada nessa especificidade. Reações positivas são determinadas pela interação e ligação do antígeno avaliado e o anticorpo, e portanto, ocorrerão em tecidos em que a proteína está expressa. Quando ocorrem erros na produção da proteína, e essa então não é expressa no tecido, o resultado da IHQ é negativo e isso caracteriza um tumor deficiente para aquela proteína (RAMOS-VARA, 2017) (Figura 4).

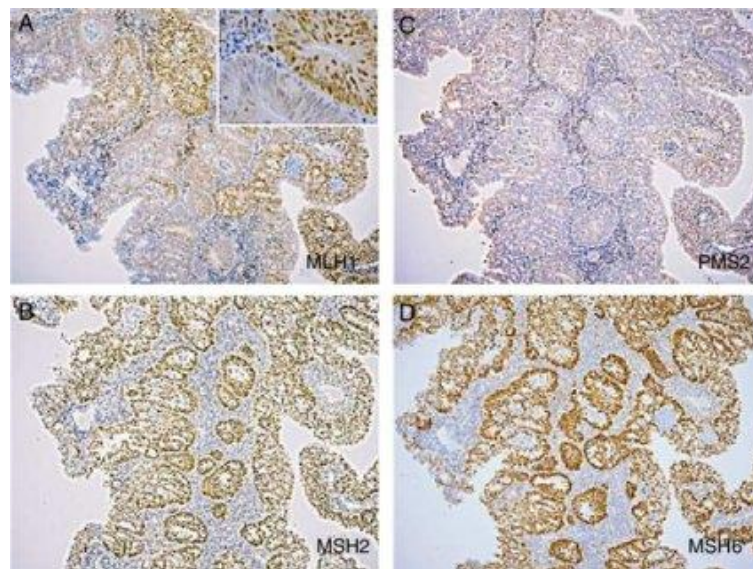


Figura 4. Representação resultado de marcação imunohistoquímica para proteínas do sistema MMR. A, Marcação parcial da proteína MLH1, representando perda clonal em heterozigose. B, Marcação positiva/normal da proteína MSH2. C, Perda total da expressão de PMS2. D, Marcação normal da proteína MSH6. Adaptado de (KATO; SATO; SUGAWARA; TAKAHASHI *et al.*, 2016).

As reações positivas são reveladas pelo uso de anticorpos marcados com fluoróforos ou a enzima peroxidase, processos denominados como imunofluorescência e imunoperoxidase, respectivamente. O uso desses métodos permite a visualização de informação que não está disponível no tecido corado com hematoxilina e eosina (H/E), tendo ainda a vantagem da marcação de proteínas *in-situ* na célula (IDIKIO, 2009).

A marcação com IHQ possui uma alta sensibilidade para detecção de tanto casos com MSI-H, quanto para casos com variantes germinativas. Hampel et al (2006) demonstrou que o método de imunohistoquímica conseguiu detectar 90/96 casos de tumores de endométrio com instabilidade de microssatélite alta e 13/20 casos de MSI-L, e confirmou 2/3 casos com variante germinativa no gene *MSH2*, 1/1 casos associados com *MLH1*, e 5/6 casos de tumores deficientes para *MSH6*. Nos casos em que a IHQ não identificou corretamente o gene com variante germinativa, a variante encontrada era do tipo substituição (em inglês, *missense*) (HAMPEL; FRANKEL; PANESCU; LOCKMAN et al., 2006).

Os valores de sensibilidade e especificidade das técnicas são variáveis. Para MSI, a sensibilidade varia entre 77-100% e a especificidade, entre 69-81%, sendo que o valor preditivo negativo fica entre 97-100%. Em relação a IHQ, os valores de sensibilidade e especificidade variam entre 89-100% e 48-81%, respectivamente, com um valor preditivo negativo de 100%. Porém, para ambas as metodologias, a variabilidade deve ser considerada e pode ser causada por variações na técnica ou pelo uso de diferentes anticorpos, para IHQ, e marcadores, para MSI (STEWART, 2013).

Ainda que a IHQ e MSI sejam consideradas como metodologias complementares no diagnóstico e classificação de câncer de endométrio, a instabilidade de microssatélite apresenta algumas vantagens em relação a outra técnica. Em casos que o material tumoral é escasso, a avaliação de MSI utiliza uma quantidade menor de tecido, além de que essa técnica é mais sensível para detectar variantes do tipo *missense*, que as vezes continua sendo expressa na célula, e, portanto, detectável pela IHQ, porém não tem função adequada no sistema MMR (LIN; CHEN, 2014; ZHANG, 2008).

1.3.2.1 Síndromes de Muir-Torre

A síndrome de Muir-Torre (MTS) é uma condição hereditária rara caracterizada por neoplasias sebáceas e malignidade visceral. Foi descrita por Muir et al (MUIR; BELL; BARLOW, 1967) e Torre (TORRE, 1968) e é considerada como variante incomum da síndrome de Lynch. A incidência da MTS é baixa, com cerca de 200 casos relatados desde 1999, e cerca de 5,8% dos casos apresentam histórico de malignidade visceral, desses 13,9% são acometidos também com tumores sebáceos e 2,4% apresentam casos de queratoacantomas. Assim como a SL, a etiologia da MTS está relacionada às alterações nos genes de reparo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (PONTI; MANFREDINI; TOMASI; PELLACANI, 2016).

Os tumores sebáceos ocorrem antes das neoplasias viscerais em cerca de 22% dos casos, concomitantemente em 6% dos casos ou, mais frequentemente, após os tumores internos (56%), com uma linha temporal de até 25 anos antes até 37 anos depois. Em 16% dos casos não houve correlação temporal entre tumores. A idade média para desenvolvimento dos tumores sebáceos é 53 anos, com variação entre 21 e 88 anos (NAVI; WADHERA; FUNG; FAZEL, 2006).

Estudos relatam que entre famílias diagnosticadas com síndrome de Lynch, cerca de 9% apresentam algum indivíduo com histórico associado a síndrome de Muir-Torre, e portanto, recomendam que pacientes com variantes patogênicas nos genes do sistema MMR realizem acompanhamento com dermatologista para prevenir lesões sebáceas e de pele associadas a MTS (PONTI; LOSI; PEDRONI; LUCCI-CORDISCO *et al.*, 2006; SOUTH; HAMPEL; COMERAS; WESTMAN *et al.*, 2008).

O diagnóstico de MTS é determinado por critérios clínicos, que compreende uma neoplasia sebácea e, pelo menos, um câncer de órgão interno, em um paciente que não apresenta fatores de contribuição externo como radioterapia ou AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Quadro 3) (SCHWARTZ; TORRE, 1995).

Quadro 3. Critérios para diagnóstico para síndrome de Muir-Torre (SCHWARTZ; TORRE, 1995).

Critérios modificados para diagnóstico da síndrome de Muir-Torre.	
Para diagnóstico de MTS é necessário que o indivíduo atenda a um critério do Grupo A e B, ou todos os três critérios do Grupo C, ou por testes genéticos:	
Grupo A	<ul style="list-style-type: none"> • Adenoma sebáceo • Epitelioma sebáceo • Carcinoma sebáceo • Queratoacantoma sebáceo • Imunohistoquímica do tumor demonstrando perda da expressão para MLH1 e MSH6, ou MSH2, MLH1 e MSH6
Grupo B	<ul style="list-style-type: none"> • MSI no tumor • Malignidade visceral* • Câncer colorretal apresentando MSI
Grupo C	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiplos queratoacantomas • Múltiplas malignidades viscerais • Histórico familiar MTS

Resultado de testes genéticos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo: detecção de variante patogênica 2. Negativo: nenhuma variante identificada. Considerar os critérios clínicos antes da exclusão do caso. 3. Inconclusivo: variante de significado incerto (VUS)
-------------------------------	---

Legenda: * Tumores internos do espectro da síndrome da síndrome de Muir-Torre: colorretal, endométrio, ovário, intestino delgado, pâncreas, trato hepatobiliar, cérebro, mama e pulmão; MSI, instabilidade de microssatélite.

Entre pacientes com MTS, os tumores sebáceos se apresentam em três tipos principais, os adenomas sebáceos, que são os mais comuns, com uma frequência de 68%, seguido de carcinomas (30%) e epitelomas (27%). Em relação a malignidades viscerais, o adenocarcinoma colorretal é o mais comum, e normalmente ocorre de forma proximal a flexura esplênica. Outros cânceres reportados incluem tumores de endométrio, ovário, intestino delgado, pâncreas, trato hepatobiliar, cérebro, mama e pulmão (BHAJEE; BROWN, 2014; JOHN; SCHWARTZ, 2016). O diagnóstico de MTS em mulheres representa um risco aumentado para desenvolvimento de tumores ginecológicos. O aumento no risco para desenvolvimento de câncer de endométrio em mulheres de 20 a 60%, e para câncer de ovário, entre 9 e 12% (BOGANI; LEONE ROBERTI MAGGIORE; RASPAGLIESI, 2018).

Embora câncer de endométrio associado a MTS seja raro, mulheres com esse tipo de neoplasia devem ser acompanhada para outras malignidades viscerais, principalmente tumores colorretais, ou lesões de pele sebáceas, independentemente da presença de câncer colorretal no histórico familiar (TOHYA; OGURA; NISHI; NISHI *et al.*, 2008).

1.3.3 Síndrome de Deficiência Constitucional do Reparo de Pareamento

Outra variante da síndrome de Lynch é a Síndrome de Deficiência Constitucional do Reparo de Pareamento (CMMRD, do inglês, *Constitutional Mismatch Repair Deficiency*), que em contraste com SL, representa um risco alto de desenvolvimento de câncer nas duas primeiras décadas da vida. Indivíduos portadores dessa síndrome carregam variantes bialélicas em genes do sistema MMR, e, além do desenvolvimento precoce da neoplasia, apresentam um quadro clínico com mau prognóstico e tempo de sobrevida baixa (BAKRY; ARONSON; DURNO; RIMAWI *et al.*, 2014). As manifestações clínicas de CMMRD incluem cânceres também associados a Lynch, como câncer colorretal e de endométrio, adicionalmente associado a tumores do sistema hematológico, como leucemias e linfomas em crianças e adolescentes, e tumores

cerebrais, com idade média ao diagnóstico de 6 e 9 anos, respectivamente (BUSH; ARONSON; TABORI; CAMPBELL *et al.*, 2019).

Outros sinais e sintomas clínicos associado a síndrome incluem manchas café-com-leite, caracterizado por lesões na pele hipo e hiperpigmentadas (lesões características de neurofibromatose tipo I), síndrome de Turcot, definida pela existência conjunta de câncer colorretal e tumor cerebral, e polipose em intestino e colón. O aparecimento de um segundo tumor primário e uma alta chance de ocorrência de cânceres sincrônicos também são características prevalentes desta síndrome (NGUYEN; BOUGEARD; KOOB; CHENARD *et al.*, 2016).

Na maioria dos casos, os parentes da criança diagnosticadas com CMMRD são portadores de variantes germinativas em heterozigose nos genes do sistema MMR, e a transmissão de ambas as variantes para o filho caracteriza a doença autossômica recessiva. Por causa desse aumento do risco de desenvolvimento de câncer em idade muito precoce, as crianças devem seguir um programa intenso de supervisão e profilaxia (LEENDERS; WESTDORP; BRUGGEMANN; LOEFFEN *et al.*, 2018). Um estudo acompanhou duas irmãs com CMMRD por 10 anos, e durante esse período, quinze cânceres foram detectados, incluindo carcinomas intestinais, em altura de jejuno, e astrocitoma anaplásico, todos de alto grau (DURNO; ARONSON; TABORI; MALKIN *et al.*, 2012).

As variantes bialélicas nos genes MMR, seja em homozigose ou heterozigose composta, acarretam a inabilidade da célula de reparar o DNA, o que causa, devido ao grande número de mutações acumuladas, a instabilidade de microssatélite e perda da integridade genômica. Os casos em que as variantes são nos genes *MLH1* ou *MSH2* estão mais propensos ao desenvolvimento de tumores hematológicos (WIMMER; KRATZ, 2010), enquanto indivíduos deficientes para *MSH6* ou *PMS2* tem um maior risco de desenvolvimento de tumores cerebrais. Casos de tumores colorretais são mais frequente em portadores de variantes bialélicas em *PMS2* e *MHS6* (DANIELS; LU, 2015; WESTDORP; KOLDERS; HOOGERBRUGGE; DE VRIES *et al.*, 2017). Câncer de endométrio já foi relatado em uma paciente que apresentou dois outros cânceres, de ovário sincrônico e gástrico metacrônico, e foi identificada uma variante bialélica no gene *PMS2* (RAMCHANDER; RYAN; CROSBIE; EVANS, 2017).

1.4 Síndromes de Predisposição a CE sem acometimento do sistema MMR

1.4.1 Síndrome de Cowden

A síndrome de Cowden (CS, do inglês, *Cowden syndrome*) foi descrita em 1963 como um síndrome hereditária, dominante e multissistêmica, caracterizada pelo desenvolvimento de hamartomas (tumores benignos), lesões mucocutâneas, e está associada ao aumento do risco para neoplasias, tanto benignas quanto malignas (LLOYD; DENNIS, 1963; MESTER; ENG, 2015; SCHMELER; DANIELS; BRANDT; LU, 2009). Entre os hamartomas, os mais frequentes entre pacientes com CS são triquilemomas, que são tumores benignos originados nos folículos capilares, e lesões papilomatosas mucocutâneas, e ocorrem na grande maioria (frequência acima de 90%) dos indivíduos afetados pela síndrome. No caso de tumores malignos, lesões em mama e tireoide são os mais comuns, e ocorrem em ao menos dois terços dos casos de síndrome de Cowden (BOROWSKY; SETIA; ROSTY; CONRAD *et al.*, 2019; ENG, 2000).

Mulheres diagnosticadas com CS apresentam um aumento no risco de desenvolvimento de câncer de endométrio, chegando a 28% (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016). Além de CE, portadores dessa variante possuem um risco de desenvolvimento de carcinomas invasivos de mama (60%), tireoide (35%), rim (34%) e colorretal (9%) (MORSE; GARCIA; CALHOUN; SWISHER, 2015).

Câncer de endométrio é o único tumor ginecológico significativamente associado com CS, com um risco para início do desenvolvimento do tumor em torno dos 25 anos da paciente. No entanto, relatos de casos de CE em adolescentes já foram publicados, em ambos os casos a variante for herdada dos pais (BAKER; SOISSON; DODSON, 2013; SCHMELER; DANIELS; BRANDT; LU, 2009). Devido aos relatos de casos em idade tão precoce, principalmente em idade mais precoce do que esperado para outras síndromes, como a síndrome de Lynch, sugerem a avaliação de causas hereditárias em tumores de endométrio diagnosticados antes dos 50 anos (GAMMON; JASPERSON; CHAMPINE, 2016).

O diagnóstico é baseado principalmente em critérios clínicos, que foram descritos em 1983, e desde então já foi revisado, modificado e teve uma versão final descrita pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Quadro 4). Para o diagnóstico positivo, o paciente deve atender aos critérios da seguinte forma: (1) presença de qualquer lesão patognomônica, porém considera-se apenas presença da lesão caso exista mais de seis lesões faciais, com mais de três triquilemomas, pápulas cutâneas e papilomatose na

mucosa oral, com ou sem queratose acral, ou seis ou mais queratoses palmoplantar; (2) presença de dois critérios maiores, sendo que um precisa ser macrocefalia; (3) presença de um critério maior e três critérios menores; (4) presença de quatro critérios menores (PILARSKI; BURT; KOHLMAN; PHO *et al.*, 2013).

Quadro 4. Critérios para diagnóstico para síndrome de Cowden (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2020; PILARSKI; BURT; KOHLMAN; PHO *et al.*, 2013)

Critérios patognomônicos	<ul style="list-style-type: none"> • Doença de Lhermitte-Duclos (tumores cerebelares) • Lesões mucocutâneas: triquilemoma facial, queratose acral, lesão papilomatosas
Critérios maiores	<ul style="list-style-type: none"> • Câncer de mama • Carcinoma de tireoide não-medular • Macrocefalia (megalocéfalia): acima do percentil 97 • Carcinoma de endométrio
Critérios menores	<ul style="list-style-type: none"> • Outras lesões de tireoide (adenoma, bócio multinodular) • Retardo mental moderado (QI abaixo de 75) • Hamartoma gastrointestinal • Alterações fibrocísticas da mama • Lipomas • Fibromas • Tumores genitourinários (especialmente carcinoma renal) • Mioma uterino

Legenda: * Tumores internos do espectro da síndrome da síndrome de Muir-Torre: colorretal, endométrio, ovário, intestino delgado, pâncreas, trato hepatobiliar, cérebro, mama e pulmão; MSI, instabilidade de microssatélite; QI, quociente de inteligência.

A síndrome de Cowden foi associada a variantes no gene *PTEN* em 1997 (LIAW; MARSH; LI; DAHIA *et al.*, 1997). Em casos de famílias selecionadas pelos critérios clínicos, a frequência de variantes no gene *PTEN* chega a 80%, enquanto em famílias ou indivíduos não triados, a frequência das mutações varia entre 10 e 50% (ENG, 2000). Cerca de 45% dos casos de CS são causados por variantes *de novo*, ou seja, não transmitida pelos pais, porém pode ser transmitida para as próximas gerações (MESTER; ENG, 2012). Orloff et al observaram em uma casuística de pacientes com CS sem alteração germinativa do gene *PTEN*, que variantes germinativas nos genes *PIK3CA* e *AKT1* estavam presentes em cerca de 10% dos casos, sugerindo que ambos também sejam genes de susceptibilidade a síndrome (ORLOFF; HE; PETERSON; CHEN *et al.*, 2013). Hipermetilação do promotor do gene *KLLN* (BENNETT; MESTER; ENG, 2010), e

variantes germinativas nos genes *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* (NI; HE; CHEN; MOLINE *et al.*, 2012) também já foram identificadas em pacientes que atendem a critérios clínicos para síndrome de Cowden.

1.4.1.1 PTEN e via de sinalização

PTEN (homólogo de tensina e fosfatase deletado no cromossomo 10) é um gene de supressão tumoral localizado no cromossomo 10q23.3, que codifica uma proteína de 403 aminoácidos. Contém um domínio proteico e um domínio lipídico que são necessários para sua atuação como supressor tumoral. Genes supressores tumorais codificam proteínas que atuam no controle negativo de processos como ciclo celular, tendo assim envolvimento na inibição do desenvolvimento do câncer (HOLLANDER; BLUMENTHAL; DENNIS, 2011).

O gene atua como fosfatase lipídica que regula negativamente a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, participando de diversos processos biológicos como apoptose, proliferação, crescimento e metabolismo celular. A proteína promove a desfosforilação do fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) presente na membrana da célula para PIP2 (fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato). Esse processo é essencial para a ativação de Akt e, conseqüentemente, do restante da via. A expressão normal de *PTEN* mantém níveis diminuídos de PIP3, enquanto variantes de perda de função do gene *PTEN* podem resultar no crescimento desproporcional de células, ou mesmo no gatilho de início da oncogênese (FAROOQ; WALKER; BOWLING; AUDISIO, 2010; GAROFOLA; JAMAL; GROSS, 2020). Ao fazer essa desfosforilação, *PTEN* também contribui para a manutenção de um gradiente entre PIP3-PIP2 que regula mobilidade in diversas espécies e tipos celulares (FUNAMOTO; MEILI; LEE; PARRY *et al.*, 2002). Além da função principal na desfosforilação de PIP3, *PTEN* apresenta atividade de fosfatase intrínseca nos polipeptídeos tirosina, serina e treonina, se estabelecendo como uma proteína fosfatase com dupla especificidade (LEE; CHEN; PANDOLFI, 2018).

Análises genéticas mostram que *PTEN* atua como um supressor tumoral haploinsuficiente em alguns tecidos, essa informação já foi confirmada por estudos que demonstram que perda de um alelo (heterozigose) do gene é suficiente para o desenvolvimento de câncer, e níveis menores que 50% promovem uma aceleração na tumorigênese (ALIMONTI; CARRACEDO; CLOHESSY; TROTMAN *et al.*, 2010). Os tecidos apresentam uma sensibilidade específica a diminuição dos níveis de expressão de *PTEN*, para carcinogênese e progressão tumoral. No caso de tecidos como nódulos

linfáticos e glândulas mamárias, uma diminuição em 20% da expressão de *PTEN* já é suficiente para o início do desenvolvimento do tumor, enquanto tecidos como próstata requerem uma redução mais significativa (cerca de 70%) (CARRACEDO; ALIMONTI; PANDOLFI, 2011). Essas observações levaram a constituição do “modelo contínuo da supressão tumoral”, propondo que, diferente da hipótese de que é preciso a perda dos dois alelos para a inibição do efeito de supressão tumoral, níveis diferentes de expressão já podem ser suficiente para gatilho inicial do tumor (BERGER; KNUDSON; PANDOLFI, 2011; MALANEY; UVERSKY; DAVE, 2017). No caso do câncer de endométrio, uma diminuição de 20% leva o tecido normal ao desenvolvimento de displasia, enquanto com 50% da expressão, o tecido já inicia o desenvolvimento de câncer (DAIKOKU; HIROTA; TRANGUCH; JOSHI *et al.*, 2008).

1.4.2 Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase

A Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase (PPAP, do inglês, *Polymerase Proofreading-Associated Polyposis*) é uma síndrome hereditária autossômica dominante, que resulta um alto risco para desenvolvimento de câncer, incluindo principalmente colorretal e endométrio. A síndrome foi descrita recentemente, o estudo relatou que variantes germinativas em heterozigose no domínio de revisão das polimerases *POLE* e *POLD1*, predispunham o indivíduo, com alta penetrância, a múltiplos tumores (PALLES; CAZIER; HOWARTH; DOMINGO *et al.*, 2013). Devido a sua descrição recente, características clínicas ainda estão sendo avaliadas e atualizadas.

Até o momento, pacientes diagnosticados com PPAP apresentam adenomas de intestino grosso e câncer colorretal em idade precoce, com uma idade média aos 45 anos. Outros tumores identificados em família com PPAP incluem câncer de mama, ovário e de sistema nervoso central. O risco para câncer varia entre os dois genes principais da síndrome, sendo que indivíduos com mutações em *POLD1* apresentam cerca de 30% de risco para câncer aos 70 anos, enquanto essa porcentagem sobe para 80% nessa idade, para portadores de variantes em *POLE* (CHURCH, 2014). Mulheres portadoras de variantes germinativas em *POLD1* também apresentam um aumento significativo no risco de desenvolvimento de câncer de endométrio. Ao contrário, variantes em *POLE* conferem um melhor prognóstico dos casos de CE, o que pode ser explicado devido à alta taxa mutacional desses tumores (em inglês, *tumor mutational burden*), que acarreta uma grande quantidade de neoepítomos antigênicos e estimula considerável uma resposta imunológica antitumoral (RAYNER; VAN GOOL; PALLES; KEARSEY *et al.*, 2016).

Em um estudo de 2014, Spier et al observaram que um casuística de pacientes com polipose ou que atendiam a critérios de Amsterdam, 57,1% das mulheres com câncer de endométrio apresentavam variantes germinativas em *POLD1* (SPIER; HOLZAPFEL; ALTMULLER; ZHAO *et al.*, 2015).

As recomendações para teste genético variam para os genes *POLE* e *POLD1*, sendo que apenas no segundo caso existe recomendação direta para câncer de endométrio (Quadro 5) (BELLIDO; PINEDA; AIZA; VALDES-MAS *et al.*, 2016).

Quadro 5. Critérios para diagnóstico de Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase (BELLIDO; PINEDA; AIZA; VALDES-MAS *et al.*, 2016)

<i>POLE</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Polipose adenomatosa atenuada (20-100 adenomas) • Atendimento aos critérios de Amsterdam I (apenas CCR) • Câncer colorretal e oligopolipose (5-20 adenomas), ambos diagnosticados antes dos 50 anos • Câncer colorretal e oligopolipose (5-20 adenomas), com familiar de primeiro grau diagnosticados com CCR antes dos 50 anos • Câncer colorretal e oligopolipose (5-20 adenomas), com dois ou mais familiares de primeiro e segundo grau diagnosticados com CCR em qualquer idade
<i>POLD1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Polipose adenomatosa atenuada (20-100 adenomas) • Atendimento aos critérios de Amsterdam II (CCR e CE) • Câncer colorretal diagnosticados antes dos 50 anos ou câncer de endométrio abaixo dos 60 anos, e oligopolipose (5-20 adenomas) diagnosticada antes dos 50 anos • Câncer colorretal ou câncer de endométrio, e oligopolipose (5-20 adenomas), com familiar de primeiro grau diagnosticados com CCR antes dos 50 anos ou CE antes dos 60 • Câncer colorretal ou câncer de endométrio, e oligopolipose (5-20 adenomas), com dois ou mais familiares de primeiro e segundo grau diagnosticados com CCR ou CE em qualquer idade

Legenda: * CCR, câncer colorretal; CE, câncer de endométrio.

A maioria das variantes reportadas como patogênicas em *POLE* e *POLD1* são encontradas dentro do sítio ativo do domínio da exonuclease, região responsável pelo reparo de erros cometidos durante a replicação. Alterações nesse domínio prejudicam de forma significativa a atividade de revisão, aparentemente sem afetar a atividade da polimerase da proteína. Dessa forma, durante a replicação, a polimerase não é afetada,

porém erros não são revisados (HAMZAOUÏ; ALARCON; LEULLIOT; GUIMBAUD *et al.*, 2020; HANSEN; JOHANSEN; BJORNEVOLL; SYLVANDER *et al.*, 2015).

Tumores colorretais com mutações em *POLE* podem se apresentar como ultramutado, porém com fenótipo de estabilidade de microssatélite (MSS) (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). O mesmo já foi identificado para tumores endometriais, onde cerca de 7% dos CE esporádicos apresentavam variantes em *POLE* e fenótipo MSS. Esse resultado sugere que deficiência em ambos os sistemas de reparo, MMR e *POLE/POLD1*, podem promover mecanismos as células para que atingem instabilidade genômica e iniciem carcinogênese (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK; KANDOTH; SCHULTZ; CHERNIACK *et al.*, 2013; CHURCH; BRIGGS; PALLES; DOMINGO *et al.*, 2013).

1.4.2.1 *POLE e POLD1*

A polimerase α (Pol α) é responsável por iniciar a síntese de DNA, tanto na fita líder (*leading*; sentido 5'→3'), quando em cada fragmento de Okazaki na fita tardia (*lagging*; sentido 3'→5'). O restante da síntese da replicação do DNA é realizada pelas polimerases delta (Pol δ) e épsilon (Pol ϵ), que são proteínas traduzidas dos genes *POLD* e *POLE*, respectivamente. A Pol δ é responsável pela síntese da fita tardia, enquanto a Pol ϵ é responsável pela síntese da fita líder (HARADHVALA; POLAK; STOJANOV; COVINGTON *et al.*, 2016; STODOLA; BURGERS, 2017).

De forma complementar a atividade de polimerase, Pol δ e ϵ também possuem atividade como exonuclease 3'→5', que detecta e remove nucleotídeos malpareados pelo domínio polimerase. Essa função de correção aumenta a fidelidade do processo de replicação em cerca de 200 vezes (PARK; PURSELL, 2019; SHINBROT; HENNINGER; WEINHOLD; COVINGTON *et al.*, 2014). Os domínios das exonuclease estão localizados nos aminoácidos de 268 a 471, na Pol ϵ , e entre os aminoácidos 304 e 533 na Pol δ . Variantes patogênicas que alteram a estrutura e função desses domínios afetam a capacidade de revisão das polimerases, predispondo o portador da variante a um aumento no risco de desenvolver câncer (BELLIDO; PINEDA; AIZA; VALDES-MAS *et al.*, 2016; ROHLIN; EIENGARD; LUNDSTAM; ZAGORAS *et al.*, 2016).

Tumores com variantes em *POLE* e *POLD1* exibem um aumento drástico na taxa mutacional, causando o fenótipo de tumor ultramutado, possuindo uma assinatura mutacional específica caracterizada por transversões C:G→A:T (contexto TCT) e transições C:G→T:A (contexto TCG) (ALEXANDROV; NIK-ZAINAL; WEDGE;

APARICIO *et al.*, 2013; MUR; GARCIA-MULERO; DEL VALLE; MAGRANER-PARDO *et al.*, 2020). Estudos que avaliaram a frequência de variantes em casuísticas grandes, envolvendo diversos tipos tumorais relataram uma incidência de mutações entre 2,79% e 3,4% no gene *POLE*, e uma variação de 1,37% a 2,3% de tumores com mutação em *POLD1* (HE; OUYANG; ZHAO; SHAO *et al.*, 2021; WANG; ZHAO; WANG; JIN *et al.*, 2019; YAO; GONG; ZHAO; HAN *et al.*, 2019).

1.4.3 Síndrome de Peutz-Jeghers

A síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) é monogênica autossômica e dominante, caracterizada pelo aparecimento de hamartomas poliposos no intestino, manchas na pele e mucosas da boca, lábios e nariz, e risco aumentado de desenvolvimento de tumores malignos do trato digestivo e outros órgãos (BANNO; KISU; YANOKURA; MASUDA *et al.*, 2013; TAVUSBAY; ACAR; KAR; ATAHAN *et al.*, 2018). PJS foi descrita em 1895 em dois irmãos gêmeos que apresentavam máculas melanóticas na infância e, posteriormente, faleceram de outras causas que foram então associadas a síndrome, intussuscepção de intestino e câncer de mama (KOPACOVA; TACHECI; REJCHRT; BURES, 2009). No século seguinte, Peutz reportou a síndrome pela primeira vez em uma família com polipose gastrointestinal (PEUTZ, 1921).

A prevalência de PJS varia entre estudos, com relatos de frequência de 1 em 8.300 até 1 em 280.000 indivíduos. A síndrome também é reportada com penetrância variável, mesmo entre membros da mesma família, sendo que em alguns casos o indivíduo apresenta apenas hiperpigmentação, enquanto outros apresentam também pólipos e hamartomas (CHEN; FANG, 2009; ZBUK; ENG, 2007).

As lesões pigmentadas mucocutâneas ocorrem em cerca de 95% dos pacientes, e servem como primeiro sinal para diagnóstico da síndrome, ainda que não sejam únicas para PJS, ocorrendo em outras condições médicas. Tais lesões começam a ocorrer durante a infância, principalmente ao redor da boca, porém também aparecem na região das narinas, perianal, mãos e pés. Os pólipos associados a PJS se desenvolvem pelo trato gastrointestinal, mais frequentemente no intestino delgado, seguido por cólon e estômago (LATCHFORD; COHEN; AUTH; SCAILLON *et al.*, 2019).

O risco para desenvolvimento de câncer em portadores dessa síndrome é um pouco variável. Em estudos com 133 pacientes com PJS, 32% apresentam pelo menos um câncer durante a vida, com idade média ao diagnóstico do primeiro câncer foi aos 45 anos. Os tumores mais frequentes encontrados nessa casuística foram de origem colorretal,

intestino delgado, mama, gástrico e de pulmão. Tumores ginecológicos, no caso, câncer de ovário e cervical, também foram identificados na casuística (n = 6). O estudo concluiu um risco acumulado para câncer de 20% aos 40 anos, sendo diretamente relacionado com a idade, chegando ao risco de 76% aos 70 anos (VAN LIER; WESTERMAN; WAGNER; LOOMAN *et al.*, 2011). Outro estudo com casuística maior (n = 349) identificou 384 casos de câncer, diagnosticados em idade média de 42 anos. Os tumores mais frequentes foram colorretal, mama e intestino delgado, e o risco para câncer foi relatado entre 37 e 93% aos 70 anos (VAN LIER; WAGNER; MATHUS-VLIEGEN; KUIPERS *et al.*, 2010). O aumento do risco também está representado nos casos de cânceres ginecológicos, sendo que as mulheres portadoras da síndrome possuem um risco de cerca de 10% para o desenvolvimento de câncer de endométrio, com idade média ao diagnóstico aos 43 anos (GIARDIELLO; BRENSINGER; TERSMETTE; GOODMAN *et al.*, 2000).

Os critérios para diagnóstico clínico da síndrome de Peutz-Jeghers são divididos em duas categorias, uma para indivíduos com histórico familiar positivo para PJS e outro para pacientes com histórico familiar negativo. No primeiro caso, além do histórico familiar, considera-se o aparecimento de qualquer quantidade de pólipos com histologia associada a PJS ou pigmentação mucocutânea proeminente e característico. Para casos com histórico negativo, os critérios que devem ser atendidos são três ou mais pólipos com histologia confirmada para PJS ou qualquer número de pólipos mais as lesões pigmentadas características a síndrome (NAGTEGAAL; ODZE; KLIMSTRA; PARADIS *et al.*, 2020; VAN LIER; WESTERMAN; WAGNER; LOOMAN *et al.*, 2011).

A etiologia da PJS está relacionada à perda de heterozigose do gene *STK11*, um supressor tumoral. (BANNO; KISU; YANOKURA; MASUDA *et al.*, 2013; BEGGS; LATCHFORD; VASEN; MOSLEIN *et al.*, 2010). A proporção de PJS associado a variantes patogênicas no gene *STK11* varia entre 94 e 96%, e uma porcentagem considerável das variantes são de origem *de novo* (BORUN; DE ROSA; NEDOSZYTKO; WALKOWIAK *et al.*, 2015; RESTA; PIERANNUNZIO; LENATO; STELLA *et al.*, 2013). Outros estudos apresentam uma incidência menor das variantes em pacientes, relatando entre 30 e 80%, e indicam que as variantes mais encontradas são pequenas deleções e inserções ou substituição de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *single-nucleotide polymorphisms*). Em sua maioria, as variantes identificadas são preditas

a sintetizar uma proteína trucada, resultando na perda de função do domínio quinase (HEARLE; SCHUMACHER; MENKO; OLSCHWANG *et al.*, 2006).

1.4.3.1 STK11 e via de sinalização

O gene *STK11* atua como um gene de supressão tumoral, e foi demonstrado que essa função permite que as células sofram replicação constante com baixas taxas de malignidade. Também foi observado que a superexpressão do gene induz apoptose de forma dependente à proteína p53 (YOO; CHUNG; YUAN, 2002), e a parada no ciclo celular em processo dependente de VEGF e BRG1 (TIAINEN; VAAHTOMERI; YLIKORKALA; MAKELA, 2002). O gene está localizado no cromossomo 19p13.3, é composto por 10 éxons, sendo nove codificadores. Codifica uma proteína com 433 aminoácidos (MCGARRITY; AMOS, 2006). O domínio quinase com atividade da catalítica é altamente conservado na proteína, e fica localizado nos resíduos posicionados entre os aminoácidos 49 a 309 (WANG; CHEN; WU; ZHENG *et al.*, 2011).

A função de STK11 é complexa e ainda está sendo esclarecida, porém a proteína é expressa ubiquamente nos tecidos adultos e fetais, particularmente no pâncreas, fígado testículo e musculo esquelético. STK11 também tem um impacto importante no metabolismo e proliferação das células tumorais através da fosforilação e ativação de AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina) e outras quinases associadas (ISLAM; KHAN; PARVES; HOSSAIN *et al.*, 2019), dessa forma atuando como regulador negativo da via mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos). Essa regulação na via mTOR é importante pois tal via também está associada a outros genes, *PTEN*, *BMPRIA* e *SMAD4*, que estão relacionados a síndrome de predisposição a desenvolvimento de câncer e pólipos (BEGGS; LATCHFORD; VASEN; MOSLEIN *et al.*, 2010; CORRADETTI; INOKI; BARDEESY; DEPINHO *et al.*, 2004). Também atua na regulação da via Wnt (LIN-MARQ; BOREL; ANTONARAKIS, 2005).

In vivo, a proteína forma um heterotrímero com STRAD α e MO25 α , sendo que esse complexo estão envolvido na transição da proteína STK11 do núcleo para o citoplasma, sendo essa transição essencial para a função de supressão tumoral. A maioria das variantes desestabilizam o domínio C-terminal da proteína, prejudicando direta ou indiretamente o sítio de ligação do complexo, causando uma supressão significativa da atividade catalítica de STK11 (BOUDEAU; SCOTT; RESTA; DEAK *et al.*, 2004; RUNGSUNG; RAMASWAMY, 2019).

O efeito de haploinsuficiência, caracterizado por casos onde variantes em heterozigose causam a redução da expressão do gene normal, de forma que a dosagem não é suficiente para produzir um fenótipo normal, em comparação ao efeito de perda de função pela inativação dos dois alelos, ainda não foi completamente resolvida (MCGARRITY; AMOS, 2006). Porém estudos em modelo murino mostram que perda de apenas uma cópia do gene já é suficiente para formação de pólipos (MIYOSHI; NAKAU; ISHIKAWA; SELDIN *et al.*, 2002).

1.4.4 Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC)

Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC, do inglês, *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) é uma doença hereditária, de caráter autossômico dominante, caracterizada por um risco maior de desenvolvimento de tumores em idade precoce, mais de um câncer sincrônico ou metacrônico, e histórico familiar de familiares de primeiro e segundo grau com sinais e sintomas similares. Embora outros genes de menor penetrância, como *PALB2*, *CHEK2*, *ATM* e *NBN*, possam estar associados a síndrome, em sua maioria, pacientes com HBOC são portadores de variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (EASTON; PHAROAH; ANTONIOU; TISCHKOWITZ *et al.*, 2015; LUMISH; STEINFELD; KOVAL; RUSSO *et al.*, 2017).

Variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* são encontradas entre 2-10% de todos os tumores de mama e ovário, sendo que essa frequência (> 10%) é maior em pacientes de alto risco para câncer, que é definido por histórico de câncer de mama e ovário em familiares de primeiro grau, tumores bilaterais de mama e múltiplos cânceres em idade precoce (abaixo de 35 anos). Nos casos de pacientes com HBOC, *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por até 85% dos casos, e mulheres com variantes nesses genes apresentam um risco para câncer de mama de 60 a 80%, e para câncer de ovário, um risco menor, de 20 a 60% durante a vida (KOBAYASHI; OHNO; SASAKI; MATSUURA, 2013). Os riscos variam de forma tênue entre os genes: para variantes em *BRCA1*, o risco para câncer de mama é de 57-87% aos 70 anos, e para câncer de ovário é de 40-63% na mesma idade; para variantes em *BRCA2*, os riscos pra câncer de mama e ovário aos 70 anos são de 49-84% e 18-27%, respectivamente (YAMAUCHI; TAKEI, 2018).

Entre outros cânceres também associados ao portadores de HBOC, como próstata, pâncreas e estômago, o câncer de endométrio é relatado de forma conflitante, com muitos dados contrários. Alguns estudos demonstraram um aumento do risco para CE em portadores de variantes germinativas em *BRCA1* (BEINER; FINCH; ROSEN;

LUBINSKI *et al.*, 2007; SAULE; MOURET-FOURME; BRIAUX; BECETTE *et al.*, 2018). Porém outros estudos fazem a associação do risco para CE e *BRCA1/2* apenas em pacientes que fizeram uso de tamoxifeno, uma droga antineoplásica utilizada no tratamento de um câncer de mama (REITSMA; MOURITS; DE BOCK; HOLLEMA, 2013; SEGEV; IQBAL; LUBINSKI; GRONWALD *et al.*, 2013).

Os critérios clínicos para recomendação de testes genéticos em indivíduos com suspeita de HBOC incluem três grupos principais: (1) quando o paciente apresenta um familiar com uma conhecida variante patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2*; (2) pacientes com histórico pessoal de câncer; (3) pacientes sem histórico pessoal de câncer (Quadro 6) (NELSON; PAPPAS; ZAKHER; MITCHELL *et al.*, 2014; SIMON; PETRUCCELLI, 2009).

Quadro 6. Critérios para diagnóstico de HBOC (NELSON; PAPPAS; ZAKHER; MITCHELL *et al.*, 2014)

(1) Indivíduo de uma família que apresente uma variante patogênica já identificada em <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .	
(2) Histórico pessoal de câncer e ≥ 1 dos critérios	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico antes dos 45 anos • Diagnóstico acima de 50 com um familiar de grau próximo com câncer de mama aos 50 anos e/ou um familiar de grau próximo com câncer de ovário epitelial com qualquer idade • Dois cânceres de mama primários, sendo o primeiro diagnosticado antes dos 50 anos • Diagnóstico antes dos 60 anos com câncer de mama triplo negativo* • Diagnóstico antes dos 50 anos com um histórico familiar limitado • Diagnóstico em qualquer idade, com dois ou mais familiares de grau próximo com câncer de mama ou ovário epitelial com qualquer idade • Diagnóstico em qualquer idade, com dois ou mais familiares de grau próximo com câncer de pâncreas com qualquer idade • Familiar de grau próximo do sexo masculino com câncer de mama • Indivíduos de etnias associadas a uma maior taxa de mutações, (ex: Judeus Ashkenazi) • Histórico pessoal de câncer de ovário epitelial • Histórico pessoal de câncer de mama em homens

	<ul style="list-style-type: none"> • Histórico pessoal de câncer de pâncreas com qualquer idade, com dois ou mais familiares de grau próximo com câncer de mama ou ovário
(3) Sem histórico pessoal de câncer, mas ≥ 1 dos critérios	<ul style="list-style-type: none"> • Familiares de primeiro ou segundo grau que atendam à alguns dos critérios acima citados • Familiares de terceiro grau com câncer de mama ou ovário, e dois ou mais familiares de grau próximo com câncer de mama, sendo ao menos um diagnosticado antes dos 50 anos, ou de ovário.

Legenda: * Tumores que apresentem marcação negativa para receptor de estrogênio, progesterona e HER2 (receptor do fator de crescimento de epiderme 2, *human epidermal growth factor receptor-2*).

Em casuísticas de pacientes com CE com histórico familiar que atendem a critérios clínicos para HBOC, a frequência de variantes em *BRCA1/2* é variável. Em um estudo recente, 42.8% das mulheres eram portadoras de variantes germinativas, estratificadas em 66.7% com variantes em *BRCA1* e 33.3% em *BRCA2* (VIETRI; D'ELIA; CALIENDO; CASAMASSIMI *et al.*, 2021). Outros estudos, no entanto, variam entre 2% (PENNINGTON; WALSH; LEE; PENNIL *et al.*, 2013), e 14-27% de incidência (WONG; NGEOW, 2015). Os carcinomas serosos papilífero de endométrio são os mais associados a portadoras de variantes em *BRCA*. Essa histologia é mais agressiva e representa menos de 10% de todos os casos de CE (KADAN; RAVIV; SEGEV; LAVIE *et al.*, 2018).

1.4.4.1 *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram identificados durante a busca por uma etiologia hereditária em famílias com alta incidência de câncer de mama em idade precoce e câncer de mama em homens, respectivamente (HALL; LEE; NEWMAN; MORROW *et al.*, 1990; WOOSTER; BIGNELL; LANCASTER; SWIFT *et al.*, 1995; WOOSTER; NEUHAUSEN; MANGION; QUIRK *et al.*, 1994). Por esse motivo os genes foram nomeados como gene do câncer de mama 1 e 2 (em inglês, *Breast Cancer 1/2*). Estudos seguintes relataram que os genes atuam no reparo de DNA, através da recombinação homóloga, e como controle do ciclo celular (MUGGIA; SAFRA, 2014).

Recombinação homóloga (HR, do inglês, *homologous recombination*) é um processo que usa o cromátide irmã não-danificada para reparar com alta fidelidade trechos de DNA com danos de quebra de fita dupla (DSB, do inglês, *double-strand breaks*). HR é um dos mecanismos principais de proteção da integridade do genoma em células em

proliferação, pois erros de DSBs podem gerar deleções e translocações grotescas nos cromossomos (ROY; CHUN; POWELL, 2011; SCHLACHER; CHRIST; SIAUD; EGASHIRA *et al.*, 2011).

A proteína codificada pelo *BRCA1* existe como um heterodímero com BARD1 (do inglês, *BRCA1-associated RING Domain Protein 1*) e forma três complexos diferentes: complexo A, que está envolvido no reparo por recombinação homóloga; complexo B, que atua no controle do ciclo celular G₁/S; e complexo C, que faz o controle do ciclo celular G₂/M. A proteína BRCA2 atua principalmente na recombinação homóloga. Ela é responsável por recrutar a proteína RAD51, que é essencial para o reparo. BRCA2 apresenta uma afinidade tanto para reparo de quebras de fita única, quanto de fita dupla de DNA (PRAKASH; ZHANG; FENG; JASIN, 2015; VENKITARAMAN, 2014).

BRCA1 é uma proteína com 1.863 aminoácidos, que apresenta quatro domínios principais. A sua região N-terminal encerra um domínio RING, que se liga com BARD1 e forma uma E3-ubiquitina-ligase, que pode aumentar sua própria atividade. Um segundo domínio possui atividade de regulação transcricional, e interage com dois co-fatores: P300, uma histona acetiltransferase, e CBP, proteína ativadora de CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc). O domínio espiral enrolado (tradução livre de “*coiled-coil*”) atua na recombinação homóloga, pois ao se ligar ao domínio homônimo na proteína PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) permite a ligação com a região N-terminal de BRCA2, formando um complexo que auxilia na ligação com RAD51. Na região C-terminal, BRCA1 contém repetições em tandem do domínio BRCT (*BRCA1 carboxy-terminal repeats*), que reconhece a padrões fosforilados em proteínas parceiras Abraxas, BRIP1 e CtIP, e se liga a elas formando os complexos A, B e C, respectivamente. Os domínios BRCT só podem se ligar a uma proteína por vez e apenas um complexo pode ser formado e, portanto, são mutualmente exclusivos (PFEFFER; HO; SINGH, 2017). Uma parcela significativa das variantes germinativas em *BRCA1* encontradas em pacientes com câncer estão localizadas nos domínios BRCT e RING, o que indica que esses domínios sejam essenciais para a função do gene (ROY; CHUN; POWELL, 2011).

A proteína BRCA2, que contém 3.418 aminoácidos, também apresenta domínios que interagem com diferentes proteínas. A região N-terminal, como citado acima, se liga à PALB2 para auxiliar a ligação com RAD51. O domínio DBD contém três regiões distintas com funções na ligação com DNA de fita única, com DNA de fita dupla, e a ligação com a proteína DSS1, tendo essa uma associação com a estabilização da BRCA1, promovendo a atuação no reparo de DNA, desenvolvimento celular e degradação de

proteínas (PFEFFER; HO; SINGH, 2017). Ambas as proteínas são caracterizadas por extensas regiões não estruturadas, que possivelmente assumem conformações de estabilidade durante as ligações com outras proteínas, o que sugere que elas possuam atuação importante na formação de complexos de macromoléculas que agem em diferentes atividades celulares (VENKITARAMAN, 2019; VON NICOLAI; EHLEN; MARTIN; ZHANG *et al.*, 2016).

1.4.5 Síndrome de Li-Fraumeni

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS, do inglês, *Li-Fraumeni syndrome*) está entre as síndromes de predisposição ao câncer mais agressivas, e confere aos seus portadores um risco alto para câncer e em idade muito precoce. Caracteriza-se como uma doença hereditária autossômica dominante, que se manifesta por uma grande variedade de tumores, incluindo tumores de cérebro (meduloblastoma, glioma e neuroblastoma), sarcomas, tumores ósseos, e cânceres hematológicos, de mama, pulmão, do trato gastrointestinal, rim, tireoide (KRATZ; ACHATZ; BRUGIERES; FREBOURG *et al.*, 2017). Os tumores mais associados a LFS são denominados cânceres nucleares (tradução livre de “*core cancers*”) e incluem sarcomas de tecidos moles, osteosarcoma, câncer de mama pré-menopausa, tumores cerebrais e carcinoma adrenocortical (KAMIHARA; RANA; GARBER, 2014).

A síndrome foi descrita em 1969 (LI; FRAUMENI, 1969a; b), a partir de observações de um espectro único de cânceres em quatro famílias, cujo paciente inicial (probando, em inglês, *proband*) apresentou rabdomiossarcoma. Após melhor avaliação da família, eles relataram que irmãos e familiares de primeiro grau do probando dentro da mesma linhagem parental desenvolviam sarcomas, enquanto familiares de segundo grau ou mais afastado do probando apresentavam um histórico de tumores de mama, pulmão, pele e leucemia com uma frequência muito maior do que esperado para casos não relacionados (GUHA; MALKIN, 2017; LI; FRAUMENI; MULVIHILL; BLATTNER *et al.*, 1988).

Os sinais clínicos sugestivo de LFS são chamado de critérios de Chompret (CHOMPRET; ABEL; STOPPA-LYONNET; BRUGIERES *et al.*, 2001), e são classificados em quatro grupos de critérios: (1) critério familiar, quando o probando apresenta algum tumor do espectro da LFS antes dos 46 anos, e pelo menos um familiar de primeiro ou segundo grau com tumor do espectro da síndrome antes dos 56 anos ou

com múltiplos tumores; (2) critério de múltiplos tumores primários, paciente com tumores múltiplos durante a vida (exceto múltiplos tumores de mama), sendo ao menos dois que pertencem ao espectro de tumores da LFS, e o primeiro ocorra antes dos 46 anos; (3) critérios de tumores raros, paciente com carcinoma adrenocortical, tumores do plexo coroide ou rabdomiossarcoma do subtipo embrionário; (4) critério de câncer de mama em idade precoce, mulheres com câncer de mama antes dos 31 anos (BOUGEARD; RENAUX-PETEL; FLAMAN; CHARBONNIER *et al.*, 2015; RENAUX-PETEL; CHARBONNIER; THERY; FERMEY *et al.*, 2018).

Indivíduos com LFS são portadores de variantes germinativas no gene *TP53*. Variantes nesse gene são de alta penetrância, e apresentam um risco acumulado de incidência de câncer durante a vida de quase 100%. Variantes estão presentes em 80% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni (ANDRADE; DOS SANTOS; DE AGUIRRE NETO; NEVADO *et al.*, 2017). Os riscos para câncer variam entre homens e mulheres, que apresentam risco de 90% e 73% aos 60 anos, respectivamente. Ambos atingem o risco de câncer de 50% em idade diferentes, aos 31 anos para mulheres, e 46 anos para os homens (MAI; BEST; PETERS; DECASTRO *et al.*, 2016). O risco para desenvolver um segundo tumor varia entre 30-57%, enquanto o risco para um terceiro tumor durante a vida é de cerca de 40% (FREBOURG; BAJALICA LAGERCRANTZ; OLIVEIRA; MAGENHEIM *et al.*, 2020; VOGEL, 2017).

Na população brasileira, LFS tem uma alta prevalência devido efeito fundador de uma variante (c.1010G>A; p.R337H). Essa variante germinativa está presente em 0,3% da população das regiões Sul e Sudeste, o que é uma população estimada de mais de 300.000 brasileiros. Além dos tumores associados a síndrome, portadores da variante R337H apresentam uma maior incidência de câncer de tireoide papilífero em jovens adultos, câncer renal, e adenocarcinoma de pulmão (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; KRATZ; ACHATZ; BRUGIERES; FREBOURG *et al.*, 2017).

Câncer de endométrio não está incluso entre os tumores do espectro de Li-Fraumeni, porém alguns relatos na literatura descrevem o desenvolvimento de tumores endometriais em pacientes portadores de variantes germinativas em *TP53*. Em um estudo de 2015, foi relatado o caso de uma mulher que apresentou de forma sincrônica câncer de endométrio e mesotelioma peritoneal maligno aos 54 anos (CHAO; LAI; LEE; UENG *et al.*, 2015). Em um segundo relato, a paciente foi acometida por câncer de endométrio aos 18 anos, o que é excepcionalmente raro em casos de CE. Ela foi submetida a análise de variantes germinativas, onde foi identificado a variante R273H em heterozigose, e

posteriormente foi observado que no tecido tumoral, ocorreu a perda da heteroziguidade de *TP53*, o que é a hipótese do desenvolvimento do câncer em idade tão precoce. A paciente não tinha histórico familiar de câncer, e sua variante foi identificada como sendo *de novo*, e não herdada dos pais (CLARK; MENDERES; AZODI; FINBERG *et al.*, 2016).

1.4.5.1 *TP53 e via de sinalização*

O papel principal do gene de supressão tumoral, *TP53*, é controlar a progressão do ciclo celular, senescência, reparo de danos aos DNA, e metabolismo e morte celular. Pela sua atuação no controle na inibição da tumorigênese, *TP53* é referenciado como o “Guardião do Genoma” (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015; LANE, 1992). De forma resumida, *TP53* atua como um fator de transcrição, que pode tanto ativar, quanto reprimir a expressão de um grande número de genes e microRNAs (RAFFONE; TRAVAGLINO; CERBONE; DE LUCA *et al.*, 2020; SULLIVAN; GALLANT-BEHM; HENRY; FRAIKIN *et al.*, 2012).

Sinais de estresse, como estresse genotóxico, ativação de oncogenes, estresse do ribossomo e falta de oxigênio ou outros nutrientes, podem ativar uma resposta da proteína *TP53*, através de diferentes mecanismos. A expressão de *TP53* pode ser modulado por mudanças na transcrição, tradução e por efeitos de *splicing* do mRNA (RNA mensageiro), o que é relatado como a causa para variedade de isoformas da proteína que atuam de formas diferentes (MARCEL; FERNANDES; TERRIER; LANE *et al.*, 2014).

Embora a função mais conhecida de *TP53* seja como uma proteína de supressão tumoral, ela também ajuda no controle de diversos processos celulares associados a outras patologias. Assim como a habilidade para induzir apoptose e regular o estresse oxidativos, limitam a progressão do câncer, essas funções também já foram associados no desenvolvimento de obesidade, diabetes, síndromes ribossômicas e várias doenças neurodegenerativas (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015).

A profundidade dos processos biológicos envolvidos com *TP53* estão fundamentados em suas redes de interações que regulam sua expressão, localização dentro da célula e estabilidade. Esses processos são realizados por modificações pós-transcricionais, como fosforilação, acetilação, metilação e ubiquitinação, e por interações proteína-proteína. Um dos reguladores negativos de *TP53* melhor caracterizado é o gene *MDM2*, que codifica uma E3 ubiquitina-ligase que induz a degradação de *TP53*. *MDM2*

também inibe a atividade transcricional da proteína ao se ligar diretamente no seu domínio de transativação (MILLER; SHIROLE; TIAN; PAL *et al.*, 2016).

Ao contrário de outros genes de supressão tumoral que são principalmente alterados por variantes que resultem em proteína truncada, a maioria das variantes, cerca de 75%, em *TP53* são do tipo *missense*, quando ocorre a troca de nucleotídeo único. Outras alterações descritas são inserções e deleções do tipo *frameshift* (9%), variantes sem sentido (em inglês, *nonsense*) (7%) e mutações silenciosas (5%) (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; PETITJEAN; ACHATZ; BORRESEN-DALE; HAINAUT *et al.*, 2007). De uma proteína de 393 aminoácidos, as variantes em *TP53* identificadas em câncer estão comumente localizadas entre os éxons 4 e 9, onde está localizado o domínio de ligação com o DNA. (BAUGH; KE; LEVINE; BONNEAU *et al.*, 2018). Cerca de 30% das variantes são identificadas entre seis códons considerados *hotspot* (códon 175, 245, 248, 249 273 e 282). Os códons 245, 248 e 273 estão localizados no domínio de interação entre TP53 e DNA, enquanto os códons 175, 248 e 282 fazem parte do domínio de conformação da proteína (DONEHOWER; SOUSSI; KORKUT; LIU *et al.*, 2019; GUIMARAES; HAINAUT, 2002).

1.4.6 Outros genes associados a síndromes de predisposição a CE

Muitos genes já foram reportados como relevantes para o câncer de endométrio familiar/hereditário. O risco para predisposição a CE é influenciado por fatores genéticos, variando da herança de múltiplos genes de baixa penetrância, para variantes únicas em genes de alta penetrância. Atualmente, vários SNPs tem se mostrado significativamente associado com CE, de dados providos de análises de *locus* candidatos ou de associações a nível de exoma e genoma (CHENG; THOMPSON; O'MARA; PAINTER *et al.*, 2016). Alguns genes são reportados em linhagem germinativa e podem fazer parte da etiologia do câncer.

Variantes germinativas no gene *MUTYH* são conhecidas fatores de aumento de risco para câncer colorretal. O risco para tumores extracolônico ainda não está bem definido. No caso de câncer de endométrio, já foi reportado um risco de 2 a 6% para CE em mulheres portadoras de variantes monoalélicas (WIN; REECE; DOWTY; BUCHANAN *et al.*, 2016). De uma casuística de 225 pacientes com câncer de endométrio, foi identificado um indivíduo portador de variantes em heterozigose composta, causada pelas variantes Y165C e G396D, além de cinco pacientes com

variantes em heterozigose, sendo três casos com a variante G396D e duas com Y165C (BARNETSON; DEVLIN; MILLER; FARRINGTON *et al.*, 2007).

Ring et al realizou uma análise germinativa em uma casuística não selecionada de câncer de endométrio, utilizando uma metodologia de painel de genes. De um total de 381 pacientes testados, foram identificadas 22 variantes em genes da síndrome de Lynch, e 13 variantes em genes não associados a SL, sendo eles *CHEK2*, *APC*, *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *NBN*, *PTEN* e *RAD51C*. Dentre esses genes não associados a Lynch, todos menos o gene *APC* estão associadas a outras vias relacionadas a síndromes de predisposição hereditária a câncer. Estudos como esses revelam a necessidade de avaliar genes ainda não descritos em casos de câncer hereditário (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016).

Outros genes, como o *NTLHI* são relatados como achados em pesquisa científica que se tornam novos alvos para classificação molecular de tumores. Portadores de variantes em homozigose no gene *NTLHI* tem um risco aumentado para desenvolvimento de pólipos, e já foi relatado em pacientes com câncer de endométrio, em duas mulheres com idades de 57 e 74 anos. Esse resultado sugere que a perda da função dos dois alelos do gene aumenta o risco para desenvolvimento de tumores, principalmente colorretal, e possivelmente outros como endométrio, mama e pâncreas (SPURDLE; BOWMAN; SHAMSANI; KIRK, 2017).

Justificativa

Um dos principais problemas encontrado neste contexto de câncer de endométrio é a limitação dos estudos direcionados, em sua maioria, para síndrome de Lynch. Os estudos de possíveis correlações entre mulheres com câncer de endométrio com história sugestiva de predisposição hereditária a câncer, cujo tumor não apresenta instabilidade de microssatélite devem, portanto, abranger variantes em outros genes, além dos associados a SL, que quando mutados podem gerar uma vantagem para o desenvolvimento do tumor. O melhor entendimento neste aspecto impacta direta e positivamente o processo de aconselhamento do câncer para estas mulheres.

Diante do exposto, um grande número de genes podem apresentar diversas variantes que acarretam surgimento do câncer de endométrio familiar. Ainda assim, com o pouco conhecimento sobre as possíveis associações das variantes germinativas em mulheres diagnosticadas com tumores ginecológicos no Brasil, cria-se a necessidade de

desenvolver estratégias para melhorar o entendimento da predisposição e suas possíveis associações com as variantes germinativas para que seja possível um melhor esclarecimento da etiologia genética de tumores de endométrio proficientes para o sistema de reparo MMR.

Os mais recentes estudos que investigam a presença de variantes germinativas em casos de câncer de endométrio estão evoluindo, com a avaliação das variantes em casuísticas não triadas (LEE; MILNE; LHEUREUX; FRIEDLANDER *et al.*, 2017; LONG; LILYQUIST; WEAVER; HU *et al.*, 2019; TIAN; BI; REN; HE *et al.*, 2019) ou selecionadas para síndrome de Lynch (VIETRI; D'ELIA; CALIENDO; CASAMASSIMI *et al.*, 2021), entretanto não há trabalhos relatados que demonstrem as variantes em tumores estáveis para o sistema de reparo de malpareamento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Determinar presença de variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema MMR, com histórico familiar e/ou pessoal de câncer.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar casos de câncer de endométrio (CE) proficientes para a atividade do sistema de reparo MMR, quanto suas características clínicas e histopatológicas;
- Caracterizar histórico pessoal e familiar de mulheres com câncer de endométrio proficiente para o sistema MMR;
- Caracterizar casos de CE segundo sua classificação de risco para predisposição ao câncer, quanto suas características clínicas e histopatológicas;
- Analisar a presença de variantes germinativas na região codificadora e regulatórias de genes de predisposição a câncer em pacientes com CE proficientes para a atividade do sistema de reparo MMR;
- Caracterizar as variantes germinativas encontradas quanto à patogenicidade;
- Analisar presença de variantes somáticas em casos positivos para variantes germinativas patogênicas e variações em número de cópias.

MATERIAL e MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para aprovação do projeto inicial e recebeu o Parecer Consubstancial de aprovação sob o número 3.474.021 em 29 de Julho de 2019 (Anexo 9.1.1). Foi solicitado uma emenda ao projeto inicial incluindo análise de variantes somáticas, sendo que a mesma foi aprovada pelo parecer número 3.841.769 em 17 de Fevereiro de 2020 (Anexo 9.1.2).

3.2 Casuística

Em um projeto anterior do grupo, foi conduzido um estudo em amostras de pacientes não relacionadas que foram diagnosticadas com câncer de endométrio primário para determinação de deficiência ou proficiência para o sistema de reparo de malpareamento de DNA (MMR). Os tumores foram avaliados para expressão das proteínas MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2 por imunohistoquímica, e presença de instabilidade de microssatélite (MSI). Ao final do trabalho, dos 242 tumores analisados, 149 (61,6%) foram classificados como proficientes para o sistema de reparo de malpareamento de DNA, por conterem as quatro proteínas intactas e não apresentaram instabilidade de microssatélite (MSS) (ROSA; SANTIS; TEIXEIRA; MOLFETTA *et al.*, 2020).

A casuística desse projeto incluiu 100 pacientes que tiveram câncer de endométrio primário, que apresentaram o material tumoral avaliado como proficiente para o sistema MMR, com presença das quatro proteínas – MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2 - pela Imunohistoquímica, e avaliada como estável no teste de instabilidade de microssatélite – MSS. A primeira triagem das pacientes, excluiu 11 (11%) casos em que o óbito estava reportado pelo Sistema Operacional do Hospital das Clínicas. Houve tentativa de contato por telefone com 89 pacientes, desses: em 35 (39,3%) casos, não foi possível o contato; 12 (13,5%) pacientes foram contatadas, mas não tinham interesse em participar; e 42 (47,2%) pacientes demonstraram interesse em participar (Figura 5).

As pacientes que concordaram em participar foram chamadas ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para um encontro, no qual foi melhor explicado o objetivo do

projeto e qual seria a participação das mesmas no estudo. Todas as pacientes chamadas confirmaram seu interesse em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 8.1) e foi coletado o histórico pessoal e familiar de câncer.

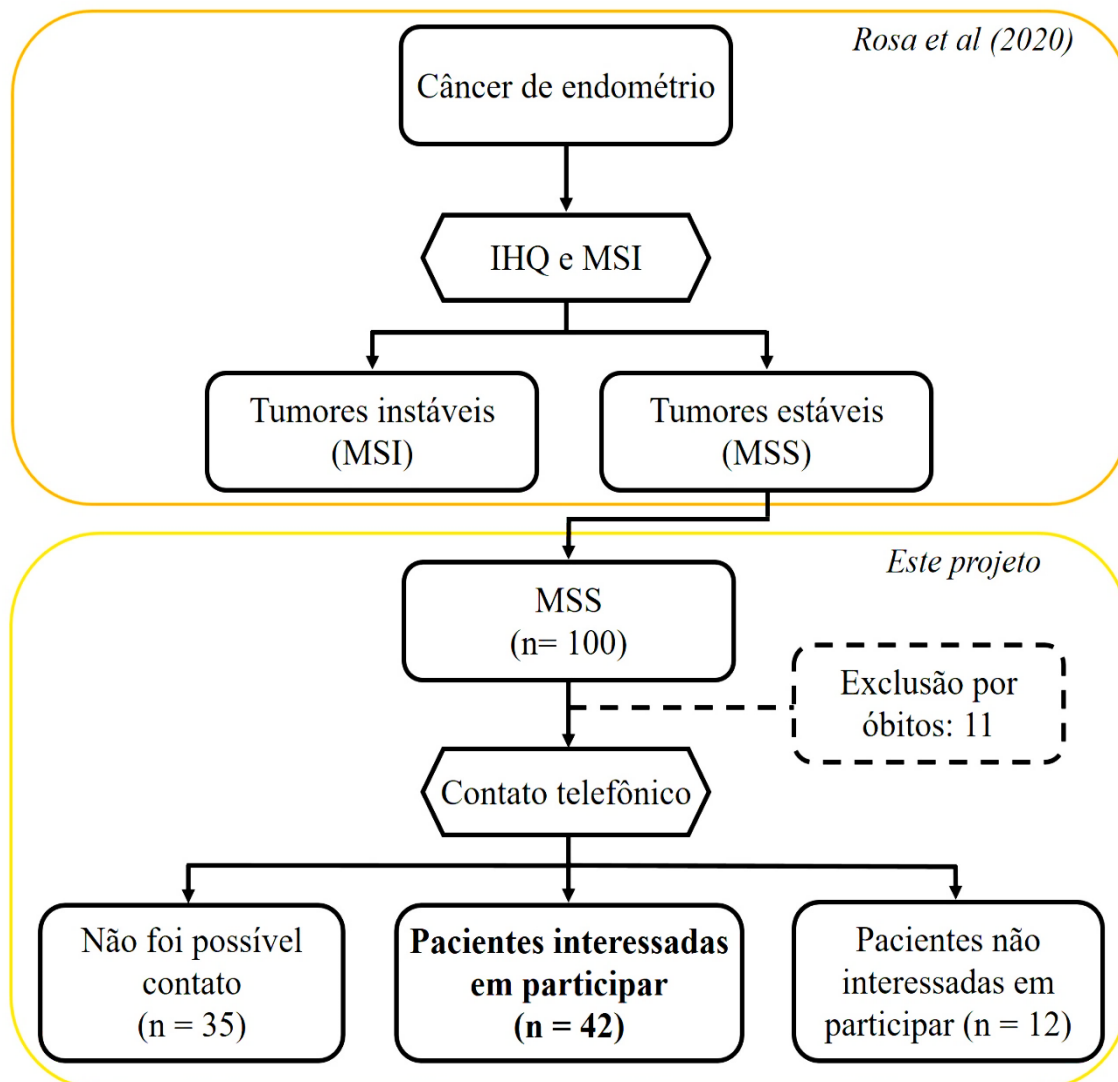


Figura 5. Fluxograma descritivo das convocações e formação da casuística. A determinação do *status* do tumor para sua proficiência ao sistema MMR foi realizado por ROSA *et al.* (2020), utilizando as técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e instabilidade de microssatélite (MSI). Foram selecionadas 100 pacientes com tumores proficientes para o sistema MMR (MSS), e após a exclusão dos casos de óbitos, as pacientes foram contatadas por telefone e convidadas a participar do projeto. Ao final, 42 pacientes concordaram em participar e formaram a casuística deste projeto.

3.3 Coleta de histórico familiar e pessoal

Foram coletados os históricos pessoal e familiar das 42 pacientes que concordaram em participar. O histórico familiar inclui avaliação de casos de câncer em

familiares de no mínimo três gerações, e o histórico pessoal avaliou idade atual e ao diagnóstico, ocorrência de câncer em outros órgãos e reincidência.

Foram avaliados usando critérios para predisposição ao câncer, adaptados da Sociedade de Oncologia Ginecológica (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS et al., 2007). As pacientes foram classificadas com base no histórico, como: alto risco, quando preencheu qualquer um dos critérios definidos; ou baixo risco, quando não preencheu nenhum dos critérios (Quadro 7). Das pacientes classificadas como de alto risco para predisposição ao câncer foi coletada uma amostra de sangue periférico para análise de variantes germinativas.

Quadro 7. Critérios de classificação de predisposição hereditária a câncer de endométrio. (adaptados da Sociedade de Oncologia Ginecológica) (LANCASTER; POWELL; KAUFF; CASS *et al.*, 2007).

1. Caso de câncer de endométrio (CE) antes dos 50 anos;
2. Caso de CE e qualquer outro tipo de câncer sincrônico ou metacrônico diagnosticado em qualquer idade;
3. Familiar com parentesco de primeiro grau com qualquer tipo de câncer diagnosticado abaixo dos 50 anos.
4. Caso de câncer de endométrio diagnosticado em qualquer idade, com dois ou mais familiares de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer em qualquer idade;
5. Familiar com parentesco de primeiro grau que preencha qualquer um dos critérios acima citados.

3.4 Análise germinativa

3.4.1 Extração de DNA genômico

DNA foi extraído a partir de sangue periférico utilizando o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo. Para extração, foram utilizados 200 µl de sangue total em um microtubo de 1,5 mL, incubado com 20 µl *QIAGEN Protease* e 200 µl *Buffer AL* a 56°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol absoluto (96-100%) e agitado por vórtex. O volume do microtubo foi transferido para o tubo *QIAamp Mini spin column* inserido em um tubo coletor (*collection tube*) e centrifugado a 6000 x g por 1 minuto. O tubo foi transferido para um tubo coletor

novo, então foi adicionado 500 µl de *Buffer AW1*, e levado novamente para centrifugação a 6000 x g por 1 minuto. Após transferir o tubo para um tubo coletor limpo, foi adicionado 500 µl de *Buffer AW2*, e centrifugado a velocidade máxima, descrita no protocolo como 20.000 x g, por 3 minutos. Após a última etapa de lavagem, o tubo foi transferido para um tubo coletor de 1,5 mL para eluição, utilizando 200 µl de *Buffer AE*. Após 1 minuto incubado em temperatura ambiente, foi centrifugado a 6000 x g por 1 minuto. Após a extração, o DNA eluído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Sciences) e, em seguida, armazenado a -20°C até o uso.

3.4.2 Desenho do painel de genes

Foi utilizado um painel de 40 genes para análise germinativa, selecionados por associação com síndromes de predisposição ao câncer ou associação de variantes germinativas em pacientes com câncer de endométrio (Quadro 8). O painel foi desenhado para as regiões codificadoras (éxons), cerca de 20 pares de bases (pb) dos sítios de *splicing*, e regiões 3' e 5' UTR (regiões não traduzidas, do inglês, *untranslated region*) completas de cada gene. O painel foi adquirido de forma customizada como painel para *SureSelect* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA).

Quadro 8. Descrição dos genes inclusos no desenho do painel.

<p>Síndrome de Lynch (SL) e genes da via <i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, MSH3, MLH3, PMS1</i></p> <p>Síndrome de Cowden (SC) <i>PTEN, SDHB, SDHC, SDHD, AKT1, PIK3CA, KLLN, SEC23B</i></p> <p>Polipose Associada à Atividade Revisora da Polimerase (PPAP) <i>POLD1, POLE</i></p> <p>Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) <i>STK11</i></p> <p>Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC) e genes da via <i>ATM, ATR, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, CHD1, CDK4, CDKN2A, NBN, RAD50, PALB2, RAD51C, RAD51D, FAN1, FANCC</i></p> <p>Síndrome de Li Fraumeni <i>TP53</i></p>
--

Genes relatados com variantes germinativas em câncer de endométrio

NTHL1 (SPURDLE; BOWMAN; SHAMSANI; KIRK, 2017)

APC (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN et al., 2016)

MUTYH (BARNETSON; DEVLIN; MILLER; FARRINGTON et al., 2007; WIN; REECE; DOWTY; BUCHANAN et al., 2016)

3.4.3 Preparo da biblioteca

O preparo da biblioteca foi realizado utilizando-se os reagentes e seguindo o protocolo do Kit *SureSelect QXT Target Enrichment* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) com uso de sondas desenhadas para a captura da região codificadora e regiões intrônicas que flanqueiam cada éxon dos 40 genes que compõem o painel. O protocolo foi iniciado utilizando as amostras de DNA diluídas a 100 ng/μl e, em seguida, diluído com água livre de nucleasse para 25 ng/μl. As concentrações foram mensuradas utilizando o *Qubit* (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific) e o kit *Qubit® dsDNA BR Assay da Invitrogen®* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho (*Working Solution*), usando 199 μl de *Qubit Buffer* e 1 μl de *Qubit Reagent* para cada amostra e mais dois controles. Para quantificação dos controles padrão disponibilizado no kit, 190 μl da solução de trabalho foi acrescentada a 10 μl dos padrões (*Standards*). Para quantificação das amostras, 198 μl da solução de trabalho foi acrescentada a 2 μl da amostra. Após um período de incubação de 2 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz, a quantificação foi realizada seguindo as etapas apresentadas no aparelho.

A primeira etapa da construção da biblioteca foi a fragmentação enzimática das amostras e marcação com adaptadores, que foi realizada adicionando 17 μl de *SureSelect QXT Buffer* e 2 μl de *SureSelect QXT Enzyme Mix* a 2 μl da amostra diluída. Os tubos foram vortexados por 20 segundos e colocados em termociclador a 45°C por 10 minutos, seguido de uma etapa 4°C por 1 minuto. Após o ciclo, foi acrescentado 32 μl *IX SureSelect QXT Stop Solution* e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto.

Em sequência no protocolo, foi realizada a purificação da biblioteca usando *AMPure XP beads* (*beads* em suspensão) e estante magnética, inicialmente as *beads* em suspensão foram lavadas duas vezes com etanol 70%, nas quais com a ajuda da estante magnética, as *beads* eram atraídas e o sobrenadante era descartado. Em sequência foi realizada a secagem das amostras a 37°C, por 3 minutos. Água livre de nucleasse foi utilizada para separar o material genético das *beads* e, após incubação de 2 minutos a

temperatura ambiente, os tubos foram novamente colocados na estante magnética, dessa vez com o sobrenadante (solução com a biblioteca ligada ao adaptador) sendo transferido para um tubo limpo e mantido no gelo, e as *beads* sendo descartadas.

A próxima etapa realizada foi amplificação da biblioteca, utilizando um pré-mix com volumes pré-estabelecidos pelo protocolo, contendo água livre de nucelase (25 µl), DMSO (2.5 µl), *Herculase II 5× Reaction Buffer* (10 µl), *SureSelect QXT Primer Mix* (1 µl), *100 mM dNTP Mix* (0.5 µl), *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (1 µl), para cada 10 µl da biblioteca purificada. O programa utilizado no termociclador para incubar as amostras foi composto de: 1 ciclo de 68°C por 2 minutos; 1 ciclo de 98°C por 2 minutos; 8 ciclos de 98°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos, e um ciclo final mantido a 4°C. Após a amplificação, foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando *beads* magnéticas, conforme descrito no parágrafo anterior.

Para análise da qualidade da fragmentação e amplificação foi utilizado o *Agilent Bioanalyzer 2100*, com o kit *DNA 1000 Assay* (Agilent Technologies), segundo o protocolo. As amostras também foram novamente quantificadas usando o *Qubit*. Nessa etapa foi possível avaliar a distribuição da fragmentação das amostras, com tamanho semelhante aos encontrados no protocolo disponibilizado pela Agilent Technologies, apresentado fragmentos entre 245 e 325 pb.

A partir dos resultados, pode-se ajustar a concentração de 500-750 ng de DNA em um volume máximo de 12 µl. A amostra foi então hibridizada à biblioteca de captura, adicionando 5 µl de *SureSelect QXT Fast Blocker Mix* e iniciando um programa no termociclador de 95°C por 5 minutos, 65°C por 5 minutos, quando, durante uma pausa do programa, foi adicionado 2 µl de 25% *RNase Block solution*, 2 µl de *Capture Libraries < 3 Mb*, 6 µl de *SureSelect Fast Hybridization Buffer*, e 3 µl de água livre de nuclease. Em seguida, o programa do termociclador foi continuado com 60 ciclos de 65°C por 1 minuto e 37°C por 3 segundos, finalizando mantendo as amostras em temperatura de 65°C até a próxima etapa.

Enquanto as amostras ficam em 65°C, foram preparadas *beads* magnéticas com estreptavidina, caso onde foi utilizado *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1* (Thermo Fisher Scientific) para recuperar o DNA. O preparo foi realizado com o uso de 50 µl da solução com as *beads*, lavadas, por pipetagem, por três vezes com 200 µl de *SureSelect Binding Buffer* e com descarte do sobrenadante realizado em estante magnética. Ao final da terceira lavagem, as *beads* foram ressuspensas em 200 µl de *SureSelect Binding Buffer*.

Com as *beads* preparadas, as amostras foram retiradas do termociclador e estabilizados a temperatura ambiente, e acrescentadas em seu volume total (aproximadamente 30 µl) aos 200 µl das *beads* em suspensão e mantidas em temperatura ambiente sob agitação de 1800rpm, por 30 minutos. Neste tempo, foi pré-aquecido o *Wash Buffer 2* até uma temperatura de 65°C. O sobrenadante foi descartado e as *beads* foram lavadas, por três vezes, com 200 uL do *Wash Buffer 2* e vortexadas por 5 minutos, posteriormente incubadas por 10 minutos à 65°C e o todo sobrenadante removido com o auxílio da estante magnética, por fim foi adicionado 23uL de água livre de nucleasse às amostras e mantidas em gelo.

Uma vez recuperado, a biblioteca foi amplificada utilizando uma combinação diferente de primers para cada amostra. A reação de PCR foi realizada em gelo, com a adição 25 uL do mix composto de água livre de nuclease (13,5ul), *Herculase II 5x Reaction Buffer* (10uL), 100nM *dNTP Mix* (0,5uL) e *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (1ul) em 23uL da suspensão das *beads* das amostras. Posteriormente adicionado o primer P7 e o P5, cada um apenas no tubo de reação. Após tudo homogeneizado, as amostras foram submetidas ao seguinte ciclo no termociclador: 1 ciclo de 98°C por 2 minutos, 14 ciclos de 98°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, um ciclo de 72°C por 5 minutos e as amostras foram mantidas a 4°C.

Após a amplificação, a biblioteca foi capturada usando o kit *AMPure XP beads*, inicialmente misturando 60uL do *AMPure XP beads* em cada 50uL do DNA amplificado e incubado por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com o auxílio da estante magnética. Seguido de uma dupla lavagem das *beads* com 200ul de etanol 70% e secagem das amostras à 37°C por três minutos. As *beads* foram ressuspensas adicionando 25ul de água livre de nucleasse, homogeneizando bem e coletando o sobrenadante para um novo tubo, com o auxílio da estante magnética.

As amostras foram analisadas quanto a quantidade e qualidade usando o *Agilent 2100 Bionalyzer* (Agilent) e *High Sensitivity DNA Assay* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), utilizando 1uL de cada amostra para análise dos fragmentos na faixa de 325 e 450bp. O pool das amostras foram constituídos de 10 nM de cada amostra e foi utilizado o tampão TE para completar o volume final de 20uL. O preparo das amostras pro sequenciamento foi realizado pela metodologia de amplificação de *cluster* usando o *Illumina Paired- End Cluster Generation Kit* (Illumina, Washington, EUA), para as

configuração adequadas, utilizando a plataforma *NextSeq 500/550 MidOutput* (Illumina, Washington, EUA) com reads de tamanho 2x100bp e o kit de 300 ciclos.

3.4.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) por NextSeq

O sequenciamento foi realizado pela plataforma *NextSeq 500/550* da Illumina, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.5 Análise dos dados do NGS

Os dados gerados pelo NGS foram convertidos em formato “.fastq” automaticamente pelo próprio sequenciador. A qualidade do sequenciamento foi avaliada utilizando as ferramentas FastQC e MultiQC. Para análise de cobertura média do sequenciamento foi avaliada para duas variáveis: por genes do painel e por paciente. Para obter o resultado foram utilizadas as ferramentas “coverage” da Bedtools e “DepthOfCoverage” da GATK. Os dados de cobertura foram plotados em um boxplot utilizando a ferramenta *ggplot2* (Apêndice 8.2.1).

As variantes de nucleotídeos únicos (SNP), e, pequenas inserções e deleções foram anotadas utilizando o software disponibilizado pela Agilent, chamado de *SureCall* (v. 4.2), que analisou os arquivos FASTQ de acordo com os parâmetros padrão, para análise de fragmentos pareados, a partir do painel de genes customizados. Dentro do software, as *reads* foram alinhadas com o genoma de referência GRCh37/hg19, em seguida, foram removidas as *reads* duplicadas, e as regiões de inserção e deleção (InDels) foram identificadas. Ao final, as variantes identificadas foram ordenadas pelo software e, a partir dele, foi gerado um arquivo do tipo VCF (formato de chamada de variantes, do inglês, *variant call format*), já anotado com dados de frequência da variante na população e efeito da variante, que foi convertido de um arquivo de texto separado por tabulação para um arquivo .xls, e analisado como uma tabela utilizando o programa Excel versão 2013 (Microsoft).

Na primeira triagem realizada nos arquivos VCFs, foram filtradas apenas as variantes com informação de frequência na população no arquivo gerado pelo *SureCall*, que apresentavam valores acima de 0,05 (5%). Em seguida, foram excluídas as variantes identificadas em regiões intrônicas ou de efeito sinônimo, com exceção das variantes com efeito em sítios de *splicing*. Em seguida, as variantes localizadas nas regiões 3’ e 5’ UTR e em regiões de *splicing*, foram avaliadas novamente, e selecionadas as em qual foi

predito efeito deletério na proteína. Possível efeito de splicing exônico foi avaliado pela ferramenta Human Splicing Finder 3.1 (DESMET; HAMROUN; LALANDE; COLLODBEROU *et al.*, 2009).

Ao final desse processo de triagem, do total de dados gerados, cerca de 85% das variantes identificadas foram filtradas. Os 15% restantes eram variantes exônicas ou com predição de efeito no *splicing*, com frequência menor que 0,05 ou não descrita, que causem alteração a nível de proteína e localizadas entre os genes de interesse do painel. Foi dado seguimento na análise desse segundo grupo de variantes.

Primeiro, foram anotadas as frequência das variantes em populações controles, e para isso foram utilizados os bancos de dados populacionais gnomAD, como dados de frequência mundial (inicialmente também foi utilizado os dados do banco de dados ExAC, porém durante o seguimento da análise, os dados de ExAC foram agregados ao gnomAD) (KARCZEWSKI; FRANCIOLI; TIAO; CUMMINGS *et al.*, 2020), e AbraOM, como fonte de dados de frequência em população brasileira (NASLAVSKY; YAMAMOTO; DE ALMEIDA; EZQUINA *et al.*, 2017). Variantes que previamente não possuíam anotação de frequência, e foram anotadas nessa etapa com frequência maior que 0,05 foram novamente filtradas.

Na próxima etapa da análise, as variantes foram anotadas manualmente utilizando dados disponíveis online. Para isso, foi realizado a procura dos dados através da descrição da variante disponível pela ferramenta Varsome (KOPANOS; TSIOLKAS; KOURIS; CHAPPLE *et al.*, 2019), e por busca direta nos bancos de dados NCBI Clinvar, NCBI dbSNP, e dados publicados em periódicos científicos, utilizando os sistemas de busca PubMed e Google Acadêmico. Pelo Varsome foram obtidas informações de: anotação da variante a nível de genoma, códon e proteína; resultados de preditores de patogenicidade; relatos na literatura; dados de associação clínica da variante; e visualização de outras variantes na região no genoma. Todas as informações obtidas no Varsome foram confirmadas nos referentes sítios dos bancos de dados públicos). A ferramenta Varsome também foi utilizada como metodologia de apoio para classificação das variantes.

Para levantar dados de preditores de patogenicidade, foram utilizadas ferramentas que agrupam resultados de diferentes preditores: REVEL e CADD. A ferramenta REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*), prediz patogenicidade de variantes *missense*, e agrupa dados de 13 preditores diferentes: MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP, e phastCons (IOANNIDIS; ROTHSTEIN; PEJAVER; MIDDHA *et al.*,

2016). Os *scores* dessa ferramenta variam entre 0 e 1, e as variantes com *scores* mais altos são preditas como provavelmente patogênicas ou patogênicas. Valores acima de 0,5 foram considerados como variantes patogênicas, de acordo com as recomendações dos desenvolvedores, que indicam que usando esse limite, a análise apresenta 59% de especificidade e 75% de sensibilidade. Os valores acima de 0,75 foram considerados mais específicos (96%). A análise utilizando essa ferramenta foi feita utilizando a *Variant Effect Predictor* (VEP) disponível na ferramenta Ensembl (MCLAREN; GIL; HUNT; RIAT *et al.*, 2016).

CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) realiza a predição de pequenas inserções e deleções, além das variantes *missense*. A ferramenta avalia dados de conservação da base (GERP, phastCons and phyloP); informações sobre regulação, como regiões de hipersensibilidade a DNase I; dados de transcrição, como distância entre limite de éxon e intron ou níveis de expressão em linhagens celulares; e scores de patogenicidade a nível de proteína (Grantham, SIFT e PolyPhen) (KIRCHER; WITTEN; JAIN; O'ROAK *et al.*, 2014; RENTZSCH; WITTEN; COOPER; SHENDURE *et al.*, 2019). O resultado de CADD é dado por um valor numérico que cresce de forma diretamente proporcional a predição de patogenicidade, portanto valores mais altos indicam variantes com maior potencial patogênico. Neste estudo foram consideradas como provavelmente patogênicas variantes com valor de PHRED-*score* acima de 20, e como patogênicas, variantes com PHRED acima de 30.

Para análise de deleções ou duplicação grandes, chamados de variações do número de cópias (CNV) foram utilizando a ferramenta *DepthOfCoverage* disponível pelo pacote GATK v. 3.7 (*Genome Analysis Toolkit*) (MCKENNA; HANNA; BANKS; SIVACHENKO *et al.*, 2010). De todos os arquivos gerados nessa análise, foi utilizado o arquivo “.sample_interval_summary” para método de análise relativa de cobertura por meio do software VisCap (PUGH; AMR; BOWSER; GOWRISANKAR *et al.*, 2016). O *output* da análise pelo VisCap indica as coordenadas genômicas das CNVs identificadas (posição inicial e final da duplicação ou deleção). As CNVs foram anotadas e analisadas quanto a sua localização (exônica ou intrônicas) dentro dos genes do painel, utilizando as coordenadas genômicas e a ferramenta Genome Browser (UCSC) (KENT; SUGNET; FUREY; ROSKIN *et al.*, 2002).

Para análise da frequência da CNV na população foram utilizados dois bancos de dados populacionais: gnomAD SVs v2.1, que apresenta dados de variantes estruturais (SV, do inglês, *structural variant*) em estudos genéticos de população e doença-

específicos (KARCZEWSKI; FRANCIOLI; TIAO; CUMMINGS *et al.*, 2020); e o Banco de Dados de Variantes Genômicas (DGV, do inglês, *Database of Genomic Variants*) (MACDONALD; ZIMAN; YUEN; FEUK *et al.*, 2014).

Os dados obtidos de cada variante foram anotadas no arquivo VCF e usados para a classificação das variantes. Os sítios utilizados para realizar as anotações estão descritos no Quadro 9.

Quadro 9. Nomes e links dos sítios com bancos de dados públicos que foram utilizados para anotação das variantes, e seu respectivo uso.

Nome	Link	Uso
Varsome	https://varsome.com/	Levantamento das informações gerais sobre a variante
Clinvar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	Banco de dados de variantes associada a condições clínicas
dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/	Banco de identificação de variantes conhecidas e descritas
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org/	Frequência de variantes em população controle
AbraOM	http://abraom.ib.usp.br/	Frequência de variantes em população brasileira controle
DGV	http://dgv.tcag.ca/	Frequência de CNVs em população controle
REVEL	https://sites.google.com/site/revelgenomics/	Preditor de patogenicidade
VEP	https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html	Ferramenta utilizada para fazer a análise pelo REVEL
CADD	https://cadd.gs.washington.edu/	Preditor de patogenicidade
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/	Banco de artigos da literatura
Google Acadêmico	https://scholar.google.com.br/	Banco de artigos da literatura
Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/	Visualização das regiões das variantes no genoma

3.4.6 Classificação das variantes

As variantes foram classificadas tendo como base as recomendações do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (ACMG, do inglês, *American College of Medical Genetics and Genomics*) nas categorias benignas, provavelmente benignas, variantes de significado incerto (VUS, do inglês, *variantes of uncertain significance*), provavelmente patogênicas e patogênicas (RICHARDS; AZIZ; BALE; BICK *et al.*, 2015). Os critérios ACMG consideram a raridade da variantes e populações controle, a identificação da variante em pacientes afetados pelo mesmo fenótipo, estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*, a presença de segregação da variante e do fenótipo na família, as predições de patogenicidade *in silico* e a compatibilidade do fenótipo do paciente com o gene em que foi identificado a variante (considerando relatos e publicações prévias). Os critérios são identificados como evidência de patogenicidade ou evidência de impacto benigno (Quadro 10). Ao realizar a classificação das variantes, foram consideradas atualizações aos critérios ACMG, disponíveis na literatura e em bancos de dados como ClinGen (REHM; BERG; BROOKS; BUSTAMANTE *et al.*, 2015).

Os critérios atendidos pela variante foram agrupados e utilizadas as regras para combinar critérios para classificar as variantes, também recomendadas pelo ACMG (Quadro 11). A ferramenta Varsome foi utilizada como suporte para realizar a combinação dos critérios atendidos pelas variantes. Os critérios já assinalados pela ferramenta foram considerados, porém confirmados de forma individual.

Quadro 10. Critérios do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (ACMG) utilizados para classificação das variantes germinativas.

Evidência muito forte de patogenicidade	
PVS1	Variante nula (<i>nonsense, frameshift</i> , ± 1 ou 2 bases do sítio de <i>splice</i> canônico, códon de iniciação, ou deleções) em um gene em que LOF é um mecanismo conhecido de doença
Evidência forte de patogenicidade	
PS1	Relatos de variantes patogênicas no mesmo aminoácido, independentemente da troca de nucleotídeos
PS2	Variante <i>de novo</i> (com confirmação de paternidade e maternidade) em um paciente com fenótico e sem histórico familiar
PS3	Ensaio funcionais bem estabelecidos, <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> , que indicam efeito deletério no gene ou na proteína
PS4	A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente maior ($OR > 5,0$) em comparação com a prevalência em populações controle
Evidência moderada de patogenicidade	
PM1	Variante localizada em uma região <i>hotspot</i> e/ou em domínios funcionais bem estabelecidos sem variantes benignas; variantes localizadas em domínios funcionais menos caracterizados porém com relator de variantes patogênicas em mais de um resíduo próximo
PM2	Variante ausentes nos bancos de dados de populações controle (ou com frequência extremamente baixa em casos de doenças recessivas)
PM3	Para doenças recessivas: variantes identificadas <i>in trans</i> com outra variante patogênica
PM4	Alterações no tamanho da proteína devido a inserções ou deleções <i>in frame</i> em regiões não repetidas, ou variantes que causem perda do códon de parada (<i>stop-loss</i>)
PM5	Variante nova do tipo <i>missense</i> em um aminoácido em que outra variante já foi encontrada e classificada como patogênica
PM6	Variante presumidamente <i>de novo</i> , porém sem confirmação de paternidade e maternidade
Evidência suporte de patogenicidade	
PP1	Co-segregação da doença em múltiplos familiares afetados, e variante encontrada em um gene que é conhecidamente causa da doença
PP2	Variante <i>missense</i> em um gene que tem uma baixa incidência de variantes <i>missense</i> benignas, e em que variantes desse tipo sejam conhecidos mecanismos da doença
PP3	Múltiplos preditores de patogenicidade <i>in silico</i> (conservação, evolução, impacto no splicing, funcionalidade do produto do gene) indicando um efeito deletério no gene ou na proteína
PP4	Fenótipo do paciente ou histórico familiar é altamente específico para uma doença com etiologia genética única

PP5	Relatos de fontes confiáveis que reportam a variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para ser realizada uma avaliação independente
Evidência autossuficiente de impacto benigno	
BA1	Frequência do alelo em população controle é maior que 0,05 (5%)
Evidência forte de impacto benigno	
BS1	Frequência do alelo da variante nas populações controle é maior que o <i>cut-off</i> de benignidade calculado pela estatística do gene (ex: Se um gene apresenta apenas variantes benignas em alelos com frequência acima de 0,005 na população, variantes com frequência acima de 0,005 são provavelmente benignas; <i>cut-off</i> = 0,005)
BS2	Variante observada em adultos sem o fenótipo (saldáveis) para doenças recessivas (homozigose), dominante (heterozigose) ou ligada ao X (hemizigose) com penetrância total esperada em idade precoce
BS3	Ensaio funcionais bem estabelecidos, <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> , que não indicam efeito deletério no gene ou na proteína
BS4	Falta de segregação da variante em membros da família com o mesmo fenótipo
Evidência suporte de impacto benigno	
BP1	Variante <i>missense</i> em um gene que é, primariamente, conhecido por causar doenças com variantes que resultem em proteína truncada
BP2	Variante observada <i>in trans</i> com uma variante patogênica em casos de doenças de caráter dominante; ou variante observada <i>in cis</i> com uma variante patogênica em doenças com qualquer padrão de herança
BP3	Deleções ou inserções <i>in frame</i> em regiões repetidas sem função conhecida
BP4	Múltiplos preditores de patogenicidade <i>in silico</i> (conservação, evolução, impacto no splicing, funcionalidade do produto do gene) indicando um efeito não deletério no gene ou na proteína
BP5	Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para a doença
BP6	Relatos de fontes confiáveis que reportam a variante como benigna, mas a evidência não está disponível para uma avaliação independente
BP7	Variante sinônima (silenciosa) para qual preditores de efeito no <i>splicing</i> não indicam impacto na leitura do gene, não indica criação de um sitio de <i>splice novo</i> E o nucleotídeo não é altamente conservado

Legenda: LOF, perda de função (do inglês, *loss-of-function*); OR, *odds-ratio*.

Quadro 11. Regras para combinar critérios para classificação de variantes.

Classificação	Crítérios
Patogênica	(i) 1 muito forte (PVS1) E (a) ≥ 1 forte (PS1-PS4) OU (b) ≥ 2 moderadas (PM1-PM6) OU (c) 1 moderada (PM1-PM6) E 1 suporte (PP1-PP5) OU (d) ≥ 2 suportes (PP1-PP5) (ii) ≥ 2 fortes (PS1-PS4) (iii) 1 forte (PS1-PS4) E (a) ≥ 3 moderadas (PM1-6) OU (b) 2 moderadas (PM1-PM6) E ≥ 2 suportes (PP1-PP5) OU (c) 1 moderadas (PM1- PM6) E ≥ 4 suportes (PP1-PP5)
Provavelmente patogênica	(i) 1 muito forte (PVS1) E 1 moderada (PM1-PM6) OU (ii) 1 forte (PS1-PS4) E 1-2 moderada (PM1-PM6) OU (iii) 1 forte (PS1-PS4) E ≥ 2 suportes (PP1-PP5) OU (iv) ≥ 3 moderadas (PM1-PM6) OU (v) 2 moderadas (PM1-PM6) OU E ≥ 2 suportes (PP1-PP5) OU (vi) 1 moderadas (PM1-PM6) OU E ≥ 4 suportes (PP1-PP5)
Provavelmente benigna	(i) 1 forte (BS1-BS4) E 1 suporte (BP1-BP7) OU (ii) ≥ 2 suportes (BP1-BP7)
Benigna	(i) 1 única (BA1) OU (ii) ≥ 2 fortes (BS1-BS4)
VUS	(i) Outros critérios que não sejam os acima descritos OU (ii) Quando a pontuação das características benignas e patogênicas são contraditórias

Legenda: VUS, variante de significado incerto.

3.4.7 Validação das variantes

3.4.7.1 Validações das variantes pontuais (Sequenciamento de Sanger)

Mutações pontuais identificadas no NGS e classificadas como Patogênicas ou Provavelmente Patogênicas foram validadas por sequenciamento Sanger, utilizando o sequenciador automático *Prism Genetic Analyzer ABI 3130 xL* (Applied Biosystem). As mesmas amostras de DNA foram utilizadas para realizar o NGS e o sequenciamento de Sanger. Foram desenhados e solicitados primers para a região de interesse (Quadro 12), e utilizando os mesmos, foi realizada amplificação com PCR convencional. Para PCR foi utilizado aproximadamente 300ng do DNA da paciente, e foi realizado o protocolo de 1,5

μl de cada primer a 10 nM, 0,75 μl de cloreto de magnésio a 50 mM, 2,5 μl de dNTPs a 2,0 nM, 2,5 μl do 10X PCR Buffer e 0,2 μl da *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Massachusetts, EUA) e água para o volume final de 25 μl. A amplificação foi realizada no termociclador da *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) com o programa: um ciclo de 94° por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, mais 30 segundos com a temperatura de *annealing* específica do primer, e 72°C por 30 segundos; por último, um ciclo de 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, foi realizado a conferência na amplificação em gel de agarose a 1,5%, e considerado como amplificação bem sucedida a presença de bandas no tamanho esperado para o fragmento gerado pelo primer.

Quadro 12. *Primer* específicos para as mutações utilizados para validação das variantes patogênicas identificadas no sequenciamento de nova geração.

Caso (variante)	Primer	Ta	Frag.
P03 (MLH3: c.3110delC)	Fw: CAGATTCTGCCACACAGGATAA Rv: TGTCCAGCATTCCCATCTTC	56°C	524 pb
P08 (MUTYH: c.1187G>A)	Fw: AGGGCAGTGGCATGAGTAAC Rv: GGGTCAAGGGGTTCAAATAG	56°C	296 pb
P11 (SEC23B: c.1648C>T)	Fw: ACAGAGTCAGCTCAGGCACA Rv: AGCGTGCAGCATAAGGTAGG	57°C	247 pb

Legenda: Ta, temperatura de *annealing*; Frag, fragmento gerado pela amplificação; Fw, primer *foward*; Rv, primer reverse.

Após a confirmação da amplificação no gel, foi realizada a PCR específica para o sequenciamento de Sanger, utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem, California, EUA). Como template para a reação foi utilizado 1 μl do material amplificado na PCR convencional por reação, e para cada paciente foram realizadas duas amplificações para sequenciamento, uma com o primer *foward*, e uma com o primer reverse (Quadro 12). O protocolo utilizado foi para um amplificação final de 10 μl: 2 μl de BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 2 μl BigDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer, 1 μl do primer *foward* ou reverse, e 4 μl de água. O programa no termociclador envolveu um ciclo de 95°C por 1 minuto, e 25 ciclos de 96°C/10 segundos, 50°C/5 segundos e 60°C/4 minutos. Após a reação no termociclador, a amostra foi armazenada em freezer a -20°C, protegido da luz (envolvido em papel alumínio), até as etapas de precipitação e sequenciamento.

Para a precipitação foi empregado um protocolo utilizando Etanol/EDTA/Acetato de sódio. As amostras da PCR anterior foram transferidas para uma placa apropriada para

sequenciamento, a cada amostra foi adicionado 1 µl de Acetato de Sódio 3M e 1,5 µl de EDTA a 125mM, e após homogeneização a 1400 rpm por 1 minuto, foi adicionado 30 µl de etanol 100% gelado. As reações foram homogeneizadas novamente e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 4°C sob spin se 1650g por 45 minutos, para descarte do sobrenadante foi invertida e centrifugada a 190g por 40 segundos. Após o descarte, foi adicionado 35 µl de etanol 70% gelado as amostras, e a placa foi centrifugada novamente, a 2500 rpm por 15 minutos. O processo de inversão para descarte do sobrenadante foi realizado novamente.

Como etapa final, a placa foi colocada em termociclador a 60°C por 10 minutos para secagem das amostras, em seguida resfriada a temperatura ambiente e mantida sob proteção da luz por 12 horas, para permitir que todo o álcool da reação evapore. Após esse período de incubação, no momento do sequenciamento, as amostras foram ressuspendidas em 10 µl de *Hi-Di™ Formamide* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A placa foi aquecida a 95°C por 5 minutos e colocada no gelo por 2 minutos, em seguida, foi colocada no aparelho para iniciar a corrida do sequenciamento.

Os dados gerados pelo sequenciador de Sanger são em formato ABI format chromatogram file (.ab1), e para a visualização do eletroferograma foi utilizado o software FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; Washington, EUA; <http://www.geospiza.com>). As três variantes patogênicas encontradas no NGS foram validadas (Figura 6).

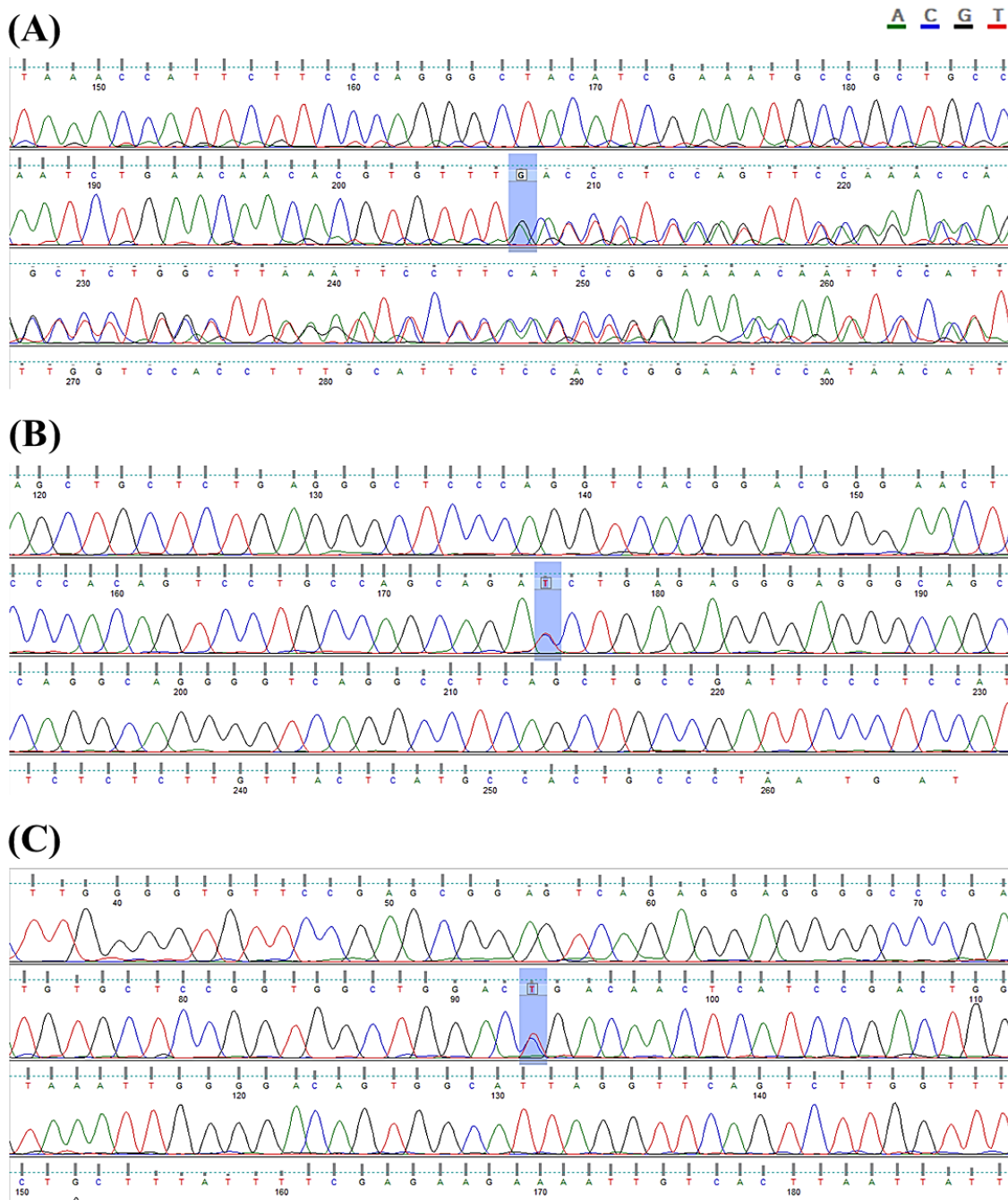


Figura 6. Eletroferograma da validação das variantes, os nucleotídeos afetados em cada caso estão destacados em azul. (A) MLH3: c.3110delC (chr14:g.75513249G>-), a variante é uma deleção de base única (G), que gera um frameshift na leitura do gene. Por ter sido encontrada em heterozigose, os picos do eletroferograma após a variante apresentam a leitura dos dois alelos (normal e mutado), causando dois picos em cada base a partir da deleção; (B) MUTYH: c.1187G>A (chr1:g.45797228C>T), a variante foi identificada em heterozigose, caracterizada pela troca de um C para um T, na imagem destacada com dois picos na mesma base, um pico azul e um pico vermelho; (C) SEC23B: c.1648C>T (chr20:18523799C>T), a variante também foi detectada em heterozigose, representado por dois picos, vermelho e azul, a troca de um citosina (C) para uma timina (T).

3.4.7.2 Validações das variações em número de cópias (MLPA)

As variações de número de cópias anotadas como exônica foram validadas por amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA, do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*). No NGS, foi identificada uma CNV nos éxons finais do gene *PTEN*, portanto, para sua validação foi utilizado as sondas *SALSA MLPA Probemix P225 PTEN* (MRC Holland, Amsterdã, Holanda), que contém sondas para todos os éxons do *PTEN*, sondas para genes que flanqueiam o mesmo no cromossomo, e duas sondas para o pseudogene *PTENP1*. O kit utilizado para a reação foi *SALSA MLPA EKI reagent kit FAM* (MRC Holland, Amsterdã, Holanda).

O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, recomenda-se o uso de 5 a 7 amostras controles (DNA que não tenham duplicações ou deleções no gene estudado) e uma amostra como controle negativo, para isso é feita a substituição da amostra de DNA por tampão TE 0,1 (10 mM Tris-HCl + 0,1 mM EDTA). Como amostras controle, foram selecionadas amostras que não apresentaram nenhuma CNV nos dados de NGS, e que apresentavam um resultado sem interferências e limpo. Para o protocolo, foi utilizado um programa de termociclador único, com incubações longas e pontos de parada para manuseio das amostras (Quadro 13).

Quadro 13. Programa do termociclador para a reação de MLPA.

Desnaturação do DNA		
1. 98°C	5 minutos	
2. 25°C	Pausa	
Reação de hibridização		
3. 95°C	1 minuto	
4. 60°C	16-20 horas	
Reação de ligação		
5. 54°C	Pausa	
6. 54°C	15 minutos	
7. 98°C	5 minutos	
8. 20°C	Pausa	
Reação de PCR		
9. 95°C	30 segundos	35 ciclos
60°C	30 segundos	
72°C	60 segundos	
10. 72°C	20 minutos	
11. 15°C	Pausa	

A reação começa com a desnaturação do DNA, onde foi utilizado entre 50 e 100ng em 5 µl de DNA para amostras teste e controles, e 5 µl TE para amostra controle negativa. Os tubos com DNA foram colocados no termociclador e foi iniciado as etapas 1 e 2 do programa. Após o resfriamento das amostras a 25°C, as amostras foram retiradas do termociclador e, para cada tudo, foi adicionado 1,5 µl de *MLPA Buffer*, 1,5 µl da sonda específica para *PTEN*. Os tubos foram recolocados no termociclador para as etapas 3 e 4.

Após a incubação de 16 a 20 horas, foi iniciada a etapa 5 do termociclador, mantendo as amostras a 54°C. Sem tirar os tubos do aparelho, foi adicionado 25 µl de água ultrapura, 3 µl de *ligase buffer A*, 3 µl de *ligase buffer B*, e 1 µl da *Ligase-65 enzyme*. Uma vez que o mix foi acrescentado a todos os tubos, inicia-se as etapas 6, 7 e 8, mantendo as amostras a 20°C no termociclador até a próxima etapa. Para a reação de PCR, foi pipetado um mix com 7,5 µl de água ultrapura, 2 µl de *SALSA PCR primer mix* e 0,5 µl da *SALSA polymerase*, por amostra. Antes da pipetagem do mix nos tubos, as amostras são retiradas do termociclador e mantidas em temperatura ambiente. Imediatamente após acrescentar o mix da PCR, os tubos foram colocados novamente no termociclador, e iniciou-se as etapas 9 a 11 do programa. Depois do final da reação, as amostras foram armazenadas, protegidas da luz, a 4°C até o dia seguinte, quando as amostras foram preparadas para a eletroforese capilar (sequenciador de Sanger, ABI 3130 xL, utilizado na metodologia 3.4.7.1).

Para a corrida de eletroforese, foi utilizado o primer dye FAM e capilares de 36,5 cm. Foi pipetado um mix com 1 µl da reação de PCR da etapa anterior, 0,2 µl do marcador *LIZ GS 500 size standard*, e 8,8 µl *Hi-Di™ Formamide*. A placa foi selada e aquecida a 86°C por 3 minutos e, em seguida, resfriada a 4°C por 2 minutos. A placa foi então colocada no equipamento para a leitura dos fragmentos.

Os dados gerados pelo sequenciador de Sanger nesta análise são em formato arquivo FSA (.fsa) e a análise foi realizada utilizando a ferramenta Coffalyser.Net, que é disponibilizada pela MCR Holland (Amsterdã, Holanda). A CNV identificada no gene *PTEN* foi validada, e a análise indicou duplicações nos éxons 6 a 9 do gene. O pseudogene não apresentou CNV, confirmando que a alteração está localizada no gene normal (Figura 7).

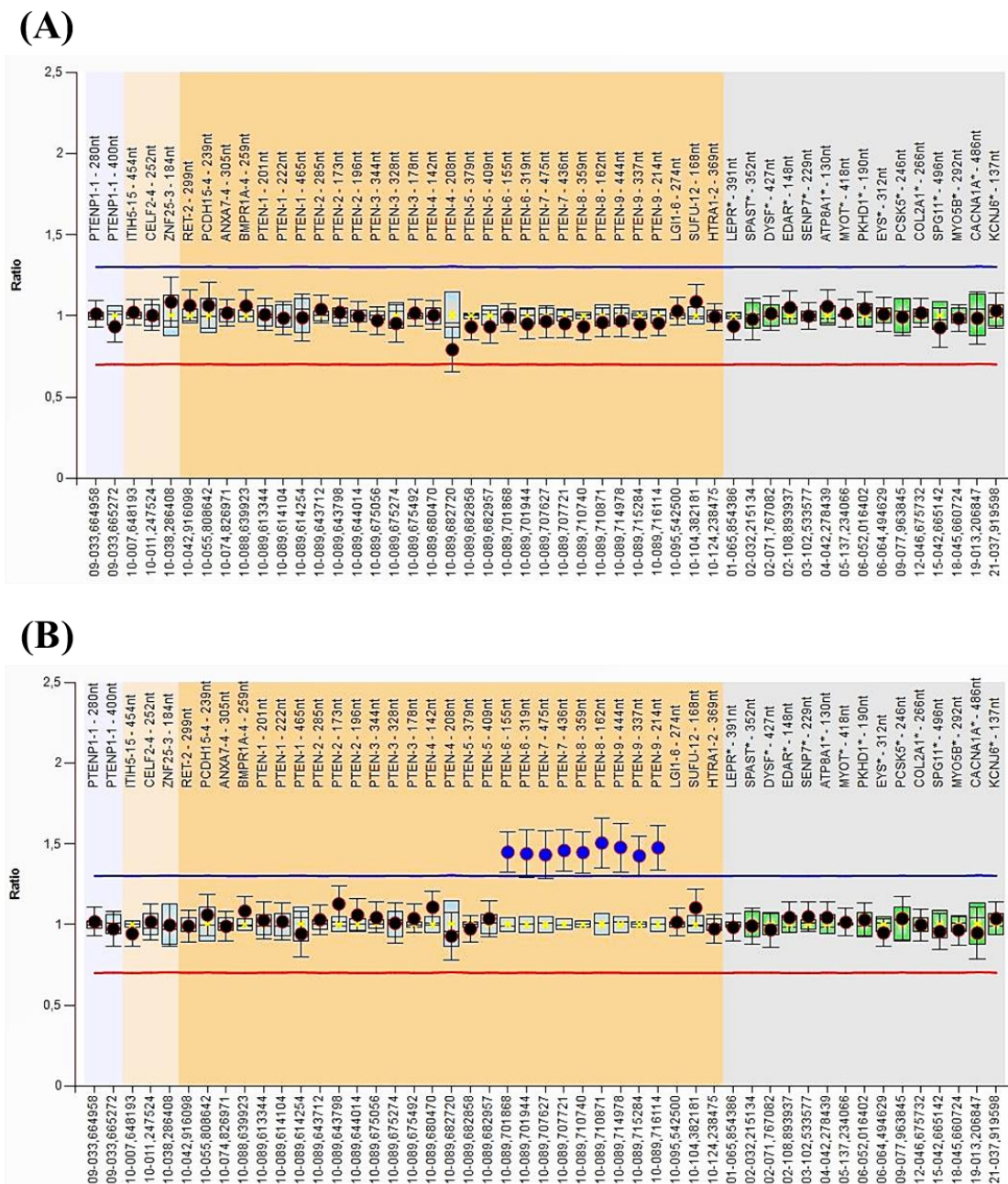


Figura 7. Resultado do MLPA após análise com Coffalyser.Net. (A) Resultado de uma das amostras controle, onde todas as sondas (pontos pretos) estão dentro do limite (linhas azul e vermelha) e no nível 1, que indica a presença de dois alelos para o gene; (B) Resultado da amostra da paciente (P05) em que foi observado a duplicação, no gráfico representada pelos pontos azuis, que indicam sondas que foram anotadas no nível 1,5, o que demonstra que 3 cópias das sondas foram identificadas, o que representa uma duplicação dos éxons 6 a 9 no gene *PTEN*, em heterozigose.

3.5 Análise somática

3.5.1 Extração de DNA tumoral

Para análise de variantes no material tumoral, foram selecionados os casos em que foi identificado na pesquisa de variantes germinativas que não esclareçam a determinação da etiologia dos tumores de endométrio: casos em que foram detectadas variantes patogênicas em heterozigose e casos com CNV. O material genético tumoral foi extraído de amostras fixadas em formalina e embebidos em blocos de parafina, armazenados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (SERPAT-HCRP-USP).

De cada bloco com tumor foram cortadas 4 lâminas de 10 µm e 1 lâmina de 4 µm, sendo essa corada com Hematoxilina-Eosina (H/E). A lâmina corada foi levada a patologistas do SERPAT, para que fosse delimitado a área com tumor, sendo que, as regiões utilizadas foram aquelas com mais de 70% de células neoplásicas. Das lâminas de 10 µm, com auxílio de lâminas cirúrgicas, foram raspadas as áreas demarcadas com tumor e as amostras de tecido foram depositadas em tubo para extração. Para a extração foi utilizado o kit *Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV* (Promega, Wisconsin, EUA) e o equipamento *Maxwell Rapid Sample Concentrator* (Promega).

Em cada tubo com material raspado das lâminas, foi acrescentado 180 µl do tampão de incubação e 20 µl da solução de Proteinase K (20mg/ml). Os tubos foram incubados em banho-maria a 70°C por 2 horas, em seguida, 400 µl do tampão de lise foi acrescentado aos tubos, e então foram agitados em *vortex*. O material de cada tubo foi transferido a um cartucho de extração de DNA, conforme fornecido pelo kit. O cartucho apresenta todos os componentes necessários para a extração pelo equipamento. A metodologia aplicada pelo kit usa *beads* magnéticas e tampões de lavagem, purificação e, para finalizar a extração, o tampão de eluição do DNA. O cartucho foi inserido no equipamento para realização da extração automatizada de DNA. Após esse processo, o material genético extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop (Thermo Fischer Scientific).

3.5.2 NGS do material tumoral

O preparo da biblioteca e sequenciamento foram realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), utilizando os kits *SureSelect XT Library Prep Kit* (Agilent, Califórnia, EUA) e *NextSeq 500/550 MidOutput* (Illumina,

Washington, EUA). O sequenciamento foi realizado para os mesmos 40 genes do sequenciamento germinativo. Os arquivos gerados pelo NGS foram enviados após o término do sequenciamento, através da plataforma *BaseSpace* da Illumina.

A análise bioinformática foi realizada para ambos arquivos da paciente: o arquivo .fastq gerado no sequenciamento do material germinativo, e o arquivo .fastq gerado do NGS com DNA tumoral. Foi utilizada essa metodologia, pois ao final do protocolo de análise seria necessário a comparação entre variantes germinativas e somáticas da mesma paciente, de forma a possibilitar a filtragem de variantes encontradas apenas no tumor, e não no tecido normal.

Um conjunto de comandos e ferramentas de computador (*pipeline*) desenvolvido para análise dados já era estabelecido pelo grupo de pesquisa (Quadro 14), e utiliza de softwares disponíveis de forma gratuita, e baseada nas recomendação do Broad Institute (Harvard), chamadas de *Best Practices Workflow* (DEPRISTO; BANKS; POPLIN; GARIMELLA et al., 2011).

Quadro 14. *Pipeline* para análise de dados germinativos e somáticos.

Etapa	Comando	
Análise de qualidade	FastQC	[1]
Trimagem dos dados brutos	Trimmomatic 0.36	[2]
Mapeamento contra genoma de referência (hg19)	Bowtie2	[3]
Alinhamento das <i>reads</i>	Bowtie2	[3]
Conversão de arquivo SAM para BAM	Samtools view	[4]
Ordenação (<i>sorting</i>) do arquivo BAM	Samtools sort	[4]
Indexação do arquivo BAM	Samtools index	[4]
Filtragem de reads por qualidade de mapeamento	Samtools view	[4]
Marcar <i>reads</i> duplicadas	Picard MarkDuplicates	[5]
Realinhar as reads em regiões de Indels	GATK RealignerTargetCreator GATK IndelRealigner	[6]
Recalibragem de bases	GATK BaseRecalibrator GATK PrintReads	[6]
Chamada de variantes germinativas	GATK HaplotypeCaller	[6]
Chamada de variantes somáticas	GATK Mutect2	[6]
Anotação de variantes somáticas	GATK Funcotator	[6]

Referências [1] (ANDREWS, 2010); [2] (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014); [3] (LANGMEAD; SALZBERG, 2012); [4] (LI; HANDSAKER; WYSOKER; FENNELL *et al.*, 2009); [5] (**Picard Toolkit**, 2019); [6] (MCKENNA; HANNA; BANKS; SIVACHENKO *et al.*, 2010).

3.5.3 Análise de dados do sequenciamento do tumor

A análise de cobertura média do sequenciamento foi avaliada por genes do painel ou por paciente. Foram utilizadas as ferramentas “coverage” da Bedtools e “DepthOfCoverage” da GATK. Os dados de cobertura foram plotados em um boxplot utilizando a ferramenta *ggplot2* (Apêndice 8.2.2).

Para análise de variantes de nucleotídeos únicos, os dados foram exportados em arquivo VCF e analisados como tabela em Excel (Microsoft). Foram avaliadas variantes somáticas nos mesmos genes identificados na linhagem germinativa. As variantes foram filtradas pela frequência no tumor, onde foram mantidas variantes com frequência menor ou igual a 0,05. Foi verificado se as variantes anotadas estavam descritas nos bancos de dados Cosmic (cancer.sanger.ac.uk) (TATE; BAMFORD; JUBB; SONDKA *et al.*, 2019), International Cancer Genome Consortium (ICGC; dcc.icgc.org) (ICGC/TCGA, 2020) e OncoKB (oncokb.org) (CHAKRAVARTY; GAO; PHILLIPS; KUNDRÁ *et al.*, 2017), e anotado relatos das variantes na literatura. As variantes em número de cópias foram avaliadas por uma *pipeline* de análise de número de cópias alelo-específico, utilizando a ferramenta FACETS (SHEN; SESHAN, 2016). A classificação das variantes usou os mesmo critérios da ACMG.

Tumores que apresentarem variantes Patogênica ou Provavelmente Patogênica em concordância com a análise germinativa, foram consideradas como de etiologia possivelmente hereditária. Enquanto tumores que não apresentarem variantes informativas (Patogênica ou Provavelmente Patogênica) que resultariam na perda do alelo normal no tumor, e, portanto, perda de heterozigose, foram considerados como causa hereditária não elucidada.

3.6 Análise estatística

Os dados foram tabulados em uma planilha em Excel versão 2013 (Microsoft). As características clinicopatológicas das pacientes foram comparadas em três estratificações: entre mulheres diagnosticadas antes ou após os 50 anos; mulheres classificadas como de baixo ou alto risco para predisposição a câncer de endométrio; e entre pacientes que apresentaram ou não variantes germinativas.

Para isso, aplicou-se teste de Fisher 2x2, e quando necessário, 2xj (quando mais de uma categoria foi testada, sendo j o número de categorias daquela característica). Os valores de p foram comparados significativos quando $p < 0,05$. Além disso, para

características com mais de uma categoria, foram realizados testes par-a-par tanto para identificar mais precisamente as associações, quanto para apontar a direção da mesma, ao vincularmos o valor do teste com o valor de *Odds Ratio*. Novamente, foram realizados para as duas estratificações (por idade e por risco para a predisposição ao câncer de endométrio).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características clinicopatológicas da casuística

No total, 42 pacientes concordaram em participar desta pesquisa (Tabela 1). A idade média das pacientes foi de 58,2 anos com desvio padrão de 11,5 anos e mediana de 57 anos, sendo que apenas seis pacientes tiveram o câncer antes dos 50 anos. A idade média variou de 55 anos, para mulheres de alto risco para predisposição ao CE, a 62 anos, para mulheres de baixo risco. Pacientes sem histórico de câncer apresentaram uma média de idade 7 anos maior que a do grupo anterior, sendo que a diferença estatística entre os grupos foi de $p = 0,0572$.

Quanto à histologia do tumor, a maioria (39/42; 92,8%) era do tipo endometrióide, um tumor foi classificado como carcinoma seroso papilífero, e dois casos foram diagnosticados com tumores mistos: um tumor endometrióide, com diferenciação escamosa, anotado no laudo como adenoescamoso de alto grau; e outro, um adenocarcinoma seroso papilífero pouco diferenciado que apresentava infiltração de diferenciação neuroendócrina.

A maior parte dos tumores foram diagnosticados em baixo grau, sendo 33 detectados em grau I e 5, em grau II, representando 76,2% e 11,9% dos casos, respectivamente. Três tumores foram diagnosticados em grau III (9,5%) e apenas um caso foi diagnosticado em grau IV (2,4%), com metástase em ovário. Os tumores de grau I foram classificados com estadiamento IA em 22/32 casos (68,75%) e como IB nos outros 10 casos (31,25%), enquanto os tumores de grau III se dividiram em tumores de estadiamento IIIA (75%) e IIIC1 (25%). Os tumores de grau II e IV foram todos diagnosticados como de estadiamento II e IVB, respectivamente.

Para 41/42 casos, o laudo indicou a presença de invasão do miométrio, sendo que 8/41 (19,5%) dos tumores foram relatados como limitados ao endométrio, ou seja, sem invasão ao tecido adjacente. 20/41 (48,8%) casos invadiram menos da metade do miométrio, sendo que 7 (17,1%) foram relatados como invasão superficial. A invasão de mais da metade do miométrio foi reportado em 13/41 casos (31,7%).

Quanto aos graus estruturais, o mais comum foi a combinação de grau arquitetural I e nuclear II (30,9%), seguido de grau arquitetural II e nuclear II (21,4%) e I/I (16,7), sendo que as outras combinações foram encontradas em menos de 10% da casuística. Dados de infiltrações angiolinfáticas, perineural, vascular e endocervical foram relatados em 35, 22, 23 e 40 dos 42 casos, respectivamente. Os demais foram considerados pelos

dados como não informados. No caso de invasão angiolinfática, 30/35 foram relatados como ausentes (85,7%) e como presente em 5/35 (14,3%). Todos os laudos com informação de invasão perineural declaram como presente (100%). A invasão vascular estava presente na maioria dos casos declarados (91,3%), estando ausente em apenas dois casos (8,7%). O mesmo foi identificado para invasão endocervical, que estava presente em 33/40 casos (82,5%), e ausente em 7/40 casos (17,5%).

As pacientes cuja história pessoal ou familiar de câncer atenderam aos critérios definidos na metodologia foram classificadas como de alto risco, enquanto as pacientes que não atenderem a nenhum dos critérios estabelecidos, foram classificadas como de baixo risco. Todas as características mais raras, diagnóstico antes dos 50 anos, histologia serosa e mista e grau de estadiamento avançado (III e IV), foram encontradas apenas em pacientes de alto risco.

Tabela 1. Características clinicopatológicas das 42 pacientes da casuística (total), e dos subgrupos de pacientes de alto e baixo risco para predisposição a câncer de endométrio.

Característica	Total		Alto risco		Baixo risco	
	N	%	N	%	N	%
Idade ao diagnóstico	42	100	26	100	16	100
Média (Desvio padrão)	58,2 (11,5)		55,5 (12,3)		62,7 (8,9)	
Mediana (Mínimo – máximo)	57 (33 – 91)		57 (33-91)		63 (51-86)	
< 50 anos	6	14,4	6	23,1	0	0
50 – 59 anos	18	42,8	12	46,1	6	37,5
> 60 anos	18	42,8	8	30,8	10	62,5
Histologia	42	100	26	100	16	100
Endometrióide	39	92,8	23	88,5	16	100
Seroso papilífero	1	2,4	1	3,8	0	0
Misto	2	4,8	2	7,7	0	0
Grau FIGO	42	100	26	100	16	100
I	32	76,2	19	73,1	13	81,2
II	5	11,9	2	7,7	3	18,8
III	4	9,5	4	15,4	0	0
IV	1	2,4	1	3,8	0	0
Invasão do miométrio	41	100	25	100	16	100
Limitado ao endométrio	8	17,1	6	24,0	2	12,5
Menos de 50% do miométrio	20	48,8	11	44,0	8	50,0
Mais de 50% do miométrio	13	31,7	8	32,0	6	37,5

Invasão angiolinfática	35	100	22	100	13	100
Presente	30	85,7	19	86,4	2	15,4
Ausente	5	14,3	3	13,6	11	84,6
Invasão perineural	22	100	14	100	8	100
Presente	0	0	0	0	0	0
Ausente	22	100	14	100	8	100
Invasão vascular	23	100	17	100	6	100
Presente	21	91,3	2	11,8	0	0
Ausente	2	8,7	15	88,2	6	100
Invasão endocervical	40	100	25	100	15	100
Presente	33	82,5	5	20,0	2	13,3
Ausente	7	17,5	20	80,0	13	86,7

4.2 Histórico pessoal e familiar de câncer

Dos 42 históricos coletados, 26 casos (61,9%) (identificadas como P01 até P26) apresentavam histórico de câncer que atendia a pelo menos um dos cinco critérios clínicos proposto na metodologia e foram classificadas como de alto risco (Quadro 15), enquanto 16 mulheres (38,1%) não atenderam a nenhum dos critérios clínicos.

As pacientes foram classificadas como tendo apenas histórico pessoal do câncer (n = 2; 7,7%), apenas histórico familiar de câncer (n = 17; 65,4%) ou ambos (n = 7; 26,9%). Sendo que 6/26 pacientes atenderam ao critério 1; 4/26 atenderam ao critério 2; 5/26 foram assinaladas ao critério 3; 21/26 pacientes atenderam ao critério 4; e 6/26 preencheram o critério 5. Os casos P02, P04, P21 e P26 apresentaram histórico de um segundo câncer, além do câncer de endométrio, acometido de forma metacrônica por tumores de tireoide, intestino e mama. A paciente 05 foi diagnosticada com tumor de endométrio de grau IV, com metástase em ovário.

A maioria dos casos (21/26; 80,8%) preencheu o critério de dois ou mais familiares de primeiro e segundo grau com histórico de câncer (critério 4). Foram relatados 19 tipos de cânceres conhecidos entre 78 familiares de todo o estudo. Em alguns casos não foi possível definir o local de origem exata, pois as pacientes não sabiam declarar o diagnóstico preciso; nesses casos, foi mantido a descrição da paciente, como câncer de “intestino” e “cabeça”. Em um caso, a paciente relatou que um familiar teve câncer de origem desconhecida, e este foi desconsiderado dos resultados.

Quadro 15. Características histopatológicas, clínicas e critérios atendidos pelas 26 pacientes incluídas na análise de variantes germinativas. Caixas destacadas em cinza indicam critérios atendidos, e para o critério (2), está descrito o qual foi o segundo câncer e a idade em que a paciente foi diagnosticada.

Identificação da paciente	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Histologia	E	E	E	E	E	M	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S	E	E	E	E	E	E	E	E	M	
Grau FIGO	I	I	I	I	IV	III	II	I	III	I	I	I	I	III	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	
Idade ao diagnóstico	39	59	57	43	33	59	91	34	61	51	56	56	52	64	57	60	60	54	56	45	59	37	66	64	71	58	
(1) CE antes dos 50 anos																											
(2) CE e qualquer outro em qualquer idade (<i>câncer, idade</i>)		Tireoide, 55		Intestino, 45																	Tireoide, 60						Mama, 48
(3) Familiar de primeiro grau com câncer antes dos 50 anos																											
(4) Dois ou mais familiares de primeiro ou segundo grau com câncer em qualquer idade																											
(5) Familiar de primeiro grau que preencha qualquer um dos critérios																											

Legenda: Histologia – E, endometrióide; M, misto; S, seroso; CE, câncer de endométrio

Os cânceres de mama, intestino, próstata, pescoço, pulmão, leucemia e tumores de cabeça/cérebro foram os mais prevalentes em familiares de primeiro e segundo grau (Figura 8). Foram relatados quatro casos (5,1%) de câncer de endométrio em familiares. Dois CE foram relatados no caso P07, em uma tia materna que teve o câncer aos 87 anos, e na filha desta tia (prima da paciente do estudo), que teve CE aos 30 anos. Os outros dois casos foram relatados no histórico da P02, em duas sobrinhas, que tiveram câncer de endométrio após os 50 anos.

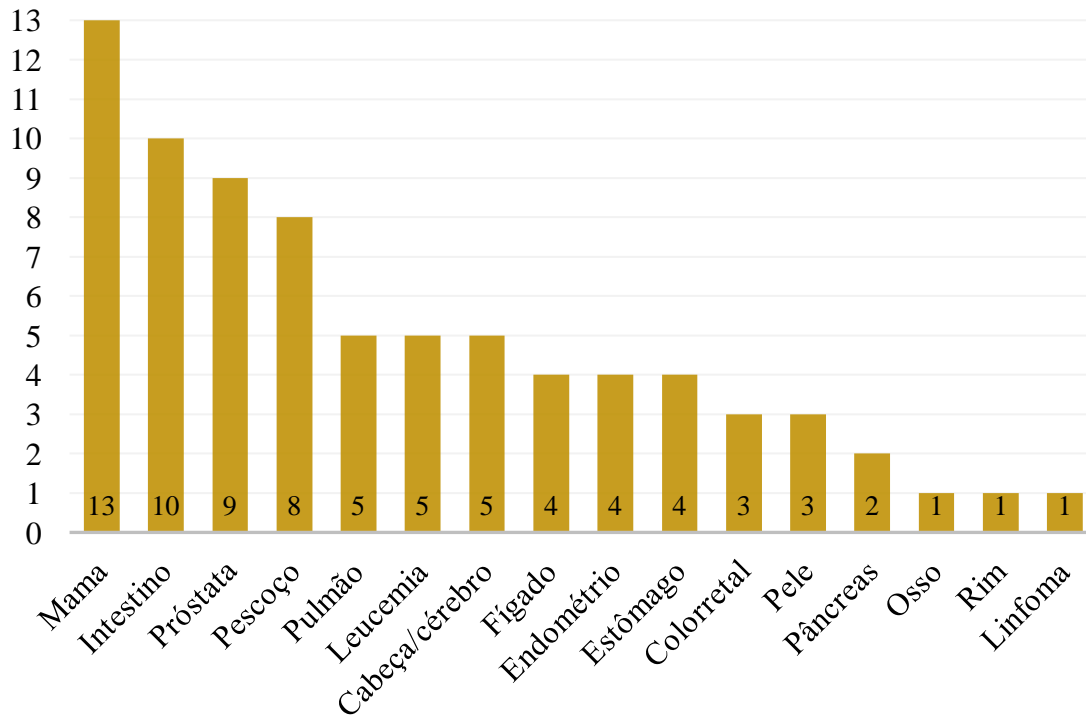


Figura 8. Gráfico demonstrativo da frequência dos cânceres relatados pelas pacientes no histórico familiar. O câncer com maior incidência foi o de mama, seguido por intestino, próstata e pescoço. Para alguns tumores não foi possível elucidar origem específica, como por exemplo tumores de “intestino” e “cabeça”, pois as pacientes não tinham o diagnóstico exato e os familiares em questão não foram tratados pelo Hospital das Clínicas.

Casos de câncer em familiares de primeiro grau foram relatados em 5/26 pacientes (19,2%). A paciente P06 relatou uma irmã com câncer colorretal aos 45 anos; as pacientes P14, P16 e P26 tiveram uma irmã com câncer de mama em idades de 45, 45 e 49 anos, respectivamente e, a paciente P25 relatou que a filha teve câncer de mama aos 37 anos.

A paciente P26 foi acometida por um câncer de mama esquerda de estadiamento clínico (EC) IIA, com marcação positiva para os receptores hormonais, aos 48 anos, cerca de 10 anos antes do câncer de endométrio (diagnosticados aos 58 anos). Para o tratamento deste primeiro tumor, além de quimioterapia, radioterapia e cirurgia ressectiva, foi

prescrito a terapia com tamoxifeno (TMX), que é conhecidamente um fator de risco para desenvolver câncer de endométrio. No histórico familiar, a paciente também relatou outro caso de câncer de mama na família, em um irmã que teve a neoplasia aos 49 anos; um caso de câncer de pâncreas em outra irmã aos 54 anos; dois casos de câncer de intestino foram relatados em tios maternos, no entanto, a paciente não soube especificar a idade. O histórico dessa paciente atende a dois critérios clínicos para HBOC: diagnóstico abaixo de 50 com um familiar de grau próximo com câncer de mama aos 50 anos; e histórico pessoal de câncer de pâncreas com qualquer idade, com dois ou mais familiares de grau próximo com câncer de mama ou ovário.

4.3 Análise de variantes germinativas

O sequenciamento teve uma cobertura média de 300 reads por base (Apêndice 8.2.1), com mais de 99% das amostras sequenciadas com mais de 100 reads, e 100% foram lidas no mínimo 60 vezes. Ao final da análise, dezoito variantes pontuais, encontradas em dez genes, foram consideradas como possíveis causas para predisposição ao câncer (Quadro 16). Foram identificadas variantes em 12/26 pacientes (46,1%), enquanto o restante dos casos não apresentou nenhuma variante não-sinônima classificada como VUS, provavelmente patogênica ou patogênica.

Quinze variantes foram classificadas como VUS pelos critérios ACMG, uma delas uma duplicação dos éxons 6 a 9 do *PTEN*; três foram classificadas como patogênicas, ocorridas nos genes *MLH3*, *MUTYH* e *SEC23B*. A incidência de variantes foi maior entre os genes *APC*, *MUTYH* e *SEC23B*, que tiveram a maior frequência entre as pacientes (n = 3), e os genes *ATM* e *BRCA2* (n = 2). O restante dos genes foi identificado apenas uma vez entre os pacientes.

Em quatro casos estudados (P08, P11, P12 e P15) mais de uma variante foi identificada na mesma paciente: no caso da paciente P08 foram detectadas três variantes, uma patogênica no gene *MUTYH* e duas VUS nos genes *ATM* e *BRIP1*; a paciente P11 também apresentou uma variante patogênica, no gene *SEC23B*, e uma VUS no gene *ATM*; a paciente P12 apresentou duas variantes de significado incerto, uma no gene *APC*, e uma com provável efeito no splicing, localizada no gene *PMS2*. A última paciente com mais de uma variante foi a P15, em que foram detectadas três VUS nos genes *APC*, *BRCA2* e *CHEK2*.

Resultados

Quadro 16. Descrição das variantes pontuais encontrada e classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS.

ID	Gene	Transcrito	Nucleotídeo	Aminoácido	Efeito	Classificação ACMG	Crítérios ACMG	REVEL	CADD	gnomAD AbraOM	dbSNP
P03	<i>MLH3</i>	NM_001040108	c.3110delC	p.S1037*	Frameshift	Patogênica	PVS1, PM2, PP3	N/A	N/A	Ausente Ausente	Não relatado
P04	<i>APC</i>	NM_000038	c.7228G>A	p.A2410T	Missense	VUS	PM2, BP4	0,204	6,589	Ausente Ausente	rs902036382
P05	<i>PTEN</i>	NM_000314	ex.6_9dup	-	Exon duplication	VUS	PM2	N/A	N/A	Ausente ¹ N/A	Não relatado
P07	<i>MUTYH</i>	NM_001128425	c.1070A>G	p.N357S	Missense	VUS	PM1, PM2, PP2	0,088	23,3	0,00000804 Ausente	rs754178539
P08	<i>ATM</i>	NM_000051	c.2254C>G	p.L752V	Missense	VUS	PM2, PP3	0,398	22,5	Ausente Ausente	rs756522395
	<i>BRIP1</i>	NM_032043	c.3651G>T	p.W1217C	Missense	VUS	PM2, BP4	N/A	13,74	0,00000797 0,003284	rs542698396
	<i>MUTYH</i>	NM_001128425	c.1187G>A	p.G396D	Missense	Patogênica	PS3, PM1, PM5, PP2-5	0,954	32	0,00303 0,007389	rs36053993
P09	<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.2576T>C	p.V859A	Missense	VUS	PM2, BP4	0,141	7,062	Ausente Ausente	rs1566226964
P11	<i>ATM</i>	NM_000051	c.1966A>G	p.T656A	Missense	VUS	PM2	0,193	22,2	Ausente Ausente	rs1064793032
	<i>SEC23B</i>	NM_032986	c.1648C>T	p.R550*	Stopgain	Patogênica	PVS1, PM2, PP3, PP5	N/A	47	0,0000557 Ausente	rs199939108
P12	<i>APC</i>	NM_000038	c.8524T>G	p.S2842A	Missense	VUS	PM2, PP3	0,394	26,5	0,0000119 Ausente	rs587780610

Resultados

	<i>PMS2</i>	NM_000535	c.2445G>A	p.S815=	Splicing Effect	VUS	PVS1 ² , PM2, BP4	N/A	9,794	0,000113 Ausente	rs753199796
	<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.5191C>T	p.H1731Y	Missense	VUS	PM2, BP4	0,113	1,704	0,0000082 Ausente	rs80358745
P15	<i>CHEK2</i>	NM_001005735	c.1654C>T	p.P552S	Missense	VUS	PM2, PP2, BP4	0,091	0,822	0,0000813 Ausente	rs587780179
	<i>APC</i>	NM_000038	c.2786A>G	p.H929R	Missense	VUS	PM2, PP3	0,345	15,6	Ausente Ausente	rs730881242
P22	<i>SEC23B</i>	NM_032986	c.1073G>C	p.G358A	Missense	VUS	PM2, PP3, BP1	0,899	28,3	0,00000398 Ausente	rs779578318
P25	<i>MUTYH</i>	NM_001128425	c.667A>G	p.I223V	Missense	VUS	PM2, PP2, PP3	0,609	22,6	0,000219 Ausente	rs200872702
P26	<i>SEC23B</i>	NM_032986	c.2101C>T	p.R701C	Missense	VUS	PM2, PP3, PP5, BP1	0,931	31	0,0000477 Ausente	rs201270568

Legenda: VUS, variante de significado incerto; N/A, não aplicável ou não disponível;

¹ Para CNV, foi utilizado apenas o banco de dados gnomAD SV;

² Critério atendido com força moderada, o que mantém a variante como VUS.

As três pacientes que apresentaram variantes patogênicas relaram histórico de câncer na família (Figura 7). A paciente P03 teve CE aos 57 anos e relatou um extenso histórico familiar de câncer pelo lado materno (n = 5) e paterno (n = 5), com casos de câncer de intestino, pâncreas, pulmão, fígado, pele e leucemia. A paciente P08 apresentou critérios de risco pessoal, pois teve o câncer de endométrio em idade precoce, assim como três casos de câncer de mama na família, todos em idade menor que 50 anos. O terceiro caso de variante patogênica foi identificada na paciente P11 também apresenta casos de câncer na família, porém todos em idade acima de 50 anos. Os tumores relatados são de mama, intestino, estômago e próstata.

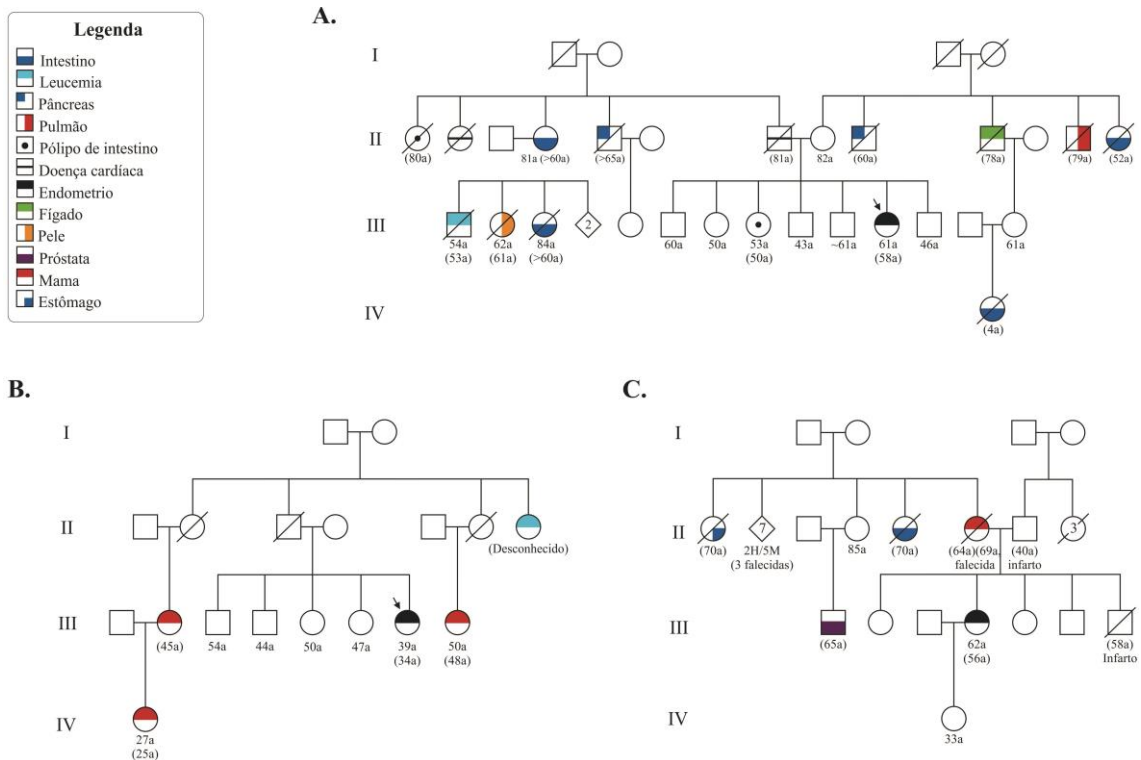


Figura 9. Heredogramas destacando a história familiar de câncer de pacientes que apresentam variantes patogênicas da linha germinativa. A paciente índice está destacada com uma seta. Foram registrados o tipo de câncer, a idade na entrevista e a idade ao diagnóstico. (A) Heredograma da paciente P03, caso em que foi identificada uma variante patogênica em *MLH3*. A paciente relatou uma extensa história familiar de câncer tanto na linhagem materna quanto na paterna. (B) Linhagem familiar da paciente P08, que apresentava história pessoal e familiar de câncer. Os casos de câncer ocorreram apenas na linhagem paterna, e todos os casos de câncer de mama relatados foram diagnosticados antes dos 50 anos. A paciente não relatou a idade no momento do diagnóstico da tia com leucemia devido à perda de contato. (C) Heredograma que representa o histórico de câncer da paciente P11. Os antecedentes de câncer eram exclusivos da linhagem materna, e todos foram diagnosticados após os 50 anos de idade.

A variante S1037*, no gene *MLH3* no caso P03 não possui relatos na literatura. A análise da variante previu possível patogenicidade pelos critérios PVS1, PM2 e PP3, por ser uma variante com efeito de perda da proteína, por não ter sido identificada em banco de dados populacionais (GnomAD e ABraOM), e pelo veredito de variante patogênica e deletéria por predições in silico (MutationTaster e PROVEAN), respectivamente.

A duplicação de éxons no gene *PTEN*, identificada na paciente P05, também não foi relatada na literatura. O caso apresentou na análise de dados de NGS, uma duplicação de éxons no gene *PTEN*, que se mostrou verdadeira após a confirmação pela técnica de MLPA. A duplicação se estende pelos éxons 6 a 9 do gene, sendo esses os últimos éxons do *PTEN* (Figura 6). A variante foi classificada como VUS por falta de informações, sendo assinalado apenas o critério PM2. A paciente tem histórico de câncer de endométrio em idade precoce, aos 33 anos, e como histórico familiar, apenas uma tia materna que teve câncer de mama aos 60 anos. Ao início do diagnóstico, houve suspeita de um caso de câncer de endométrio e ovário sincrônico, porém após análises patológicas, ficou determinado que a paciente apresentava CE com metástase em ovário.

A variante R701C no gene *SEC23B*, identificada do caso P26, foi classificada como VUS por falta de informações funcionais, de segregação e de associação com fenótipo. Na análise da variante, foi encontrado que preditores de patogenicidade indicam que a variante é provavelmente patogênica: SIFT, deletério (*damaging*); PolyPhen-2, provavelmente deletério; MutationTaster, variante causadora de doença; REVEL, 0,931; CADD, 31. O aminoácido onde está localizado a variante (posição 701 da proteína), está em um sítio conservado e apresenta uma alta probabilidade de ser conservado. Uma segunda variante em *SEC23B*:p.G358A, identificada na paciente P22, também apresentou resultados de preditores indicando como provavelmente patogênica e com baixa frequência nos bancos de dados populacionais, no entanto, não foi encontrado relatos na literatura.

4.4 Análise de variantes somáticas

Foram sequenciados os casos P03, P08 e P11, por apresentarem variantes patogênicas em heterozigose; e o caso P05, em que foi identificada uma CNV. As amostras tumorais foram identificadas como T03, T05, T08 e T11, de acordo com sua identificação germinativa. Considerando todos os tumores sequenciados, a média de cobertura foi de 374 reads, com cerca de 75% das bases lidas pelo menos 100 vezes, e 100% das amostras teve no mínimo 50 reads. A cobertura média do sequenciamento para as amostras T05, T08 e T11, cerca de 100 reads por base, foi suficiente para análise de variantes pontuais. Porém apenas para o caso T03 foi possível avaliar variantes pontuais e CNVs, pois o sequenciamento apresentou uma cobertura média de 370 reads por base (A).

Após a filtragem das variantes pela frequência no tumor ($\geq 0,05$), foram identificadas variantes patogênicas em 4/5 casos sequenciados. No caso T03, em que foi identificada uma variante patogênica germinativa em *MLH3*, não foram detectadas variantes pontuais ou CNVs patogênicas somáticas no mesmo gene. Nos outros dois casos em que foi investigado perda de heterozigose (P08 e P11) foram identificadas variantes patogênicas no tecido tumoral no mesmo gene da linhagem germinativa, *MUTYH* e *SEC23B*, respectivamente. Na paciente com a variante G396D em *MUTYH* foi detectada uma variante do tipo *missense*, identificada com frequência 0,055. Na amostra T11, foi identificada a variante Q298* no mesmo gene da variante germinativa (*SEC23B*), com uma frequência no tumor de 0,056.

No amostra T05, o material tumoral foi avaliado para variantes pontuais, onde foram identificadas duas variantes provavelmente patogênicas no gene *PTEN*, R142W e N262K. Devido a distância das duas variantes e baixa frequência de ambas no tumor – 0,055 e 0,057, respectivamente –, não foi possível avaliar se as estão *in cis* ou *in trans*.

4.5 Análise estatística

Com o intuito de investigar possíveis associações relativas aos dados clínicos, os testes estatísticos envolveram duas estratificações: Em um primeiro momento, as associações foram testadas ao estratificarmos a amostra em função da idade do acometimento do câncer, onde 6/42 (14,3%) mulheres foram diagnosticadas com câncer de endométrio antes dos 50 anos, enquanto 36/42 (85,7%) mulheres foram diagnosticadas depois dos 50 anos (Tabela 2). Em um segundo momento, as amostras foram

estratificadas conforme o risco para a predisposição ao câncer de endométrio: 26/42 (61,9%) casos de alto risco; e 16/42 (38,1%) casos de baixo risco (Tabela 3). Foi possível identificar que a invasão do miométrio apresenta evidências de estar associado à idade do acometimento ($p = 0,0047$) (Tabela 2), para o restante das características clinicopatológicas não houve associação significativa.

Tabela 2. Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função da idade ao diagnóstico.

		Mais de 50 anos (n)	Menos de 50 anos (n)	Valor de <i>p</i>
Risco p/ Câncer	Baixo	16	0	0.0670
	Alto	20	6	
Histologia Tumoral	Endometrióide	33	6	1.0000
	Misto	2	0	
	Seroso	1	0	
Grau FIGO	I	28	5	0.2319
	II	5	0	
	III	3	0	
	IV	0	1	
Grau Arquitetural	I	18	3	0.4344
	II	9	3	
	III	7	0	
Grau Nuclear	I	6	2	0.3949
	II	22	4	
	III	8	0	
Invasão do Miométrio	Limitado	4	4	0.0047
	Menos de 50%	18	2	
	Mais de 50%	14	0	
Invasão Angiolinfática	Não	25	5	1.0000
	Sim	5	0	
Invasão Endocervical	Não	27	5	0.5628
	Sim	7	0	

Por sua vez, quando estratificadas em função do risco para a predisposição ao câncer de endométrio, foi possível identificar evidência de outra associação, desta vez com o Grau Arquitetural ($p = 0,0010$). Foi observada uma diferença entre a idade ao diagnóstico entre pacientes de alto e baixo risco, com uma diferença de sete anos na

média, sendo paciente de alto risco diagnosticadas em menor idade. Embora em valor baixo, a associação não foi significativa ($p = 0,0572$) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função do risco para câncer.

		Baixo Risco (n)	Alto Risco (n)	Valor de <i>p</i>
Idade	Média (Desvio Padrão)	62,7 (8,9)	55,5 (12,3)	0.0572
	Mediana (Min-Máx)	63 (51-86)	57 (33-91)	
	Menos de 50 anos	0	6	
	Entre 50 e 59 anos	6	12	
	Mais de 60 anos	10	8	
Histologia Tumoral	Endometrióide	16	23	0.6980
	Misto	0	1	
	Seroso	0	2	
Grau FIGO	I	13	20	0.3741
	II	3	2	
	III	0	3	
	IV	0	1	
Grau Arquitetural	I	10	11	0.0010
	II	0	12	
	III	5	2	
Grau Nuclear	I	3	5	1.0000
	II	10	16	
	III	3	5	
Invasão do Miométrio	Limitado	2	6	0.7716
	Menos de 50%	8	12	
	Mais de 50%	6	8	
Invasão Angiolinfática	Não	11	19	1.0000
	Sim	2	3	
Invasão Endocervical	Não	13	19	0.6857
	Sim	2	5	

Os testes par-a-par para amostras estratificadas por idade identificaram dois testes apresentaram evidências significativas, ambos em relação a invasão do miométrio. Identificamos que mulheres com câncer abaixo dos 50 anos tendem a ter 9 vezes mais ($p = 0,0383$) tumores limitados ao miométrio quando comparada a tumores que invadem

menos se 50%, e 29 vezes mais ($p = 0,0090$) quando comparado com invasão de mais que 50% do miométrio. Além disso, nenhuma outra comparação par-a-par apresentou evidência de associação significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de significância estatística (Valor de p) e de Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (inferior = L95; superior = U95) para os testes par-a-par das amostras estratificadas em função da idade.

Grau FIGO			Histologia Tumoral		
	Valor de p	OR (L95-U95)		Valor de p	OR (L95-U95)
I vs. II	1.0000	-	Endom. vs. Seroso	1.0000	-
I vs. III	1.0000	-	Endom. vs. Misto	1.0000	-
I vs. IV	0.1760	-	Seroso vs. Misto	1.0000	-
II vs. III	1.0000	-			
II vs. IV	0.1667	-			
III vs. IV	0.2500	-			
Grau Arquitetural			Invasão do Miométrio		
	Valor de p	OR (L95-U95)		Valor de p	OR (L95-U95)
I vs. II	0.6430	-	Lim vs. <50%	0.0383	9.00 (1.20-67.41)
I vs. III	0.5510	-	Lim. vs. >50%	0.0090	29.00 (1.30-648.44)
II vs. III	0.2630	-	<50 vs. >50	0.5010	
Grau Nuclear					
	Valor de p	OR (L95-U95)			
I vs. II	0.6090	-			
I vs. III	0.4670	-			
II vs. III	0.5510	-			

De maneira semelhante, o teste par-a-par para a amostra estratificada em função do risco para predisposição ao câncer de endométrio permitiu identificar evidências de duas associações significativas, ambas em relação ao grau arquitetural do tumor. Pacientes com alto risco para predisposição ao câncer de endométrio tendem a apresentar

grau arquitetural II quando comparamos com grau I (OR = 22.88, p = 0,0050) e quando comparamos com grau III (OR = 55,00; p = 0,0010) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de significância estatística (Valor de p) e de Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança de 95% (inferior = L95; superior = U95) para os testes par-a-par das amostras estratificadas em função do risco para a predisposição ao câncer de endométrio.

Grau FIGO			Histologia Tumoral		
	Valor de p	OR (L95-U95)		Valor de p	OR (L95-U95)
I vs. II	0.6320	-	Endom. vs. Seroso	1.0000	-
I vs. III	0.2880	-	Endom. vs. Misto	0.5121	-
I vs. IV	1.0000	-	Seroso vs. Misto	1.0000	-
II vs. III	0.1960	-			
II vs. IV	1.0000	-			
III vs. IV	1.0000	-			

Grau Arquitetural			Invasão do Miométrio		
	Valor de p	OR (L95-U95)		Valor de p	OR (L95-U95)
I vs. II	0.0050	22.82 (1.20-435.20)	Lim vs. <50%	0.6490	-
I vs. III	0.3950	-	Lim. vs. >50%	0.6690	-
II vs. III	0.0010	55.00 (2.25-1346.20)	<50 vs. >50	1.0000	-

Grau Nuclear		
	Valor de p	OR (L95-U95)
I vs. II	1.0000	-
I vs. III	1.0000	-
II vs. III	1.0000	-

A partir do grupo de alto risco para predisposição ao câncer, as pacientes foram categorizadas pelos dados moleculares em dois grupos: 12/26 (46,2%) casos onde foram identificadas variantes germinativas patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto; e 14/26 (53,8%) casos onde não foram identificadas variantes germinativas. A análise comparativa desses grupos não apresentou evidência de associação significativa (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos testes de significância estatística para as características deste estudo na amostra estratificada em função do risco para câncer.

		Com variantes (n)	Sem variantes (n)	Valor de <i>p</i>
Idade	Média (Desvio Padrão)	54,5 (16,5)	56,3 (7,5)	
	Mediana (Min-Máx)	56,5 (33-91)	59 (36-66)	
	Menos de 50 anos	4	2	0,3652
	Mais de 50 anos	8	12	
Histórico de câncer	Apenas pessoal	2	0	0,4009
	Apenas familiar	7	10	
	Pessoal e Familiar	3	4	
Histologia Tumoral	Endometrióide	11	12	1,0000
	Misto	0	1	
	Seroso	1	1	
Grau FIGO	I	9	11	0,8852
	II	1	1	
	III	1	2	
	IV	1	0	
Grau Arquitetural	I	7	4	0,1205
	II	3	9	
	III	1	1	
Grau Nuclear	I	3	2	0,6227
	II	7	9	
	III	1	3	
Invasão do Miométrio	Limitado	4	2	0,1144
	Menos de 50%	7	5	
	Mais de 50%	1	6	
Invasão Angiolinfática	Não	1	2	1,0000
	Sim	8	11	
Invasão Endocervical	Não	2	3	1,0000
	Sim	9	10	

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Idade precoce e histórico pessoal de câncer já foram associados com pacientes portadores de variantes (TIAN; BI; REN; HE *et al.*, 2019). Cerca de 14% das pacientes com CE são diagnosticadas em mulheres em idade pré-menopausa, e 5% ocorrem em mulheres com menos de 40 anos (MCALPINE; TEMKIN; MACKAY, 2016). Seis pacientes do estudo que tiveram câncer de endométrio antes dos 50 anos (14,3%), sendo que quatro casos, a paciente foi diagnosticada antes dos 40 anos, o que representa 9,5% da casuística, um percentual moderadamente maior que o reportado na literatura. Entre as pacientes com idade precoce, foram identificadas variantes em quatro casos, sendo que no caso P08, foi identificada uma variantes patogênicas. Do mesmo grupo, cinco pacientes apresentaram também histórico familiar de câncer, e nenhum dos casos relatou casos em parentes de primeiro grau.

A idade média das pacientes do estudo foi 58 anos, com idade variando de 33 a 91 anos, o que está de acordo com outros estudos com pacientes de câncer de endométrio. Um estudo em mulheres com CE não triadas relatou que 15% das pacientes tinham menos de 45 anos, 47% teve o tumor entre 46 e 64 anos, e 38% tinham mais de 65 anos. Os valores deste estudo variaram um pouco do relatados, sendo as porcentagens 14,3%, 61,9% e 23,8%, respectivamente (BHARATI; JENKINS; LINDOR; LE MARCHAND *et al.*, 2014; DILLON; GONZALEZ; DEMARS; BLOCH *et al.*, 2017; LACHANCE; EVERETT; GREER; MANDEL *et al.*, 2006; MCDOUGAL; NAIR-FAIRLESS; WEISS; DAO *et al.*, 2021).

No estudo foi observado que pacientes em que não foram identificadas variantes germinativas apresentaram uma média de idade 2 anos maior que em mulheres portadoras de variantes germinativas. O mesmo foi identificado em um estudo não triado de CE, onde a idade média de mulheres sem variantes e portadoras de variantes germinativas foi 63,8 e 60,1, respectivamente. A diferença foi considerada significativa ($p = 0,01$), principalmente quando avaliado somente tumores do tipo II ($p = 0,004$) (LONG; LILYQUIST; WEAVER; HU *et al.*, 2019). Pacientes com variantes em genes do sistema MMR, diagnosticadas com síndrome de Lynch, apresentam uma idade média de diagnóstico menor que mulheres com variantes germinativas em outros genes e mulheres não portadoras de variantes ($p < 0,01$) (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016).

A idade é um dos fatores mais importantes para o prognóstico de pacientes com câncer de endométrio, pois estudos evidenciam que a saúde da mulher declina com a

idade, assim como ocorre um aumento de comorbidades e complicações cirúrgicas. Em um estudo que avaliou diferenças entre tumores em mulheres de diferentes idades, os autores observaram que a histologia varia com a idade, sendo que tumores do tipo II, como células claras e seroso papilífero, foram encontrados com maior incidência entre mulheres com mais de 65 anos (LACHANCE; EVERETT; GREER; MANDEL *et al.*, 2006), e essas mesmas características da severidade do tumor foi observada quando avaliado o grupo de mulheres com mais de 75 anos (CITRON; SUTTON; YAMADA; MEHTA *et al.*, 2004).

O presente estudo encontrou uma incidência concordante sobre os graus do tumor ao diagnósticos, quando observado casuísticas de mulheres com CE em idade precoce (abaixo dos 50 anos). A maioria dos casos foram detectados como grau I, sendo 83,3% neste estudo, em comparação com 84,2% em uma casuística de CE antes dos 45 anos (PELLERIN; FINAN, 2005). Pacientes diagnosticados com menos de 45 anos apresentam uma menor frequência de doença avançada, maior grau de diferenciação tumoral e melhor prognóstico (PELLERIN; FINAN, 2005). Na casuística deste projeto, foi observado uma diferença estatística entre a idade ao diagnóstico e a invasão tumoral do miométrio ($p = 0.0047$). Mulheres diagnosticadas com idade maior que 50 anos tiveram tumores mais invasivos, sendo a maior diferença identificada foi entre tumores limitados ao endométrio e tumores que invadiram mais da metade do endométrio ($p = 0,0090$).

O risco de desenvolvimento de câncer de endométrio em idade precoce é duas vezes maior em mulheres com histórico familiar de câncer, em comparação com mulheres com histórico familiar negativo para câncer (HE; TAO; HUANG; JIA *et al.*, 2018). Parslov *et al* descreveu que em mulheres com menos de 50 anos, o histórico familiar de CE está associado com um *odds ratio* de 2,1 (95% CI 1.1, 3.8). Outros fatores de risco são comuns para mulheres pré ou pós-menopausa, como casos de câncer da família, histórico reprodutivo, terapia de reposição hormonal e uso de contraceptivos (PARSLOV; LIDEGAARD; KLINTORP; PEDERSEN *et al.*, 2000).

O risco aumenta quando mais de um familiar for afetado, quando familiares com câncer tem um grau de parentesco mais próximo entre si, e em casos de familiares afetados por CE (BHARATI; JENKINS; LINDOR; LE MARCHAND *et al.*, 2014; WIN; REECE; RYAN, 2015). Ghanbari Andarieh *et al* demonstrou em um estudo com 205 mulheres com câncer de endométrio e 509 controles, que mulheres com histórico familiar de neoplasias ginecológicas apresentam um risco fortemente associado com

desenvolvimento de CE (OR=5.0, 95%) (GHANBARI ANDARIEH; AGAJANI DELAVAR; MOSLEMI; ESMAEILZADEH, 2016).

De forma geral, a associação entre histórico de câncer na família e CE é relatado de forma conflitante. Em um estudo, câncer em familiar de primeiro grau não aumentou o risco para câncer endometrial em mulheres pós-menopausa (OLSON; SELLERS; ANDERSON; FOLSOM, 1999). Um dado importante a ser considerado foi relatado em um estudo de 2014, onde Bharati *et al* descreveram o risco para câncer de endométrio em mulheres que não são portadoras de variantes nos genes do sistema MMR. Neste estudo, o risco para CE em mulheres sem histórico familiar foi de 0,94%, enquanto para mulheres com histórico de tumores endometriais na família, o risco foi de 3,80%. Os autores concluem que existe um risco aumentado para CE em mulheres que não apresentam defeitos do sistema MMR, e esse risco está associado a histórico familiar de câncer (BHARATI; JENKINS; LINDOR; LE MARCHAND *et al.*, 2014; DASHTI; CHAU; OUAKRIM; BUCHANAN *et al.*, 2015). Essa conclusão está de acordo com o presente estudo, pois relata a existência de etiologias genéticas e hereditárias diferentes das causadas por alteração no sistema MMR ou síndrome de Lynch.

Outros estudos demonstram que o histórico de câncer uterino, incluindo câncer de endométrio, em familiares de primeiro e segundo grau apresentam um risco moderado para câncer de endométrio. O mesmo resultado foi encontrado para associação com tumores com MSI e histórico de câncer, e tumores MSS e familiares com casos de câncer. Nenhum dos achados foi encontrado como estatisticamente significativo (COOK; NELSON; STIDLEY; DONG *et al.*, 2013; JOHNATTY; TAN; BUCHANAN; BOWMAN *et al.*, 2017; LUCENTEFORTE; TALAMINI; MONTELLA; DAL MASO *et al.*, 2009).

Foram identificadas variantes em 46,1% das pacientes (12/26). Essa prevalência é alta quando comparada com outros estudos de incidência de mutações em mulheres com câncer de endométrio. Ring *et al* e Long *et al* identificaram variantes em 4,2% e 9,2% das pacientes, respectivamente (LONG; LILYQUIST; WEAVER; HU *et al.*, 2019; RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016). No entanto, esse aumento pode ser justificado pela metodologia de triagem das pacientes, em que apenas as amostras das pacientes com histórico pessoal e familiar de câncer foram encaminhadas ao sequenciamento. Esse dado é indicativo de que a triagem por critérios clínicos pode ser útil no manejo de pacientes com câncer de endométrio, e na indicação a investigação e aconselhamento genético.

No câncer de endométrio, os genes que apresentam mais variantes são os associados a Síndrome de Lynch (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1* e *PMS2*), pertencentes ao sistema MMR. Entre 2 a 6% dos casos de CE são diagnosticados em associação com SL. Em uma casuística de 381 pacientes, foram identificadas 22 variantes em genes da Síndrome de Lynch, (3 *MLH1*, 5 *MSH2*, 2 *EPCAM-MSH2*, 6 *MSH6*, 6 *PMS2*) em comparação com 13 genes não associados a síndrome, sendo quatro casos com a mesma variante em *CHEK2* (c.1100delC), que é classificada como patogênica, e variante em cada um dos genes *APC*, *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *NBN* e *PTEN* e um deleção dos éxons 6 a 9 no gene *RAD51C* (RING; BRUEGL; ALLEN; ELKIN *et al.*, 2016).

Outro estudo avaliou variantes germinativas em 1170 paciente com CE primário, onde 72,6% eram do tipo I e 27,4% eram do tipo II. Os autores identificaram 53 variantes nos genes *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN*, *RAD51C*, *TP53* e *NF1*, e relatou os genes *MSH6* (n = 12), *ATM* (n = 9) e *CHEK2* (n = 8) como os mais prevalentes entre as variantes. A variante mais comum no gene *CHEK2* também foi c.1100delC, e foram incluídas variantes exônicas e com efeito no *splicing* (LONG; LILYQUIST; WEAVER; HU *et al.*, 2019).

Os genes com maior incidência neste estudo foram *APC*, *MUTYH* e *SEC23B*, cada um com três variantes, seguido dos genes *ATM* e *BRCA2*, com dois variantes cada. O restante dos genes *BRIP1*, *CHEK2*, *MLH3*, *PMS2* e *PTEN* foram identificadas em apenas um caso. Todas as variantes foram identificadas em heterozigose. Vale ressaltar que em outras casuísticas que encontram, em maioria, variantes associadas ao sistema MMR, e, conseqüentemente, em indivíduos diagnosticados com síndrome de Lynch, não realizam uma triagem prévia das pacientes com CE. Ao realizar a triagem inicial neste estudo, que excluiu casos com tumores que apresentem deficiência no sistema MMR, foi possível observar uma frequência maior de variantes em genes que não estão relacionados ao sistema MMR, que são subestimados nos estudos que incluem casos de síndrome de Lynch. O resultado deste estudo indica que genes de outras vias de reparo, assim como oncogenes e genes supressores tumorais, também podem causar um aumento no risco para câncer de endométrio.

Diferentes de outros estudos com CE, a variante identificada no *CHEK2* foi c.1654C>T (também anotada como c.1525C>T), encontrada na paciente P15. A variante está localizada em um resíduo moderadamente conservado, e preditores de patogenicidade indicam um impacto tolerável da variante (CADD: 0,822; REVEL: 0,091). Ela já foi identificada em casos de câncer de mama e ovário (KLEIBLOVA;

STOLAROVA; KRIZOVA; LHOTA *et al.*, 2019; KRAEMER; AZZARELLO-BURRI; STEINDL; BOONSAWAT *et al.*, 2019), câncer de próstata (TISCHKOWITZ; YILMAZ; CHEN; KARYADI *et al.*, 2008), e em dois pacientes com câncer colorretal em suspeita de síndrome de Lynch (YURGELUN; ALLEN; KALDATE; BOWLES *et al.*, 2015). Estudos funcionais demonstraram que a variante não alterou funcionalmente o produto em ensaios de quinase *in vitro* e em ensaios em células humanas, medindo a fosforilação de KAP1 (KLEIBLOVA; STOLAROVA; KRIZOVA; LHOTA *et al.*, 2019). Enquanto em outro ensaio da taxa de crescimento em leveduras, a variante apresentou um comportamento semifuncional *in vivo* (DELIMITSOU; FOSTIRA; KALFAKAKOU; APOSTOLOU *et al.*, 2019).

No total, foram identificadas três variantes no caso da paciente P15, e além da variante no *CHEK2*, a paciente também apresentou as variantes *APC*:p.H929R e *BRCA2*:p.H1731Y. Este é o primeiro relato da variante H929R em *APC* na literatura. A variante ocorre em um resíduo conservado, não está presente nos bancos de dados populacionais, e apresenta preditores de patogenicidade conflitantes. Considerando a falta de informações até o momento, a variante é classificada como de significado incerto.

A variante no H1731Y no *BRCA2* ocorre em um aminoácido pouco conservado e os preditores *in silico* indicam uma variante com baixa probabilidade de ser patogênica. No entanto, a variante já foi descrita na literatura em indivíduos com câncer de mama, e foram consideradas VUS (BORG; HAILE; MALONE; CAPANU *et al.*, 2010; ZANELLA; MEROLA; BIASIOTTO; ARCHETTI *et al.*, 2017), e em pacientes com suspeita de síndrome de câncer de mama e ovário hereditário, caso onde a variante foi classificada como provavelmente benigna (MACHACKOVA; CLAES; MIKOVA; HAZOVA *et al.*, 2019), identificada em uma família com outra variante em *BRCA2* classificada como patogênica, o que indica que a variante H1731Y não era a etiologia do câncer (SANTONOCITO; RIZZA; PARIS; MARCHIS *et al.*, 2020), e detectada em uma família de alto risco HBOC (AZZOLLINI; SCUVERA; BRUNO; PASANISI *et al.*, 2016).

Uma segunda variante em *BRCA2* foi identificada no caso da paciente P09. A variante V859A não foi relatada na literatura, apenas apresenta um registro no Clinvar, onde a variante foi classificada como VUS em base em submissões de laboratório associando a mutação com o fenótipo de câncer de mama familiar. A variante está ausente nos bancos de dados populacionais e apresenta resultados conflitantes nos preditores de patogenicidade, com uma maior quantidade de algoritmos indicando que a variante é

provavelmente benigna ou tolerável pela célula. A falta de informações complementares justifica a classificação da variante como VUS.

A variante sinônima S815= do gene *PMS2*, identificada no caso P13, é predita a enfraquecer a eficiência do sítio doador nativo, com provável efeito no processo de transcrição da proteína, porém efeitos diretos ainda não estão esclarecidos. O gene *PMS2*, junto com *MSH2*, *MSH6* e *MLH1*, pertencem ao espectro clássico da Síndrome de Lynch, um distúrbio genético caracterizado por variantes germinativas nos genes do sistema reparo de malpareamento (MMR). Deficiência dos genes do sistema MMR (MMR-D) e instabilidade de microssatélite (MSI) são características tumorais marcantes em pacientes com SL (KAHN; GORDHANDAS; MADDY; BALTICH NELSON *et al.*, 2019; LONG; LILYQUIST; WEAVER; HU *et al.*, 2019).

O tumor relacionado ao caso com variante em *PMS2*, como os outros desta amostra, é proficiente para o sistema MMR e com imunohistoquímica (IHQ) positiva para as proteínas do sistema, incluindo *PMS2*. Embora a variante possa afetar o sítio de *splicing*, o status do tumor indica um efeito pouco ou não deletério da variante, sugerindo que esse achado possui pouca evidência de ser a etiologia do câncer, mas permanece com classificação de VUS até que seja possível determinar funcionalmente o efeito da variante nas células endometriais.

Além da variante no *PMS2*, a paciente P13 apresentou uma segunda variante. A variante *APC*:p.S2842A está presente em um resíduo altamente conservado, e apresenta uma frequência baixa nos bancos de dados populacionais. Ainda não foram relatados na literatura casos de detecção da variante em pacientes, e não há concordância entre os preditores *in silico*, que indicam um resultado de provavelmente patogênico (CADD: 26,5) ou não deletério (REVEL: 0,394). Adicionalmente, estudo com levedura demonstrou que a variante não afeta, ou aumenta, a interação da porção C-terminal da proteína APC com o domínio PDZ, onde a variante está localizada (SOTELO; VALIENTE; GIL; PULIDO, 2012).

No caso P04 foi identificada outra variante no gene *APC*:p.A2410T. Essa variante acarreta a troca de uma alanina para uma treonina, que são aminoácidos com propriedades físico-químicas muito similares. O resíduo é pouco conservado durante a evolução, além de ser predito como tolerável ou benigno pelos preditores *in silico*. A variante não possui relato na literatura, e pela escassez de dados, foi classificada como VUS. A paciente no estudo possui um histórico pessoal de câncer significativo, com dois cânceres antes dos 50 anos, o câncer de endométrio aos 43 anos e um câncer de intestino aos 45 anos. A falta

de variantes importantes nesse caso sugere que outras etiologias genéticas podem estar envolvidas.

A variante S1037* do gene *MLH3* não possui relatos na literatura. O gene faz parte da família de genes de reparo de malpareamento e sua proteína, MLH3, interage com a proteína MLH1, apresentando uma redundância funcional com PMS2. O heterodímero MLH1/MLH3 tem função na promoção do processo de crossing-over durante a meiose, e está envolvido na correção de pareamento de pequenas deleções e inserções (KORHONEN; VUORENMAA; NYSTROM, 2008). *MLH3* é investigado em casos de câncer colorretal hereditário e esporádico, endométrio e tireoide, mas o efeito das suas variantes na tumorigênese ainda não foi confirmada (DURATURO; LICCARDO; IZZO, 2016).

Estudos em camundongos knockout para os homólogos dos complexos MutL (MLH1, PMS2, PMS1 e MLH3) demonstraram que o desenvolvimento de tumores é mais expressivo em animais deficientes para *Mlh1*, em comparação com animais *Pms2*^{-/-}. Esse achado sugere que o heterodímero MLH1/PMS2 não é o único complexo funcional entre os MutL, dando suporte à função do dímero MLH1/MLH3. Esse estudo também concluiu que a deficiência isolada de *Mlh3* pode prejudicar o processo de reparo de malpareamento de DNA e resultar na aceleração da carcinogênese em camundongos (CHEN; DUDLEY; HAGEN; DIZON *et al.*, 2005).

Um estudo sobre variantes no *MLH3* em 57 pacientes com câncer de endométrio identificou nove variantes de origem germinativa, onde 5/9 foram identificadas em mulheres com tumor proficiente (MSS) e, em um caso, foi encontrado perda de heterozigose no tumor. Os autores sugerem que a *MLH3* atue como promotor da tumorigênese através de alterações nas vias apoptóticas, e conclui que variantes no *MLH3* provavelmente têm função em um subgrupo de câncer de endométrio (TAYLOR; POWELL; GIBB; RADER *et al.*, 2006).

No caso da paciente, a variante foi identificada em heterozigose, e não foram identificadas outras variantes em *MLH3* no tumor que pudesse causar a perda da heterozigose. Em razão disso, não se pode afirmar que a variante tenha causado um aumento direto no risco para CE nessa paciente. Embora em muitos casos não seja possível identificar uma segunda mutação, chamada de segundo *hit*, no tumor, esse mecanismo de carcinogênese já foi suportado por outros estudos (HUANG; MASHL; WU; RITTER *et al.*, 2018).

A variante patogênica em *MUTYH*:p.G396D, identificado em heterozigose no estudo, já foi amplamente descrita na literatura, possuindo estudos em diferentes casuísticas e de caracterização funcional. *MUTYH* (homólogo humano do MutY) é um gene de reparo por excisão de base, com função importante na detecção e proteção contra danos oxidativos no DNA. G396D está localizada no domínio C-terminal, este está envolvido no reconhecimento dos danos oxidativos e é considerado importante para conformidade da proteína *MUTYH* (PITROSKI; COSSIO; KOEHLER-SANTOS; GRAUDENZ *et al.*, 2011).

A posição 396 da proteína *MUTYH* é um resíduo altamente conservado, e a alteração de uma glicina (G) para um ácido aspártico (D) causa uma diferença físico-química moderada. As variantes Y165C e G396D representam cerca de 70% de todas as alterações germinativas em *MUTYH*. Em relação a variante G396D, ensaios com a bactéria *E. coli* evidenciaram que o gene mutado codifica uma proteína parcialmente comprometida para sua atividade como glicosilase (CHMIEL; LIVINGSTON; DAVID, 2003; KOMINE; SHIMODAIRA; TAKAO; SOEDA *et al.*, 2015). Em outro estudo, a proteína transcrita pela variante produziu um fenótipo mais pronunciado em comparação com a perda total da proteína *MUTYH* (D'AGOSTINO; MINOPRIO; TORRERI; MARINONI *et al.*, 2010; MOLATORE; RUSSO; D'AGOSTINO; BARONE *et al.*, 2010).

Estudos já relataram evidência de portadores em heterozigose de G396D em casos de câncer colorretal (PITROSKI; COSSIO; KOEHLER-SANTOS; GRAUDENZ *et al.*, 2011), inclusive em casos proficientes para o sistema MMR (GARRE; BRICENO; XICOLA; DOYLE *et al.*, 2011), e de endométrio (BARNETSON; DEVLIN; MILLER; FARRINGTON *et al.*, 2007).

Ao analisar o material tumoral dessa paciente, foi identificada uma segunda variante patogênica em *MUTYH*. A variante R19* já foi relatada no banco de dados Cosmic (COSM5969454), em tecido somático de trato aerodigestivo alto. A variante ocorre no éxon 2, e a substituição gera um códon de parada dentro dos primeiros 150 nucleotídeos da proteína. Essa alteração pode escapar da degradação de mRNA mediada por mutação sem sentido, e a região afetada é crítica para a função da proteína (LINDEBOOM; SUPEK; LEHNER, 2016; RHEE; LEE; PARK; KIM *et al.*, 2017). Devido sua baixa frequência no tumor (0,055) não é possível afirmar que essa variante tenha causado uma perda da heterozigose do gene *MUTYH* no tumor, causando sua

desativação total, porém informações complementarem destacam o efeito da variante no desenvolvimento do câncer.

Na literatura, a variante foi identificada em tecido tumoral de carcinoma oral de células escamosas (AL-HEBSHI; LI; NASHER; EL-SETOUHY *et al.*, 2016), carcinoma renal de células claras (MENG; JIANG; CUI; YIN *et al.*, 2020), e de câncer colorretal esporádico, onde foi identificado em heterozigose sem a perda do segundo alelo (KUNO; MATSUBARA; TSUDA; KOBAYASHI *et al.*, 2012). Essa variante também já foi relatada em linhagem germinativa tanto em heterozigose, quanto em homozigose ou heterozigose composta em pacientes com múltiplos pólipos e associados a polipose (LI; JIN; YANG; ZANG *et al.*, 2017; NIELSEN; JOERINK-VAN DE BELD; JONES; VOGT *et al.*, 2009; VOGT; JONES; CHRISTIAN; ENGEL *et al.*, 2009), em casos de câncer colorretal (JONES; VOGT; NIELSEN; CHRISTIAN *et al.*, 2009; SHINMURA; GOTO; TAO; KATO *et al.*, 2014), e em uma mulher diagnosticada com síndrome de Lynch-like (XU; HUANG; LI; ZHU *et al.*, 2020).

Além variante patogênica germinativa em *MUTYH* que foi identificada na paciente P08, também foram anotadas duas variantes de significado incerto: *ATM*:p.L752V e *BRIP1*:p.W1217C. A variante no gene *ATM* ocorre em um resíduo bem conservado, e algoritmos de predição de patogenicidade indicam efeitos contraditórios. L752V já foi identificada em uma casuística de pacientes com câncer de mama com um histórico de malignidades hematológicas na família, e nesse estudo, também foi classificada como variante de significado incerto (PAGLIA; LAUGE; WEBER; CHAMP *et al.*, 2010).

A segunda VUS do caso, *BRIP1*:p.W1217C causa a troca de um triptofano para uma cistina, que são dois aminoácidos com propriedades muito diferentes. Essa variante já foi descrita em uma casuística de 488 pacientes com câncer de mama de graus I a III, onde foi identificada em uma paciente e foi classificada como VUS (TUNG; LIN; KIDD; ALLEN *et al.*, 2016). A alteração está localizada em um resíduo pouco conservado, e é predito como tolerável nas análises pelos preditores *in silico* de patogenicidade e conservação evolucionária. Além disso, a variante não está localizada em nenhum domínio funcional conhecido. Outra variante na mesma posição (c.3651G>A) resulta em uma proteína truncada (p.W1217*), e foi identificada em paciente com câncer de ovário familiar, onde foi associada com um aumento do risco para câncer de ovário (WEBER-LASSALLE; HAUKE; RAMSER; RICHTERS *et al.*, 2018).

Duas outras variantes foram identificadas em *MUTYH*, N357S e I223V, e ambas foram classificadas como VUS. A primeira (N357S), identificada na paciente P07, está localizada em um resíduo conservado, e existe uma pequena diferença física e química entre os aminoácidos Asparagina (N) e Serina (S), porém ainda não foi relatada na literatura e os preditores indicam que a variante é provavelmente tolerada pela célula.

A variante *MUTYH*:p.I223V foi anotada no caso P25, e está presente em um aminoácido altamente conservado, e já foi relatada em heterozigose em pacientes com diversos tipos de neoplasias, incluindo câncer de cólon, onde foi encontrada segregada na família em casos de adenomas e câncer colorretal (HENN; SPIER; ADAM; HOLZAPFEL *et al.*, 2019; MORAK; LANER; BACHER; KEILING *et al.*, 2010; MORAK; MASSDORF; SYKORA; KERSCHER *et al.*, 2011), polipose adenomatosa (LORCA; RUEDA; MARTIN-MORALES; FERNANDEZ-ACENERO *et al.*, 2019), próstata (ISAACSSON VELHO; SILBERSTEIN; MARKOWSKI; LUO *et al.*, 2018) e câncer de mama (BROVKINA; SHIGAPOVA; CHUDAKOVA; GORDIEV *et al.*, 2018). Estudos funcionais mostraram que a variante causa a perda parcial da atividade da proteína *MUTYH* (KOMINE; SHIMODAIRA; TAKAO; SOEDA *et al.*, 2015; SHINMURA; GOTO; TAO; SUGIMURA, 2012).

Portadores de variantes em bialélicas em *MUTYH*, em homozigose ou heterozigose composta, apresentam um risco aumentado para desenvolvimento de pólipos e câncer colorretal e de endométrio, porém o risco para desenvolvimento de câncer em indivíduos portadores de variantes monoalélicas ou em heterozigose, como foram identificadas nas pacientes do estudo, em *MUTYH* ainda é incerto (CURIA; CATALANO; ACETO, 2020; RENNERT; LEJBKOWICZ; COHEN; PINCHEV *et al.*, 2012).

Alguns dos estudos concluíram um aumento em duas vezes do risco para câncer de endométrio em variantes monoalélicas (WIN; CLEARY; DOWTY; BARON *et al.*, 2011; WIN; REECE; DOWTY; BUCHANAN *et al.*, 2016), enquanto outros não fizeram tal associação (ASHTON; PROIETTO; OTTON; SYMONDS *et al.*, 2009). Estudos recentes relatam um aumento de 3% no risco para CE aos 60 anos em portadores de variantes monoalélicas, e um possível aumento do risco para variantes bialélicas (HUTCHCRAFT; GALLION; KOLESAR, 2021).

Foram identificadas variantes em *SEC23B* e *PTEN*, ambos genes já relacionados a Síndrome de Cowden (CS), uma doença autossômica e dominante, caracterizada por predisposição de câncer de mama, tireoide e endométrio.

Variantes germinativas no gene *SEC23B* tem potencial para predisposição ao câncer pelo processo de tumorigênese mediada por estresse do retículo endoplasmático. Esse processo já é reconhecido como etiologia para o crescimento tumoral. A expressão variante de *SEC23B* está aumentada nos cânceres de tireoide, fígado e próstata (JING; WANG; LIU, 2019; YANG; CHEN; LI; LU *et al.*, 2020).

A variante em *SEC23B* do caso P11 (p.R550*) foi classificada como patogênica pelos critérios ACMG por relatos associados ao fenótipo de anemia diseritropoiética congênita tipo II, encontrada em homozigose nos pacientes com esse tipo de anemia (IOLASCON; RUSSO; ESPOSITO; ASCI *et al.*, 2010; RUSSO; GAMBALE; LANGELLA; ANDOLFO *et al.*, 2014). A variante identificada na casuística foi identificada em heterozigose, e está localizada no domínio helical do gene, crítico para ligação com SAR1, uma enzima GTPase ativada por *SEC23B* (YEHA; JINDAL; KOMAR; ENG, 2018). Embora existam relatos de associação de variantes em *SEC23B* com câncer e Síndrome de Cowden, a associação entre câncer de endométrio e a variante R550* ainda não foi esclarecida.

Esse caso também foi encaminhado para sequenciamento de variantes somáticas, para tentar elucidar se a presença da variante germinativa pode ter causado um aumento no risco para desenvolvimento do tumor da paciente P11. Na análise somática foi identificada a variante patogênica Q298* no gene *SEC23B*, e esta não está descrita em nenhum dos bancos de dados estudados. A variante *nonsense* foi encontrada com frequência de 0,056 no tumor, e classificada como patogênica por estar ausente nos bancos de dados populacionais, e apresentam resultados de possível patogenicidade pelos preditores *in silico* (CADD = 39). A variante ainda não foi relatada na literatura.

Além da variante patogênica em *SEC23B*, também foi identificada uma VUS no caso da paciente P11. A variante *ATM*:p.T656A está presente em um resíduo moderadamente conservado, e a troca de aminoácidos apresentam uma pequena diferença físico-química. A variante não está presente nos bancos de dados, e a análise *in silico* do efeito da variante na estrutura e função da proteína apresentou resultados não concordantes. A variante foi identificada em 392 famílias com câncer de mama negativas para variantes em *BRCA1* e *BRCA2*, em um estudo que concluiu que variantes em *ATM* podem ser responsáveis por uma parcela significativa dos casos de susceptibilidade ao câncer de mama (TAVERA-TAPIA; PEREZ-CABORNERO; MACIAS; CEBALLOS *et al.*, 2017).

A paciente P26 também apresentou variante em *SEC23B*. A variante R701C já foi relatada na literatura em casos de câncer. Em um estudo, foram avaliados dados de TCGA de carcinomas papilífero de tireoide (identificado no TCGA como THCA), e a variante foi identificada, assim como na paciente P26, em linhagem germinativa e em heterozigose (YEHIA; NIAZI; NI; NGEOW *et al.*, 2015). A variante também já foi descrita em homozigose ou heterozigose composta em casos de anemia diseritropoiética congênita tipo II (BIANCHI; FERMO; VERCELLATI; BOSCHETTI *et al.*, 2009; ZHANG; WAN; LIU; WEN *et al.*, 2019).

No caso da paciente P26, ela apresentou um câncer de mama anterior ao CE, e como metodologia terapêutica, a paciente fez uso de tamoxifeno. Tamoxifeno (TMX) é uma terapia hormonal adjuvante amplamente utilizada como modulador seletivo de estrógeno na terapia do câncer de mama invasivo. Contudo é importante ressaltar que a droga neoplásica tamoxifeno é reconhecidamente um risco para o desenvolvimento de câncer de endométrio primário. Porém, assim como no caso da paciente do estudo, o tumor que se desenvolve pelo uso de TMX é geralmente seroso, de baixo grau e com um bom prognóstico (OKA; SAKAI; YAMAGAMI; HIRANO *et al.*, 2021; SHARMA, 2020).

Outros tipos de câncer também já foram associados a variantes germinativas em *SEC23B*. Um estudo identificou a variante p.V594G em uma família com características clínicas para SC e histórico predominante de câncer de tireoide, e casos isolados de câncer de endométrio, mama, pele e tumores benignos. As células com a variante apresentaram um aumento significativo de migração celular e transição epitélio-mesênquima, sugerindo fenótipos relevantes para o desenvolvimento do câncer (YEHIA; NIAZI; NI; NGEOW *et al.*, 2015).

Variações no número de cópias (CNV) são regiões em que são observados diferenças, deleções ou duplicações, entre dois genomas. Podem representar polimorfismos benéficos ou ser associados a doenças, como a predisposição ao câncer associada a CNV nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *APC* e *PTEN* (KUIPER; LIGTENBERG; HOOGERBRUGGE; GEURTS VAN KESSEL, 2010; ZHOU; YANG; SUN; XU *et al.*, 2019).

Embora existam relatos sobre duplicações em genes de supressão tumoral, poucos casos são analisados quanto ao efeitos da variante sobre o fenótipo. Um estudo com pacientes de câncer de mama identificou uma duplicação dos éxons 1 a 7 no gene *RAD51C*, um gene de supressão tumoral, com função no reparo homólogo de DNA. Um

grupo realizou estudos de segregação da variante na família, de frequência em grupo controle, e expressão do RNA transcrito (mRNA) em linfócitos. Os autores discutem que se a duplicação for transcrita como uma proteína truncada, isso pode perturbar a formação do complexo da RAD51C (PELTTARI; SHIMELIS; TOIMINEN; KVIST *et al.*, 2018).

PTEN é um gene supressor tumoral e sua sinalização regula a divisão celular, podendo levar a célula a morte quando o crescimento suficiente for atingido. Está localizado no cromossomo 10q23.3, região que apresenta um alta taxa de perda de heterozigose em uma variedade de doenças humanas, incluindo cânceres como rim, pulmão, mama e próstata. O gene *PTEN* é frequentemente deletado no câncer (CHEN; CHEN; HE; STILES, 2018; PHIN; MOORE; COTTER, 2013).

No caso da paciente P05 do estudo, foi identificado uma duplicação dos éxons 6 a 9 do *PTEN*. A duplicação no *PTEN* está ausente nos bancos de dados estudados (gnomAD SVs e DGV), sendo que no gnomAD SVs a cobertura média da região é de 30 vezes. Por isso, foi assinalado o critério PM2 para a variante, considerando que os dados populacionais para CNVs ainda são limitados.

A disposição da variante em relação ao transcrito do gene, ou seja, se ela está sendo transcrita em tandem ao transcrito normal, causando uma alteração na leitura e tradução da proteína, é uma informação importante para avaliação de duplicações. No caso deste estudo, não foi possível avaliar se a duplicação está sendo transcrita em tandem a proteína PTEN normal. Porém, outros estudos demonstraram que a maioria, cerca de 80%, das duplicações são transcritas em tandem, e que a minoria restante permanece classificada como VUS por falta dessa informação (NEWMAN; HERMETZ; WECKSELBLATT; RUDD, 2015; RICHARDSON; CHONG; MU; CONNER *et al.*, 2019).

Vale salientar que pela validação por MLPA e de acordo com as especificações da sonda do kit utilizado, a duplicação encontrada no estudo ultrapassa o final do éxon 9 e se estende pela região 3' UTR, porém não está definido a extensão total da duplicação. Esse fato deve ser levado em consideração, pois duplicações que envolvem as regiões UTR dos genes são menos prováveis de causar alterações no produto do gene, em comparação com duplicações intragênicas, que não envolvem o primeiro ou último éxon, ou regiões UTR (BRANDT; SACK; ARJONA; TAN *et al.*, 2020).

Sabemos da necessidade de realizar experimentos futuros para confirmar essa disposição e a extensão total da duplicação, e mais importante, definir se a duplicação está sendo transcrita em tandem de forma que altere o produto da proteína PTEN,

causando a perda da função de uma cópia do gene. Para isso, seria preciso realizar estudos que demonstrem, por diferença de tamanho de fragmento ou sequenciamento de Sanger, se o transcrito está sendo alterado pela duplicação. Essas metodologias já foram realizadas para outros genes em estudos já publicados (CONNER; HERNANDEZ; SOUDERS; LANDRITH *et al.*, 2019; DE ANGELIS DE CARVALHO; NIITSUMA; KOZAK; COSTA *et al.*, 2020).

Duplicações no *PTEN* são associados 2,5 vezes mais a transtornos do espectro autista e atraso de desenvolvimento, em comparação ao câncer (YEHIA; SEYFI; NIESTROJ; PADMANABHAN *et al.*, 2020). No entanto, existem relatos de duplicações em *PTEN* em casos de pacientes com câncer, e com síndromes hereditárias que apresentam um risco aumentado de predisposição ao câncer.

Em dois estudos realizados em pacientes com glioblastoma e tumores oligodendrogliais foram identificadas três duplicações, uma envolvendo os éxons 6, uma dos éxons 7 e 8, e uma do éxon 5 do *PTEN*. Em ambos os estudos não foi elucidado o efeito da duplicação na tumorigênese (BOSTROM; COBBERS; WOLTER; TABATABAI *et al.*, 1998; JEUKEN; NELEN; VERMEER; VAN STAVEREN *et al.*, 2000). Outros estudos relataram duplicações em pacientes com síndromes hereditárias. Dois estudos com pacientes dentro do espectro da síndrome de Cowden identificaram duplicações dos éxons 1 e 6 (NIZIALEK; MESTER; DHIMAN; SMIRAGLIA *et al.*, 2015), e uma duplicação maior dos éxons 1 a 5 (ARADHYA; LEWIS; BONAGA; NWOKEKEH *et al.*, 2012). Um terceiro estudo identificou uma duplicação de novo do promotor e éxon 1 do *PTEN* em uma criança com fenótipos associados a Síndrome do Hamartoma Múltiplo Relacionados ao Gene *PTEN* (MESTER; ENG, 2012). As duplicações identificadas como VCV000584238.2 e VCV000583889.1 foram descritas na ferramenta ClinVar, pelo laboratório Invitae, e classificadas como de significado incerto por falta de informações (CLINVAR).

Para melhor elucidar a etiologia do tumor dessa paciente, que a acometeu em idade precoce e já foi diagnosticado em alto grau, o caso da P05 também foi encaminhado para sequenciamento do material tumoral. Foram identificadas duas variantes provavelmente patogênicas no gene *PTEN*, N262K e R142W. A variante N262K ainda não foi descrita nos bancos de dados estudados ou na literatura, e apresenta resultados conflitantes nos preditores de patogenicidade. A segunda variante, R142W já foi descrita no Cosmic (COSM5122) e no ICGC (MU1964564), e já foi descrito em câncer cervical com frequência de 0,35% (1/289 tumores afetados), e em câncer de endométrio em maior

frequência, 1,88% (10/531 tumores afetados). A variante está presente com incidência baixa na população pelo gnomAD (0.00000398), e apresenta os preditores *in silico* com evidência de patogenicidade (CADD: 32; REVEL: 0,716). A variante já foi descrita em linhagem germinativa de pacientes com síndrome de Cowden (NIZIALEK; MESTER; DHIMAN; SMIRAGLIA *et al.*, 2015) e em famílias com câncer de mama e ovário hereditário (LI; MEEKS; FENG; HEALEY *et al.*, 2016). Foi identificada em um caso de carcinossarcoma de útero, também chamado de tumor mulleriano misto maligno (TMMM) (JONES; STRANSKY; MCCORD; CERAMI *et al.*, 2014).

No câncer de endométrio, R142W já foi relatada diversas vezes. Em um estudo que avaliou a diferença entre a frequência de mutações somáticas em CE pela etnia da mulher, identificou que R142W é uma das variantes mais incidentes em mulheres negras ou afrodescendentes (GUTTERY; BLIGHE; POLYMEROS; SYMONDS *et al.*, 2018). Outros dois estudos relataram a presença da variante em tumores classificados como estáveis para o sistema MMR (MSS) (BILBAO; RODRIGUEZ; RAMIREZ; FALCON *et al.*, 2006; KANAYA; KYO; SAKAGUCHI; MAIDA *et al.*, 2005), o que está de acordo com o caso no estudo.

A incidência de variações no gene *PTEN* em tumores instáveis para o sistema MMR (MSI), quando comparados com tumores MSS, mostra resultados conflitante. Enquanto Bilbao *et al* relatou que em uma casuística de 205 tumores, sendo 164 MSS e 41 MSI, variantes em *PTEN* estavam presentes em 30,5% e 58,5% dos tumores, respectivamente, um resultado que apresentou uma diferença estatística ($p = 0,002$), e esse resultado foi confirmado por outros estudos (BILBAO; RODRIGUEZ; RAMIREZ; FALCON *et al.*, 2006; KOUL; WILLEN; BENDAHL; NILBERT *et al.*, 2002; SALVESEN; STEFANSSON; KRETZSCHMAR; GRUBER *et al.*, 2004). Outros estudos não relatam diferença na incidência de variantes entre os grupos (MUTTER; LIN; FITZGERALD; KUM *et al.*, 2000; ZHOU; KUISMANEN; NYSTROM-LAHTI; PELTOMAKI *et al.*, 2002).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A casuística apresentou características clínicopatológicas em concordância com a literatura. A idade média ao diagnóstico foi de 58,2 anos, e a mediana foi 57 anos, com que apenas seis pacientes foram diagnosticadas antes dos 50 anos. Para as características tumorais, a histologia endometrióide, e tumores de baixo grau (grau I) foram os mais comuns, representando 92,8% e 76,2%, respectivamente. A invasão do miométrio foi encontrada em acordo com o esperado, considerando que a casuística por uma maioria de mulheres com mais de 50 anos, e a idade está associada a tumores mais invasivos em comparação aos limitados ao endométrio. Além disso, foi identificado uma correlação entre idade e a diferença de tumores limitados ao endométrio e invadindo menos da metade do miométrio ($p = 0,0383$), e quando comparado com invasão de mais da metade do miométrio ($p = 0,0090$).

As pacientes apresentaram apenas histórico familiar em 65,4% dos casos, apenas histórico pessoal em 7,7%, e ambos os históricos, pessoal e familiar, em 26,9% dos casos. Histórico familiar de câncer, em que dois ou mais familiares de primeiro e segundo grau foram acometidos por câncer em qualquer idade foi o critério mais atendido (80,8%). Os tumores mais frequentes descritos nos familiares das pacientes do estudo foram mama e intestino, sendo que mama também foi o tumor mais incidente em familiares de primeiro grau foram. Histórico pessoal incluiu diagnóstico em idade precoce e o desenvolvimento de outros cânceres durante a vida, como tireoide, mama e intestino, sendo que ambas características são descritas na literatura como indicativo de indivíduos com alto risco para predisposição ao câncer.

Das 42 pacientes da casuística, 26 mulheres (61,9%) foram classificadas como de alto risco para predisposição, por apresentarem histórico pessoal e familiar de câncer, e 16 pacientes (38,1%) não atenderam a nenhum critério. As mulheres classificadas como de alto risco apresentaram uma idade média ao diagnóstico 7 anos menos que as pacientes classificadas como baixo risco ($p = 0,0572$), sendo 55,5 e 62,7 anos, respectivamente. Além da idade, as demais características tumorais consideradas raras foram encontradas exclusivamente no grupo de pacientes de alto risco, incluindo histologia serosa e mista e diagnóstico em estadiamento avançado (graus III e IV). Também foi observado uma diferença significativa entre o grau arquitetural das células tumorais quando comparado os grupos de alto e baixo risco. Os tumores com grau arquitetural II foram mais encontrados nas pacientes de alto risco quando comparada com grau I ($p = 0,0050$) e com

o grau III ($p = 0,0010$). As demais características clinicopatológicas não apresentaram diferença estatística entre os grupos comparados.

Quanto a análise de variantes germinativas, foram identificadas variantes em 12/26 pacientes (46,1%), sendo que quatro casos apresentaram mais de uma variante. No total, foram anotadas dezoito variantes, todas em heterozigose: três classificadas como patogênicas; e quinze classificadas como variante de significado incerto (VUS), incluindo uma duplicação de éxons no gene *PTEN*. Dentre as variantes patogênicas (*MLH3*:p.S1037*, *MUTYH*:p.G396D e *SEC23B*:p.R550*), este trabalho traz o primeiro relato da variante no gene *MLH3* na literatura, e o primeiro relato da variante em *SEC23B* em associação ao câncer de endométrio. A variante do gene *MUTYH* já foi bem descrita na literatura, principalmente em associação com tumores colorretais e em casos de variantes bialélicas.

As demais variantes classificadas como VUS foram analisadas, porém faltaram informações na literatura e em banco de dados para uma classificação mais elucidativa. A duplicação no gene *PTEN* também não foi relatado na literatura, e por falta de dados complementares, não sendo possível classificar de forma precisa o efeito da variante na tumorigênese e foi então classificada como de significado incerto.

A presença de variantes somáticas em concordância com os genes germinativos em alguns dos casos estudados, indica a possibilidade de que a variante germinativa aumentou o risco para desenvolvimento do câncer, sendo então, considerado como de etiologia hereditária. Nos casos das variantes patogênicas nos genes *MUTYH* e *SEC23B*, e da duplicação no gene *PTEN*, foram identificadas variantes somáticas patogênicas. Porém, devido à baixa cobertura do sequenciamento somático, não foi possível fazer uma afirmação mais definitiva.

Os achados gerais deste trabalho apoiam o conceito que mesmo em casos de câncer de endométrio com tumores classificados como proficientes para o sistema MMR, a investigação genética deve ser realizada em pacientes com histórico pessoal e familiar de câncer. Adicionalmente, o uso dos critérios clínicos propostos para triagem dessas pacientes foi efetivo para selecionar uma parcela significativa de pacientes e famílias que tem recomendação para aconselhamento genético para predisposição ao câncer.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AARNIO, M.; SANKILA, R.; PUKKALA, E.; SALOVAARA, R. *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. **Int J Cancer**, 81, n. 2, p. 214-218, Apr 12 1999.

ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 12, Dec 1 2016.

AL-HEBSHI, N. N.; LI, S.; NASHER, A. T.; EL-SETOUHY, M. *et al.* Exome sequencing of oral squamous cell carcinoma in users of Arabian snuff reveals novel candidates for driver genes. **Int J Cancer**, 139, n. 2, p. 363-372, Jul 15 2016.

ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, 500, n. 7463, p. 415-421, Aug 22 2013.

ALIMONTI, A.; CARRACEDO, A.; CLOHESSY, J. G.; TROTMAN, L. C. *et al.* Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. **Nat Genet**, 42, n. 5, p. 454-458, May 2010.

ANDRADE, R. C.; DOS SANTOS, A. C.; DE AGUIRRE NETO, J. C.; NEVADO, J. *et al.* TP53 and CDKN1A mutation analysis in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes. **Fam Cancer**, 16, n. 2, p. 243-248, Apr 2017.

ANDREWS, S. **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data**. 2010. Disponível em: www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

ARADHYA, S.; LEWIS, R.; BONAGA, T.; NWOKEKEH, N. *et al.* Exon-level array CGH in a large clinical cohort demonstrates increased sensitivity of diagnostic testing for Mendelian disorders. **Genet Med**, 14, n. 6, p. 594-603, Jun 2012.

ASHTON, K. A.; PROIETTO, A.; OTTON, G.; SYMONDS, I. *et al.* Genetic variants in MUTYH are not associated with endometrial cancer risk. **Hered Cancer Clin Pract**, 7, n. 1, p. 3, Jan 26 2009.

AUNE, D.; SEN, A.; VATTEN, L. J. Hypertension and the risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control and cohort studies. **Sci Rep**, 7, p. 44808, Apr 7 2017.

AZZOLLINI, J.; SCUVERA, G.; BRUNO, E.; PASANISI, P. *et al.* Mutation detection rates associated with specific selection criteria for BRCA1/2 testing in 1854 high-risk families: A monocentric Italian study. **Eur J Intern Med**, 32, p. 65-71, Jul 2016.

BAKER, W. D.; SOISSON, A. P.; DODSON, M. K. Endometrial cancer in a 14-year-old girl with Cowden syndrome: a case report. **J Obstet Gynaecol Res**, 39, n. 4, p. 876-878, Apr 2013.

BAKRY, D.; ARONSON, M.; DURNO, C.; RIMAWI, H. *et al.* Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the

constitutional mismatch repair deficiency consortium. **Eur J Cancer**, 50, n. 5, p. 987-996, Mar 2014.

BANNO, K.; KISU, I.; YANOKURA, M.; MASUDA, K. *et al.* Hereditary gynecological tumors associated with Peutz-Jeghers syndrome (Review). **Oncol Lett**, 6, n. 5, p. 1184-1188, Nov 2013.

BARNETSON, R. A.; DEVLIN, L.; MILLER, J.; FARRINGTON, S. M. *et al.* Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. **Clin Genet**, 72, n. 6, p. 551-555, Dec 2007.

BASIL, J. B.; GOODFELLOW, P. J.; RADER, J. S.; MUTCH, D. G. *et al.* Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Cancer**, 89, n. 8, p. 1758-1764, Oct 15 2000.

BAUGH, E. H.; KE, H.; LEVINE, A. J.; BONNEAU, R. A. *et al.* Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? **Cell Death Differ**, 25, n. 1, p. 154-160, Jan 2018.

BEGGS, A. D.; LATCHFORD, A. R.; VASEN, H. F.; MOSLEIN, G. *et al.* Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. **Gut**, 59, n. 7, p. 975-986, Jul 2010.

BEINER, M. E.; FINCH, A.; ROSEN, B.; LUBINSKI, J. *et al.* The risk of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. A prospective study. **Gynecol Oncol**, 104, n. 1, p. 7-10, Jan 2007.

BELL, D. W.; ELLENSON, L. H. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. **Annu Rev Pathol**, 14, p. 339-367, Jan 24 2019.

BELLIDO, F.; PINEDA, M.; AIZA, G.; VALDES-MAS, R. *et al.* POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. **Genet Med**, 18, n. 4, p. 325-332, Apr 2016.

BENNETT, K. L.; MESTER, J.; ENG, C. Germline epigenetic regulation of KILLIN in Cowden and Cowden-like syndrome. **JAMA**, 304, n. 24, p. 2724-2731, Dec 22 2010.

BERGER, A. H.; KNUDSON, A. G.; PANDOLFI, P. P. A continuum model for tumour suppression. **Nature**, 476, n. 7359, p. 163-169, Aug 10 2011.

BHAJEE, F.; BROWN, A. S. Muir-Torre syndrome. **Arch Pathol Lab Med**, 138, n. 12, p. 1685-1689, Dec 2014.

BHARATI, R.; JENKINS, M. A.; LINDOR, N. M.; LE MARCHAND, L. *et al.* Does risk of endometrial cancer for women without a germline mutation in a DNA mismatch repair gene depend on family history of endometrial cancer or colorectal cancer? **Gynecol Oncol**, 133, n. 2, p. 287-292, May 2014.

BIANCHI, P.; FERMO, E.; VERCELLATI, C.; BOSCHETTI, C. *et al.* Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAII) is caused by mutations in the SEC23B gene. **Hum Mutat**, 30, n. 9, p. 1292-1298, Sep 2009.

- BILBAO, C.; RODRIGUEZ, G.; RAMIREZ, R.; FALCON, O. *et al.* The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. **Int J Cancer**, 119, n. 3, p. 563-570, Aug 1 2006.
- BOGANI, G.; LEONE ROBERTI MAGGIORE, U.; RASPAGLIESI, F. Lynch syndrome - Muir-Torre variant: implication in gynecologic oncology. **J Gynecol Oncol**, 29, n. 5, p. e84, Sep 2018.
- BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol**, 15, n. 1, p. 10-17, Feb 1983.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, n. 15, p. 2114-2120, Aug 1 2014.
- BORG, A.; HAILE, R. W.; MALONE, K. E.; CAPANU, M. *et al.* Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study. **Hum Mutat**, 31, n. 3, p. E1200-1240, Mar 2010.
- BOROWSKY, J.; SETIA, N.; ROSTY, C.; CONRAD, R. *et al.* Spectrum of gastrointestinal tract pathology in a multicenter cohort of 43 Cowden syndrome patients. **Mod Pathol**, 32, n. 12, p. 1814-1822, Dec 2019.
- BORUN, P.; DE ROSA, M.; NEDOSZYTKO, B.; WALKOWIAK, J. *et al.* Specific Alu elements involved in a significant percentage of copy number variations of the STK11 gene in patients with Peutz-Jeghers syndrome. **Fam Cancer**, 14, n. 3, p. 455-461, Sep 2015.
- BOSSE, T.; NOUT, R. A.; MCALPINE, J. N.; MCCONECHY, M. K. *et al.* Molecular Classification of Grade 3 Endometrioid Endometrial Cancers Identifies Distinct Prognostic Subgroups. **Am J Surg Pathol**, 42, n. 5, p. 561-568, May 2018.
- BOSTROM, J.; COBBERS, J. M.; WOLTER, M.; TABATABAI, G. *et al.* Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. **Cancer Res**, 58, n. 1, p. 29-33, Jan 1 1998.
- BOUDEAU, J.; SCOTT, J. W.; RESTA, N.; DEAK, M. *et al.* Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. **J Cell Sci**, 117, n. Pt 26, p. 6365-6375, Dec 15 2004.
- BOUGEARD, G.; RENAUX-PETEL, M.; FLAMAN, J. M.; CHARBONNIER, C. *et al.* Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. **J Clin Oncol**, 33, n. 21, p. 2345-2352, Jul 20 2015.
- BRANDT, T.; SACK, L. M.; ARJONA, D.; TAN, D. *et al.* Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants. **Genet Med**, 22, n. 2, p. 336-344, Feb 2020.
- BRAUN, M. M.; OVERBEEK-WAGER, E. A.; GRUMBO, R. J. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. **Am Fam Physician**, 93, n. 6, p. 468-474, Mar 15 2016.

- BROVKINA, O. I.; SHIGAPOVA, L.; CHUDAKOVA, D. A.; GORDIEV, M. G. *et al.* The Ethnic-Specific Spectrum of Germline Nucleotide Variants in DNA Damage Response and Repair Genes in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Patients of Tatar Descent. **Front Oncol**, 8, p. 421, 2018.
- BRUEGL, A. S.; DJORDJEVIC, B.; BATTE, B.; DANIELS, M. *et al.* Evaluation of clinical criteria for the identification of Lynch syndrome among unselected patients with endometrial cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, 7, n. 7, p. 686-697, Jul 2014.
- BUCHANAN, E. M.; WEINSTEIN, L. C.; HILLSON, C. Endometrial cancer. **Am Fam Physician**, 80, n. 10, p. 1075-1080, Nov 15 2009.
- BUCHYNSKA, L. G.; IURCHENKO, N. P.; GLUSHCHENKO, N. M.; NESINA, I. P. Phenotypic features of endometrial tumors in patients with family history of cancer. **Exp Oncol**, 39, n. 4, p. 312-318, Dec 2017.
- BUSH, L.; ARONSON, M.; TABORI, U.; CAMPBELL, B. B. *et al.* Delineating a new feature of constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD) syndrome: breast cancer. **Fam Cancer**, 18, n. 1, p. 105-108, Jan 2019.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, 487, n. 7407, p. 330-337, Jul 18 2012.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK; KANDOTH, C.; SCHULTZ, N.; CHERNIACK, A. D. *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**, 497, n. 7447, p. 67-73, May 2 2013.
- CARRACEDO, A.; ALIMONTI, A.; PANDOLFI, P. P. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? **Cancer Res**, 71, n. 3, p. 629-633, Feb 1 2011.
- CASTELLS, A.; BALAGUER, F.; CASTELLVI-BEL, S.; GONZALO, V. *et al.* Identification of Lynch syndrome: how should we proceed in the 21st century? **World J Gastroenterol**, 13, n. 33, p. 4413-4416, Sep 7 2007.
- CHAKRAVARTY, D.; GAO, J.; PHILLIPS, S. M.; KUNDRA, R. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. **JCO Precis Oncol**, 2017, Jul 2017.
- CHAO, A.; LAI, C. H.; LEE, Y. S.; UENG, S. H. *et al.* Molecular characteristics of endometrial cancer coexisting with peritoneal malignant mesothelioma in Li-Fraumeni-like syndrome. **BMC Cancer**, 15, p. 8, Jan 15 2015.
- CHEN, C.-Y.; CHEN, J.; HE, L.; STILES, B. L. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. **Frontiers in Endocrinology**, 9, n. 338, 2018-July-09 2018. Review.
- CHEN, H. M.; FANG, J. Y. Genetics of the hamartomatous polyposis syndromes: a molecular review. **Int J Colorectal Dis**, 24, n. 8, p. 865-874, Aug 2009.
- CHEN, P. C.; DUDLEY, S.; HAGEN, W.; DIZON, D. *et al.* Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. **Cancer Res**, 65, n. 19, p. 8662-8670, Oct 1 2005.

- CHENG, T. H.; THOMPSON, D. J.; O'MARA, T. A.; PAINTER, J. N. *et al.* Five endometrial cancer risk loci identified through genome-wide association analysis. **Nat Genet**, 48, n. 6, p. 667-674, Jun 2016.
- CHMIEL, N. H.; LIVINGSTON, A. L.; DAVID, S. S. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. **J Mol Biol**, 327, n. 2, p. 431-443, Mar 21 2003.
- CHOMPRET, A.; ABEL, A.; STOPPA-LYONNET, D.; BRUGIERES, L. *et al.* Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet**, 38, n. 1, p. 43-47, Jan 2001.
- CHURCH, D. N.; BRIGGS, S. E.; PALLES, C.; DOMINGO, E. *et al.* DNA polymerase epsilon and delta exonuclease domain mutations in endometrial cancer. **Hum Mol Genet**, 22, n. 14, p. 2820-2828, Jul 15 2013.
- CHURCH, J. M. Polymerase proofreading-associated polyposis: a new, dominantly inherited syndrome of hereditary colorectal cancer predisposition. **Dis Colon Rectum**, 57, n. 3, p. 396-397, Mar 2014.
- CITRON, J. R.; SUTTON, H.; YAMADA, S. D.; MEHTA, N. *et al.* Pathologic stage I-II endometrial carcinoma in the elderly: radiotherapy indications and outcome. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 59, n. 5, p. 1432-1438, Aug 1 2004.
- CLARK, M. B.; MENDERES, G.; AZODI, M.; FINBERG, K. *et al.* Endometrial carcinoma as the presenting malignancy in an 18-year-old patient with Li-Fraumeni syndrome. **Gynecologic Oncology**, 141, n. 1, p. 183-184, 2016.
- CONNER, B. R.; HERNANDEZ, F.; SOUDERS, B.; LANDRITH, T. *et al.* RNA Analysis Identifies Pathogenic Duplications in MSH2 in Patients With Lynch Syndrome. **Gastroenterology**, 156, n. 6, p. 1924-1925 e1924, May 2019.
- COOK, L. S.; NELSON, H. E.; STIDLEY, C. A.; DONG, Y. *et al.* Endometrial cancer and a family history of cancer. **Gynecol Oncol**, 130, n. 2, p. 334-339, Aug 2013.
- CORRADETTI, M. N.; INOKI, K.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. *et al.* Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. **Genes Dev**, 18, n. 13, p. 1533-1538, Jul 1 2004.
- COX, E. C.; DEGNEN, G. E.; SCHEPPE, M. L. Mutator gene studies in Escherichia coli: the mutS gene. **Genetics**, 72, n. 4, p. 551-567, Dec 1972.
- CURIA, M. C.; CATALANO, T.; ACETO, G. M. MUTYH: Not just polyposis. **World J Clin Oncol**, 11, n. 7, p. 428-449, Jul 24 2020.
- D'AGOSTINO, V. G.; MINOPRIO, A.; TORRERI, P.; MARINONI, I. *et al.* Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. **DNA Repair (Amst)**, 9, n. 6, p. 700-707, Jun 4 2010.

- DAIKOKU, T.; HIROTA, Y.; TRANGUCH, S.; JOSHI, A. R. *et al.* Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. **Cancer Res**, 68, n. 14, p. 5619-5627, Jul 15 2008.
- DANIELS, M. S. Genetic testing by cancer site: uterus. **Cancer J**, 18, n. 4, p. 338-342, Jul-Aug 2012.
- DANIELS, M. S.; LU, K. H. Clearer picture of PMS2-associated lynch syndrome is emerging. **J Clin Oncol**, 33, n. 4, p. 299-300, Feb 1 2015.
- DASHTI, S. G.; CHAU, R.; OUAKRIM, D. A.; BUCHANAN, D. D. *et al.* Female Hormonal Factors and the Risk of Endometrial Cancer in Lynch Syndrome. **JAMA**, 314, n. 1, p. 61-71, Jul 7 2015.
- DE ANGELIS DE CARVALHO, N.; NIITSUMA, B. N.; KOZAK, V. N.; COSTA, F. D. *et al.* Clinical and Molecular Assessment of Patients with Lynch Syndrome and Sarcomas Underpinning the Association with MSH2 Germline Pathogenic Variants. **Cancers (Basel)**, 12, n. 7, Jul 9 2020.
- DE LEEUW, W. J.; DIERSSEN, J.; VASEN, H. F.; WIJNEN, J. T. *et al.* Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumours from HNPCC patients. **J Pathol**, 192, n. 3, p. 328-335, Nov 2000.
- DEDES, K. J.; WETTERSKOG, D.; ASHWORTH, A.; KAYE, S. B. *et al.* Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, 8, n. 5, p. 261-271, May 2011.
- DELIMITSOU, A.; FOSTIRA, F.; KALFAKAKOU, D.; APOSTOLOU, P. *et al.* Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. **Hum Mutat**, 40, n. 5, p. 631-648, May 2019.
- DEPRISTO, M. A.; BANKS, E.; POPLIN, R.; GARIMELLA, K. V. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet**, 43, n. 5, p. 491-498, May 2011.
- DESMET, F. O.; HAMROUN, D.; LALANDE, M.; COLLOD-BEROUD, G. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Res**, 37, n. 9, p. e67, May 2009.
- DILLON, J. L.; GONZALEZ, J. L.; DEMARS, L.; BLOCH, K. J. *et al.* Universal screening for Lynch syndrome in endometrial cancers: frequency of germline mutations and identification of patients with Lynch-like syndrome. **Hum Pathol**, 70, p. 121-128, Dec 2017.
- DOLL, A.; ABAL, M.; RIGAU, M.; MONGE, M. *et al.* Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 108, n. 3-5, p. 221-229, Feb 2008.

- DONEHOWER, L. A.; SOUSSI, T.; KORKUT, A.; LIU, Y. *et al.* Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. **Cell Rep**, 28, n. 5, p. 1370-1384 e1375, Jul 30 2019.
- DURATURO, F.; LICCARDO, R.; IZZO, P. Coexistence of MLH3 germline variants in colon cancer patients belonging to families with Lynch syndrome-associated brain tumors. **J Neurooncol**, 129, n. 3, p. 577-578, Sep 2016.
- DURNO, C. A.; ARONSON, M.; TABORI, U.; MALKIN, D. *et al.* Oncologic surveillance for subjects with biallelic mismatch repair gene mutations: 10 year follow-up of a kindred. **Pediatr Blood Cancer**, 59, n. 4, p. 652-656, Oct 2012.
- EASTON, D. F.; PHAROAH, P. D.; ANTONIOU, A. C.; TISCHKOWITZ, M. *et al.* Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. **N Engl J Med**, 372, n. 23, p. 2243-2257, Jun 4 2015.
- EDEY, K. A.; RUNDLE, S.; HICKEY, M. Hormone replacement therapy for women previously treated for endometrial cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, 5, p. CD008830, May 15 2018.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet**, 5, n. 6, p. 435-445, Jun 2004.
- ENG, C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. **J Med Genet**, 37, n. 11, p. 828-830, Nov 2000.
- FAROOQ, A.; WALKER, L. J.; BOWLING, J.; AUDISIO, R. A. Cowden syndrome. **Cancer Treat Rev**, 36, n. 8, p. 577-583, Dec 2010.
- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr 15 2019.
- FREBOURG, T.; BAJALICA LAGERCRANTZ, S.; OLIVEIRA, C.; MAGENHEIM, R. *et al.* Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. **Eur J Hum Genet**, 28, n. 10, p. 1379-1386, Oct 2020.
- FUNAMOTO, S.; MEILI, R.; LEE, S.; PARRY, L. *et al.* Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. **Cell**, 109, n. 5, p. 611-623, May 31 2002.
- GAMMON, A.; JASPERSON, K.; CHAMPINE, M. Genetic basis of Cowden syndrome and its implications for clinical practice and risk management. **Appl Clin Genet**, 9, p. 83-92, 2016.
- GAROFOLA, C.; JAMAL, Z.; GROSS, G. P. Cowden Disease. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2020.
- GARRE, P.; BRICENO, V.; XICOLA, R. M.; DOYLE, B. J. *et al.* Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC). **Clin Cancer Res**, 17, n. 7, p. 1701-1712, Apr 1 2011.

- GHANBARI ANDARIEH, M.; AGAJANI DELAVAR, M.; MOSLEMI, D.; ESMAEILZADEH, S. Risk Factors for Endometrial Cancer: Results from a Hospital-Based Case-Control Study. **Asian Pac J Cancer Prev**, 17, n. 10, p. 4791-4796, Oct 1 2016.
- GIARDIELLO, F. M.; BRENSINGER, J. D.; TERSMETTE, A. C.; GOODMAN, S. N. *et al.* Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. **Gastroenterology**, 119, n. 6, p. 1447-1453, Dec 2000.
- GRUBER, S. B.; THOMPSON, W. D. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 5, n. 6, p. 411-417, Jun 1996.
- GUHA, T.; MALKIN, D. Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 7, n. 4, Apr 3 2017.
- GUIMARAES, D. P.; HAINAUT, P. TP53: a key gene in human cancer. **Biochimie**, 84, n. 1, p. 83-93, Jan 2002.
- GUTTERY, D. S.; BLIGHE, K.; POLYMEROS, K.; SYMONDS, R. P. *et al.* Racial differences in endometrial cancer molecular portraits in The Cancer Genome Atlas. **Oncotarget**, 9, n. 24, p. 17093-17103, Mar 30 2018.
- HAG-YAHIA, N.; GEMER, O.; EITAN, R.; RABAN, O. *et al.* Age is an independent predictor of outcome in endometrial cancer patients: an Israeli Gynecology Oncology Group cohort study. **Acta Obstet Gynecol Scand**, Oct 8 2020.
- HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J. E. *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, 250, n. 4988, p. 1684-1689, Dec 21 1990.
- HAMPEL, H.; FRANKEL, W.; PANESCU, J.; LOCKMAN, J. *et al.* Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. **Cancer Res**, 66, n. 15, p. 7810-7817, Aug 1 2006.
- HAMZAOU, N.; ALARCON, F.; LEULLIOT, N.; GUIMBAUD, R. *et al.* Genetic, structural, and functional characterization of POLE polymerase proofreading variants allows cancer risk prediction. **Genet Med**, 22, n. 9, p. 1533-1541, Sep 2020.
- HAN, G.; SOSLOW, R. A.; WETHINGTON, S.; LEVINE, D. A. *et al.* Endometrial Carcinomas With Clear Cells: A Study of a Heterogeneous Group of Tumors Including Interobserver Variability, Mutation Analysis, and Immunohistochemistry With HNF-1beta. **Int J Gynecol Pathol**, 34, n. 4, p. 323-333, Jul 2015.
- HANSEN, M. F.; JOHANSEN, J.; BJORNEVOLL, I.; SYLVANDER, A. E. *et al.* A novel POLE mutation associated with cancers of colon, pancreas, ovaries and small intestine. **Fam Cancer**, 14, n. 3, p. 437-448, Sep 2015.
- HARADHVALA, N. J.; POLAK, P.; STOJANOV, P.; COVINGTON, K. R. *et al.* Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. **Cell**, 164, n. 3, p. 538-549, Jan 28 2016.

- HARIRI, N.; QARMALI, M.; FADARE, O. Endometrial Serous Carcinoma With Clear-Cell Change: Frequency and Immunohistochemical Analysis. **Int J Surg Pathol**, 26, n. 2, p. 126-134, Apr 2018.
- HE, J.; OUYANG, W.; ZHAO, W.; SHAO, L. *et al.* Distinctive genomic characteristics in POLE/POLD1-mutant cancers can potentially predict beneficial clinical outcomes in patients who receive immune checkpoint inhibitor. **Ann Transl Med**, 9, n. 2, p. 129, Jan 2021.
- HE, Y.; TAO, X.; HUANG, F.; JIA, N. *et al.* Clinicopathologic features of endometrial cancer in Chinese patients younger than 50 years with a family history of cancer. **Medicine (Baltimore)**, 97, n. 43, p. e12968, Oct 2018.
- HEARLE, N.; SCHUMACHER, V.; MENKO, F. H.; OLSCHWANG, S. *et al.* Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. **Clin Cancer Res**, 12, n. 10, p. 3209-3215, May 15 2006.
- HENDRIKS, Y. M.; WAGNER, A.; MORREAU, H.; MENKO, F. *et al.* Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. **Gastroenterology**, 127, n. 1, p. 17-25, Jul 2004.
- HENN, J.; SPIER, I.; ADAM, R. S.; HOLZAPFEL, S. *et al.* Diagnostic yield and clinical utility of a comprehensive gene panel for hereditary tumor syndromes. **Hered Cancer Clin Pract**, 17, p. 5, 2019.
- HOANG, L. N.; LEE, Y. S.; KARNEZIS, A. N.; TESSIER-CLOUTIER, B. *et al.* Immunophenotypic features of dedifferentiated endometrial carcinoma - insights from BRG1/INI1-deficient tumours. **Histopathology**, 69, n. 4, p. 560-569, Oct 2016.
- HODGSON, S. V. Molecular mechanisms in cancer susceptibility—lessons from inherited cancers. *In*: KUMAR, D. (Ed.). **Clinical Molecular Medicine**: Academic Press, 2020. cap. Chapter 24, p. 423-436.
- HOLLANDER, M. C.; BLUMENTHAL, G. M.; DENNIS, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. **Nat Rev Cancer**, 11, n. 4, p. 289-301, Apr 2011.
- HONG, S. N. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. **Intest Res**, 16, n. 3, p. 327-337, Jul 2018.
- HSIEH, P.; ZHANG, Y. The Devil is in the details for DNA mismatch repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 14, p. 3552-3554, Apr 4 2017.
- HUANG, K. L.; MASHI, R. J.; WU, Y.; RITTER, D. I. *et al.* Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. **Cell**, 173, n. 2, p. 355-370 e314, Apr 5 2018.
- HUANG, Y.; LI, G. M. DNA mismatch repair preferentially safeguards actively transcribed genes. **DNA Repair (Amst)**, 71, p. 82-86, Nov 2018.
- HUSSEIN, Y. R.; SOSLOW, R. A. Molecular insights into the classification of high-grade endometrial carcinoma. **Pathology**, 50, n. 2, p. 151-161, Feb 2018.

- HUSSEIN, Y. R.; WEIGELT, B.; LEVINE, D. A.; SCHOOLMEESTER, J. K. *et al.* Clinicopathological analysis of endometrial carcinomas harboring somatic POLE exonuclease domain mutations. **Mod Pathol**, 28, n. 4, p. 505-514, Apr 2015.
- HUTCHCRAFT, M. L.; GALLION, H. H.; KOLESAR, J. M. MUTYH as an Emerging Predictive Biomarker in Ovarian Cancer. **Diagnostics (Basel)**, 11, n. 1, Jan 6 2021.
- ICGC/TCGA, Pan-Cancer Analysis Of Whole Genomes. Pan-cancer analysis of whole genomes. **Nature**, 578, n. 7793, p. 82-93, Feb 2020.
- IDIKIO, H. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. **Int J Clin Exp Pathol**, 3, n. 2, p. 169-176, Nov 25 2009.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva, 2019. 120 p. 978-85-7318-389-4.
- IOANNIDIS, N. M.; ROTHSTEIN, J. H.; PEJAVER, V.; MIDDHA, S. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. **Am J Hum Genet**, 99, n. 4, p. 877-885, Oct 6 2016.
- IOLASCON, A.; RUSSO, R.; ESPOSITO, M. R.; ASCI, R. *et al.* Molecular analysis of 42 patients with congenital dyserythropoietic anemia type II: new mutations in the SEC23B gene and a search for a genotype-phenotype relationship. **Haematologica**, 95, n. 5, p. 708-715, May 2010.
- ISAACSSON VELHO, P.; SILBERSTEIN, J. L.; MARKOWSKI, M. C.; LUO, J. *et al.* Intraductal/ductal histology and lymphovascular invasion are associated with germline DNA-repair gene mutations in prostate cancer. **Prostate**, 78, n. 5, p. 401-407, Apr 2018.
- ISLAM, M. J.; KHAN, A. M.; PARVES, M. R.; HOSSAIN, M. N. *et al.* Prediction of Deleterious Non-synonymous SNPs of Human STK11 Gene by Combining Algorithms, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 16426, Nov 11 2019.
- IYER, R. R.; PLUCIENNIK, A.; BURDETT, V.; MODRICH, P. L. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem Rev**, 106, n. 2, p. 302-323, Feb 2006.
- JEUKEN, J. W.; NELEN, M. R.; VERMEER, H.; VAN STAVEREN, W. C. *et al.* PTEN mutation analysis in two genetic subtypes of high-grade oligodendroglial tumors. PTEN is only occasionally mutated in one of the two genetic subtypes. **Cancer Genet Cytogenet**, 119, n. 1, p. 42-47, May 2000.
- JIA, X.; YANG, L.; XU, P.; LI, N. *et al.* Endometrial cancer combined with polycystic ovary syndrome in 9 women under 40-years old: A case report. **Biomed Rep**, 13, n. 5, p. 50, Nov 2020.
- JIA, Y.; GUO, M. Epigenetic changes in colorectal cancer. **Chin J Cancer**, 32, n. 1, p. 21-30, Jan 2013.

- JING, J. C.; WANG, B.; LIU, P. J. The Functional Role of SEC23 in Vesicle Transportation, Autophagy and Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 15, n. 11, p. 2419-2426, 2019.
- JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7, n. 5, p. 335-346, May 2006.
- JOHN, A. M.; SCHWARTZ, R. A. Muir-Torre syndrome (MTS): An update and approach to diagnosis and management. **J Am Acad Dermatol**, 74, n. 3, p. 558-566, Mar 2016.
- JOHNATTY, S. E.; TAN, Y. Y.; BUCHANAN, D. D.; BOWMAN, M. *et al.* Family history of cancer predicts endometrial cancer risk independently of Lynch Syndrome: Implications for genetic counselling. **Gynecol Oncol**, 147, n. 2, p. 381-387, Nov 2017.
- JONES, N.; VOGT, S.; NIELSEN, M.; CHRISTIAN, D. *et al.* Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. **Gastroenterology**, 137, n. 2, p. 489-494, 494 e481; quiz 725-486, Aug 2009.
- JONES, S.; STRANSKY, N.; MCCORD, C. L.; CERAMI, E. *et al.* Genomic analyses of gynaecologic carcinosarcomas reveal frequent mutations in chromatin remodelling genes. **Nat Commun**, 5, p. 5006, Sep 19 2014.
- JUN, S. H.; KIM, T. G.; BAN, C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. **FEBS J**, 273, n. 8, p. 1609-1619, Apr 2006.
- KADAN, Y.; RAVIV, O.; SEGEV, Y.; LAVIE, O. *et al.* Impact of BRCA mutations on outcomes among patients with serous endometrial cancer. **Int J Gynaecol Obstet**, 142, n. 1, p. 91-96, Jul 2018.
- KAHN, R. M.; GORDHANDAS, S.; MADDY, B. P.; BALTICH NELSON, B. *et al.* Universal endometrial cancer tumor typing: How much has immunohistochemistry, microsatellite instability, and MLH1 methylation improved the diagnosis of Lynch syndrome across the population? **Cancer**, 125, n. 18, p. 3172-3183, Sep 15 2019.
- KAMIHARA, J.; RANA, H. Q.; GARBER, J. E. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat**, 35, n. 6, p. 654-662, Jun 2014.
- KANAYA, T.; KYO, S.; SAKAGUCHI, J.; MAIDA, Y. *et al.* Association of mismatch repair deficiency with PTEN frameshift mutations in endometrial cancers and the precursors in a Japanese population. **Am J Clin Pathol**, 124, n. 1, p. 89-96, Jul 2005.
- KANDOTH, C.; SCHULTZ, N.; CHERNIACK, A. D.; AKBANI, R. *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**, 497, n. 7447, p. 67-73, May 2 2013.
- KARCZEWSKI, K. J.; FRANCIOLI, L. C.; TIAO, G.; CUMMINGS, B. B. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, 581, n. 7809, p. 434-443, May 2020.

- KATO, A.; SATO, N.; SUGAWARA, T.; TAKAHASHI, K. *et al.* Isolated Loss of PMS2 Immunohistochemical Expression is Frequently Caused by Heterogenous MLH1 Promoter Hypermethylation in Lynch Syndrome Screening for Endometrial Cancer Patients. **Am J Surg Pathol**, 40, n. 6, p. 770-776, Jun 2016.
- KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; ROSKIN, K. M. *et al.* The human genome browser at UCSC. **Genome Res**, 12, n. 6, p. 996-1006, Jun 2002.
- KIRCHER, M.; WITTEN, D. M.; JAIN, P.; O'ROAK, B. J. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. **Nat Genet**, 46, n. 3, p. 310-315, Mar 2014.
- KLEIBLOVA, P.; STOLAROVA, L.; KRIZOVA, K.; LHOTA, F. *et al.* Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. **Int J Cancer**, 145, n. 7, p. 1782-1797, Oct 1 2019.
- KOBAYASHI, H.; OHNO, S.; SASAKI, Y.; MATSUURA, M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). **Oncol Rep**, 30, n. 3, p. 1019-1029, Sep 2013.
- KOLODNER, R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. **Genes Dev**, 10, n. 12, p. 1433-1442, Jun 15 1996.
- KOMINE, K.; SHIMODAIRA, H.; TAKAO, M.; SOEDA, H. *et al.* Functional Complementation Assay for 47 MUTYH Variants in a MutY-Disrupted Escherichia coli Strain. **Hum Mutat**, 36, n. 7, p. 704-711, Jul 2015.
- KOPACOVA, M.; TACHECI, I.; REJCHRT, S.; BURES, J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. **World J Gastroenterol**, 15, n. 43, p. 5397-5408, Nov 21 2009.
- KOPANOS, C.; TSIOLKAS, V.; KOURIS, A.; CHAPPLE, C. E. *et al.* VarSome: the human genomic variant search engine. **Bioinformatics**, 35, n. 11, p. 1978-1980, Jun 1 2019.
- KORHONEN, M. K.; VUORENMAA, E.; NYSTROM, M. The first functional study of MLH3 mutations found in cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer**, 47, n. 9, p. 803-809, Sep 2008.
- KOUL, A.; WILLEN, R.; BENDAHL, P. O.; NILBERT, M. *et al.* Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. **Cancer**, 94, n. 9, p. 2369-2379, May 1 2002.
- KRAEMER, D.; AZZARELLO-BURRI, S.; STEINDL, K.; BOONSAWAT, P. *et al.* Prevalence of genetic susceptibility for breast and ovarian cancer in a non-cancer related study population: secondary germline findings from a Swiss single centre cohort. **Swiss Med Wkly**, 149, p. w20092, Aug 12 2019.
- KRATZ, C. P.; ACHATZ, M. I.; BRUGIERES, L.; FREBOURG, T. *et al.* Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. **Clin Cancer Res**, 23, n. 11, p. e38-e45, Jun 1 2017.

- KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 16, n. 7, p. 393-405, Jul 2015.
- KUHN, E.; WU, R. C.; GUAN, B.; WU, G. *et al.* Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 19, p. 1503-1513, Oct 3 2012.
- KUIPER, R. P.; LIGTENBERG, M. J.; HOOGERBRUGGE, N.; GEURTS VAN KESSEL, A. Germline copy number variation and cancer risk. **Curr Opin Genet Dev**, 20, n. 3, p. 282-289, Jun 2010.
- KUNO, T.; MATSUBARA, N.; TSUDA, S.; KOBAYASHI, M. *et al.* Alterations of the base excision repair gene MUTYH in sporadic colorectal cancer. **Oncol Rep**, 28, n. 2, p. 473-480, Aug 2012.
- LACHANCE, J. A.; EVERETT, E. N.; GREER, B.; MANDEL, L. *et al.* The effect of age on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, 101, n. 3, p. 470-475, Jun 2006.
- LANCASTER, J. M.; POWELL, C. B.; KAUFF, N. D.; CASS, I. *et al.* Society of Gynecologic Oncologists Education Committee statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. **Gynecol Oncol**, 107, n. 2, p. 159-162, Nov 2007.
- LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, 358, n. 6381, p. 15-16, Jul 2 1992.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, 9, n. 4, p. 357-359, Mar 4 2012.
- LATCHFORD, A.; COHEN, S.; AUTH, M.; SCAILLON, M. *et al.* Management of Peutz-Jeghers Syndrome in Children and Adolescents: A Position Paper From the ESPGHAN Polyposis Working Group. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 68, n. 3, p. 442-452, Mar 2019.
- LEE, M.; PIAO, J.; JEON, M. J. Risk Factors Associated with Endometrial Pathology in Premenopausal Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. **Yonsei Med J**, 61, n. 4, p. 317-322, Apr 2020.
- LEE, Y. C.; MILNE, R. L.; LHEUREUX, S.; FRIEDLANDER, M. *et al.* Risk of uterine cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Eur J Cancer**, 84, p. 114-120, Oct 2017.
- LEE, Y. R.; CHEN, M.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 9, p. 547-562, Sep 2018.
- LEENDERS, E.; WESTDORP, H.; BRUGGEMANN, R. J.; LOEFFEN, J. *et al.* Cancer prevention by aspirin in children with Constitutional Mismatch Repair Deficiency (CMMRD). **Eur J Hum Genet**, 26, n. 10, p. 1417-1423, Oct 2018.

- LI, C. G.; JIN, P.; YANG, L.; ZANG, W. C. *et al.* Germline mutations in patients with multiple colorectal polyps in China. **J Gastroenterol Hepatol**, 32, n. 10, p. 1723-1729, Oct 2017.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F., Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst**, 43, n. 6, p. 1365-1373, Dec 1969a.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F., Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med**, 71, n. 4, p. 747-752, Oct 1969b.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F., Jr.; MULVIHILL, J. J.; BLATTNER, W. A. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res**, 48, n. 18, p. 5358-5362, Sep 15 1988.
- LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res**, 18, n. 1, p. 85-98, Jan 2008.
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, 25, n. 16, p. 2078-2079, Aug 15 2009.
- LI, J.; MEEKS, H.; FENG, B. J.; HEALEY, S. *et al.* Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. **J Med Genet**, 53, n. 1, p. 34-42, Jan 2016.
- LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annu Rev Physiol**, 75, p. 225-240, 2013.
- LIAW, D.; MARSH, D. J.; LI, J.; DAHIA, P. L. *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. **Nat Genet**, 16, n. 1, p. 64-67, May 1997.
- LIN-MARQ, N.; BOREL, C.; ANTONARAKIS, S. E. Peutz-Jeghers LKB1 mutants fail to activate GSK-3beta, preventing it from inhibiting Wnt signaling. **Mol Genet Genomics**, 273, n. 2, p. 184-196, Apr 2005.
- LIN, F.; CHEN, Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. **Arch Pathol Lab Med**, 138, n. 12, p. 1564-1577, Dec 2014.
- LINDEBOOM, R. G.; SUPEK, F.; LEHNER, B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. **Nat Genet**, 48, n. 10, p. 1112-1118, Oct 2016.
- LIU, D.; KEIJZERS, G.; RASMUSSEN, L. J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. **Mutat Res**, 773, p. 174-187, Jul 2017.
- LLOYD, K. M., 2nd; DENNIS, M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. **Ann Intern Med**, 58, p. 136-142, Jan 1963.

- LONG, B.; LILYQUIST, J.; WEAVER, A.; HU, C. *et al.* Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, 152, n. 1, p. 20-25, Jan 2019.
- LORCA, V.; RUEDA, D.; MARTIN-MORALES, L.; FERNANDEZ-ACENERO, M. J. *et al.* Contribution of New Adenomatous Polyposis Predisposition Genes in an Unexplained Attenuated Spanish Cohort by Multigene Panel Testing. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 9814, Jul 8 2019.
- LUCENTEFORTE, E.; TALAMINI, R.; MONTELLA, M.; DAL MASO, L. *et al.* Family history of cancer and the risk of endometrial cancer. **Eur J Cancer Prev**, 18, n. 2, p. 95-99, Apr 2009.
- LUMISH, H. S.; STEINFELD, H.; KOVAL, C.; RUSSO, D. *et al.* Impact of Panel Gene Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer on Patients. **J Genet Couns**, 26, n. 5, p. 1116-1129, Oct 2017.
- LUO, J.; BERESFORD, S.; CHEN, C.; CHLEBOWSKI, R. *et al.* Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. **Br J Cancer**, 111, n. 7, p. 1432-1439, Sep 23 2014.
- LYNCH, H. T.; SNYDER, C. L.; SHAW, T. G.; HEINEN, C. D. *et al.* Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 3, p. 181-194, Mar 2015.
- MACDONALD, J. R.; ZIMAN, R.; YUEN, R. K.; FEUK, L. *et al.* The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic Acids Res**, 42, n. Database issue, p. D986-992, Jan 2014.
- MACHACKOVA, E.; CLAES, K.; MIKOVA, M.; HAZOVA, J. *et al.* Twenty Years of BRCA1 and BRCA2 Molecular Analysis at MMCI - Current Developments for the Classification of Variants. **Klin Onkol**, 32, n. Supplementum2, p. 51-71, Summer 2019.
- MAI, P. L.; BEST, A. F.; PETERS, J. A.; DECASTRO, R. M. *et al.* Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. **Cancer**, 122, n. 23, p. 3673-3681, Dec 1 2016.
- MALANEY, P.; UVERSKY, V. N.; DAVE, V. PTEN proteoforms in biology and disease. **Cell Mol Life Sci**, 74, n. 15, p. 2783-2794, Aug 2017.
- MARCEL, V.; FERNANDES, K.; TERRIER, O.; LANE, D. P. *et al.* Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. **Cell Death Differ**, 21, n. 9, p. 1377-1387, Sep 2014.
- MARTIN-LOPEZ, J. V.; FISHEL, R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. **Fam Cancer**, 12, n. 2, p. 159-168, Jun 2013.
- MCALPINE, J. N.; TEMKIN, S. M.; MACKAY, H. J. Endometrial cancer: Not your grandmother's cancer. **Cancer**, 122, n. 18, p. 2787-2798, Sep 15 2016.

- MCDUGAL, M.; NAIR-FAIRLESS, P.; WEISS, T.; DAO, E. *et al.* Practice patterns and results of tumor and germline genetic evaluation of women with endometrial cancer in south Louisiana. **Gynecol Oncol Rep**, 36, p. 100717, May 2021.
- MCGARRITY, T. J.; AMOS, C. Peutz-Jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. **Cell Mol Life Sci**, 63, n. 18, p. 2135-2144, Sep 2006.
- MCKENNA, A.; HANNA, M.; BANKS, E.; SIVACHENKO, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Res**, 20, n. 9, p. 1297-1303, Sep 2010.
- MCLAREN, W.; GIL, L.; HUNT, S. E.; RIAT, H. S. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biol**, 17, n. 1, p. 122, Jun 6 2016.
- MENG, H.; JIANG, X.; CUI, J.; YIN, G. *et al.* Genomic Analysis Reveals Novel Specific Metastatic Mutations in Chinese Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Biomed Res Int**, 2020, p. 2495157, 2020.
- MESTER, J.; ENG, C. Estimate of de novo mutation frequency in probands with PTEN hamartoma tumor syndrome. **Genet Med**, 14, n. 9, p. 819-822, Sep 2012.
- MESTER, J.; ENG, C. Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. **J Surg Oncol**, 111, n. 1, p. 125-130, Jan 2015.
- MEYER, L. A.; BROADDUS, R. R.; LU, K. H. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. **Cancer Control**, 16, n. 1, p. 14-22, Jan 2009.
- MILLER, M.; SHIROLE, N.; TIAN, R.; PAL, D. *et al.* The Evolution of TP53 Mutations: From Loss-of-Function to Separation-of-Function Mutants. **J Cancer Biol Res**, 4, n. 4, 2016.
- MIYOSHI, H.; NAKAU, M.; ISHIKAWA, T. O.; SELDIN, M. F. *et al.* Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. **Cancer Res**, 62, n. 8, p. 2261-2266, Apr 15 2002.
- MODRICH, P.; LAHUE, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. **Annu Rev Biochem**, 65, p. 101-133, 1996.
- MOLATORE, S.; RUSSO, M. T.; D'AGOSTINO, V. G.; BARONE, F. *et al.* MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay. **Hum Mutat**, 31, n. 2, p. 159-166, Feb 2010.
- MOORE, K. N.; FADER, A. N. Uterine papillary serous carcinoma. **Clin Obstet Gynecol**, 54, n. 2, p. 278-291, Jun 2011.
- MORAK, M.; LANER, A.; BACHER, U.; KEILING, C. *et al.* MUTYH-associated polyposis - variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations. **Clin Genet**, 78, n. 4, p. 353-363, Oct 2010.

- MORAK, M.; MASSDORF, T.; SYKORA, H.; KERSCHER, M. *et al.* First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes. **Eur J Cancer**, 47, n. 7, p. 1046-1055, May 2011.
- MORSE, C. B.; GARCIA, R. L.; CALHOUN, K. E.; SWISHER, E. M. Premalignant alterations in breast and endometrium associated with a PTEN mutation in a woman with Cowden syndrome: implications for preventive care. **Gynecol Oncol Rep**, 12, p. 13-16, Apr 2015.
- MUGGIA, F.; SAFRA, T. 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. **Anticancer Res**, 34, n. 2, p. 551-556, Feb 2014.
- MUIR, E. G.; BELL, A. J.; BARLOW, K. A. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. **Br J Surg**, 54, n. 3, p. 191-195, Mar 1967.
- MUKHERJEE, S.; RIDGEWAY, A. D.; LAMB, D. J. DNA mismatch repair and infertility. **Curr Opin Urol**, 20, n. 6, p. 525-532, Nov 2010.
- MUR, P.; GARCIA-MULERO, S.; DEL VALLE, J.; MAGRANER-PARDO, L. *et al.* Role of POLE and POLD1 in familial cancer. **Genet Med**, 22, n. 12, p. 2089-2100, Dec 2020.
- MUTTER, G. L.; LIN, M. C.; FITZGERALD, J. T.; KUM, J. B. *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst**, 92, n. 11, p. 924-930, Jun 7 2000.
- NAGTEGAAL, I. D.; ODZE, R. D.; KLIMSTRA, D.; PARADIS, V. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. **Histopathology**, 76, n. 2, p. 182-188, Jan 2020.
- NASLAVSKY, M. S.; YAMAMOTO, G. L.; DE ALMEIDA, T. F.; EZQUINA, S. A. M. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat**, 38, n. 7, p. 751-763, Jul 2017.
- NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Clinical practice guidelines in Oncology (Version 1.2020)**. 2020. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf. Acesso em: 11 February 2021.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **ClinVar**; [VCV000584238.2], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000584238.2> (Acesso em: 1º de Abril de 2020).
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **ClinVar**; [VCV000583889.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000584238.2> (Acesso em: 1º de Abril de 2020).
- NAVI, D.; WADHERA, A.; FUNG, M. A.; FAZEL, N. Muir-Torre syndrome. **Dermatol Online J**, 12, n. 5, p. 4, Sep 8 2006.

- NELSON, H. D.; PAPPAS, M.; ZAKHER, B.; MITCHELL, J. P. *et al.* Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive Services Task Force recommendation. **Ann Intern Med**, 160, n. 4, p. 255-266, Feb 18 2014.
- NEWMAN, S.; HERMETZ, K. E.; WECKSELBLATT, B.; RUDD, M. K. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. **Am J Hum Genet**, 96, n. 2, p. 208-220, Feb 5 2015.
- NGUYEN, A.; BOUGEARD, G.; KOOB, M.; CHENARD, M. P. *et al.* MSI detection and its pitfalls in CMMRD syndrome in a family with a bi-allelic MLH1 mutation. **Fam Cancer**, 15, n. 4, p. 571-577, Oct 2016.
- NI, Y.; HE, X.; CHEN, J.; MOLINE, J. *et al.* Germline SDHx variants modify breast and thyroid cancer risks in Cowden and Cowden-like syndrome via FAD/NAD-dependant destabilization of p53. **Hum Mol Genet**, 21, n. 2, p. 300-310, Jan 15 2012.
- NIELSEN, M.; JOERINK-VAN DE BELD, M. C.; JONES, N.; VOGT, S. *et al.* Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. **Gastroenterology**, 136, n. 2, p. 471-476, Feb 2009.
- NIZIALEK, E. A.; MESTER, J. L.; DHIMAN, V. K.; SMIRAGLIA, D. J. *et al.* KLLN epigenotype-phenotype associations in Cowden syndrome. **Eur J Hum Genet**, 23, n. 11, p. 1538-1543, Nov 2015.
- OKA, E.; SAKAI, K.; YAMAGAMI, W.; HIRANO, T. *et al.* Atypical vessels in hysteroscopy: Usefulness in prediction of malignant diseases in patients treated with tamoxifen. **J Obstet Gynaecol Res**, Jan 31 2021.
- OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2, n. 1, p. a001008, Jan 2010.
- OLSON, J. E.; SELLERS, T. A.; ANDERSON, K. E.; FOLSOM, A. R. Does a family history of cancer increase the risk for postmenopausal endometrial carcinoma? A prospective cohort study and a nested case-control family study of older women. **Cancer**, 85, n. 11, p. 2444-2449, Jun 1 1999.
- ORLOFF, M. S.; HE, X.; PETERSON, C.; CHEN, F. *et al.* Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. **Am J Hum Genet**, 92, n. 1, p. 76-80, Jan 10 2013.
- PAGLIA, L. L.; LAUGE, A.; WEBER, J.; CHAMP, J. *et al.* ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. **Breast Cancer Res Treat**, 119, n. 2, p. 443-452, Jan 2010.
- PALLES, C.; CAZIER, J. B.; HOWARTH, K. M.; DOMINGO, E. *et al.* Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. **Nat Genet**, 45, n. 2, p. 136-144, Feb 2013.

- PARK, V. S.; PURSELL, Z. F. POLE proofreading defects: Contributions to mutagenesis and cancer. **DNA Repair (Amst)**, 76, p. 50-59, Apr 2019.
- PARSLOV, M.; LIDEGAARD, O.; KLINTORP, S.; PEDERSEN, B. *et al.* Risk factors among young women with endometrial cancer: A Danish case-control study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 182, n. 1, p. 23-29, Jan 2000.
- PECORELLI, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **Int J Gynaecol Obstet**, 105, n. 2, p. 103-104, May 2009.
- PELLERIN, G. P.; FINAN, M. A. Endometrial cancer in women 45 years of age or younger: a clinicopathological analysis. **Am J Obstet Gynecol**, 193, n. 5, p. 1640-1644, Nov 2005.
- PELTTARI, L. M.; SHIMELIS, H.; TOIMINEN, H.; KVIST, A. *et al.* Gene-panel testing of breast and ovarian cancer patients identifies a recurrent RAD51C duplication. **Clin Genet**, 93, n. 3, p. 595-602, Mar 2018.
- PENNINGTON, K. P.; WALSH, T.; LEE, M.; PENNIL, C. *et al.* BRCA1, TP53, and CHEK2 germline mutations in uterine serous carcinoma. **Cancer**, 119, n. 2, p. 332-338, Jan 15 2013.
- PETITJEAN, A.; ACHATZ, M. I.; BORRESEN-DALE, A. L.; HAINAUT, P. *et al.* TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, 26, n. 15, p. 2157-2165, Apr 2 2007.
- PEUTZ, J. L. A. Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentation of skin and mucous membrane. **Ned Maandschr Geneeskd**, 10, p. 134-146, 1921 1921.
- PFEFFER, C. M.; HO, B. N.; SINGH, A. T. K. The Evolution, Functions and Applications of the Breast Cancer Genes BRCA1 and BRCA2. **Cancer Genomics Proteomics**, 14, n. 5, p. 293-298, Sep-Oct 2017.
- PHIN, S.; MOORE, M. W.; COTTER, P. D. Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer. **Front Oncol**, 3, p. 240, Sep 17 2013.
- Picard Toolkit**. Broad Institute, GitHub repository, 2019. Disponível em: <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
- PILARSKI, R.; BURT, R.; KOHLMAN, W.; PHO, L. *et al.* Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. **J Natl Cancer Inst**, 105, n. 21, p. 1607-1616, Nov 6 2013.
- PITROSKI, C. E.; COSSIO, S. L.; KOEHLER-SANTOS, P.; GRAUDENZ, M. *et al.* Frequency of the common germline MUTYH mutations p.G396D and p.Y179C in patients diagnosed with colorectal cancer in Southern Brazil. **Int J Colorectal Dis**, 26, n. 7, p. 841-846, Jul 2011.
- PIULATS, J. M.; GUERRA, E.; GIL-MARTIN, M.; ROMAN-CANAL, B. *et al.* Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol**, 145, n. 1, p. 200-207, Apr 2017.

- PONTI, G.; LOSI, L.; PEDRONI, M.; LUCCI-CORDISCO, E. *et al.* Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. **J Invest Dermatol**, 126, n. 10, p. 2302-2307, Oct 2006.
- PONTI, G.; MANFREDINI, M.; TOMASI, A.; PELLACANI, G. Muir-Torre Syndrome and founder mismatch repair gene mutations: A long gone historical genetic challenge. **Gene**, 589, n. 2, p. 127-132, Sep 10 2016.
- PRAKASH, R.; ZHANG, Y.; FENG, W.; JASIN, M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, n. 4, p. a016600, Apr 1 2015.
- PUGH, T. J.; AMR, S. S.; BOWSER, M. J.; GOWRISANKAR, S. *et al.* VisCap: inference and visualization of germ-line copy-number variants from targeted clinical sequencing data. **Genet Med**, 18, n. 7, p. 712-719, Jul 2016.
- RAFFONE, A.; TRAVAGLINO, A.; CERBONE, M.; DE LUCA, C. *et al.* Diagnostic accuracy of p53 immunohistochemistry as surrogate of TP53 sequencing in endometrial cancer. **Pathol Res Pract**, 216, n. 8, p. 153025, Aug 2020.
- RAGLAN, O.; KALLIALA, I.; MARKOZANNES, G.; CIVIDINI, S. *et al.* Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature. **Int J Cancer**, 145, n. 7, p. 1719-1730, Oct 1 2019.
- RAHNER, N.; STEINKE, V. Hereditary cancer syndromes. **Dtsch Arztebl Int**, 105, n. 41, p. 706-714, Oct 2008.
- RAMCHANDER, N. C.; RYAN, N. A.; CROSBIE, E. J.; EVANS, D. G. Homozygous germ-line mutation of the PMS2 mismatch repair gene: a unique case report of constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD). **BMC Med Genet**, 18, n. 1, p. 40, Apr 5 2017.
- RAMOS-VARA, J. A. Principles and Methods of Immunohistochemistry. **Methods Mol Biol**, 1641, p. 115-128, 2017.
- RAYNER, E.; VAN GOOL, I. C.; PALLES, C.; KEARSEY, S. E. *et al.* A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 2, p. 71-81, Feb 2016.
- REHM, H. L.; BERG, J. S.; BROOKS, L. D.; BUSTAMANTE, C. D. *et al.* ClinGen--the Clinical Genome Resource. **N Engl J Med**, 372, n. 23, p. 2235-2242, Jun 4 2015.
- REITSMA, W.; MOURITS, M. J.; DE BOCK, G. H.; HOLLEMA, H. Endometrium is not the primary site of origin of pelvic high-grade serous carcinoma in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. **Mod Pathol**, 26, n. 4, p. 572-578, Apr 2013.
- RENAUX-PETEL, M.; CHARBONNIER, F.; THERY, J. C.; FERMEY, P. *et al.* Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet**, 55, n. 3, p. 173-180, Mar 2018.

- RENEHAN, A. G.; TYSON, M.; EGGER, M.; HELLER, R. F. *et al.* Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**, 371, n. 9612, p. 569-578, Feb 16 2008.
- RENNERT, G.; LEJBKOWICZ, F.; COHEN, I.; PINCHEV, M. *et al.* MutYH mutation carriers have increased breast cancer risk. **Cancer**, 118, n. 8, p. 1989-1993, Apr 15 2012.
- RENTZSCH, P.; WITTEN, D.; COOPER, G. M.; SHENDURE, J. *et al.* CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D886-D894, Jan 8 2019.
- RESTA, N.; PIERANNUNZIO, D.; LENATO, G. M.; STELLA, A. *et al.* Cancer risk associated with STK11/LKB1 germline mutations in Peutz-Jeghers syndrome patients: results of an Italian multicenter study. **Dig Liver Dis**, 45, n. 7, p. 606-611, Jul 2013.
- RHEE, J. K.; LEE, S.; PARK, W. Y.; KIM, Y. H. *et al.* Allelic imbalance of somatic mutations in cancer genomes and transcriptomes. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 1653, May 10 2017.
- RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, 17, n. 5, p. 405-424, May 2015.
- RICHARDSON, M. E.; CHONG, H.; MU, W.; CONNER, B. R. *et al.* DNA breakpoint assay reveals a majority of gross duplications occur in tandem reducing VUS classifications in breast cancer predisposition genes. **Genet Med**, 21, n. 3, p. 683-693, Mar 2019.
- RING, K. L.; BRUEGL, A. S.; ALLEN, B. A.; ELKIN, E. P. *et al.* Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. **Mod Pathol**, 29, n. 11, p. 1381-1389, Nov 2016.
- RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; BOLAND, C. R.; HAMILTON, S. R.; HENSON, D. E. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst**, 89, n. 23, p. 1758-1762, Dec 3 1997.
- ROHLIN, A.; EIENGARD, F.; LUNDSTAM, U.; ZAGORAS, T. *et al.* GREM1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. **Genes Chromosomes Cancer**, 55, n. 1, p. 95-106, Jan 2016.
- ROSA, R. C. A.; SANTIS, J. O.; TEIXEIRA, L. A.; MOLFETTA, G. A. *et al.* Lynch syndrome identification in a Brazilian cohort of endometrial cancer screened by a universal approach. **Gynecol Oncol**, 159, n. 1, p. 229-238, Oct 2020.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer**, 12, n. 1, p. 68-78, Dec 23 2011.
- RUNGSUNG, I.; RAMASWAMY, A. Effects of Peutz-Jeghers syndrome (PJS) causing missense mutations L67P, L182P, G242V and R297S on the structural dynamics of LKB1 (Liver kinase B1) protein. **J Biomol Struct Dyn**, 37, n. 3, p. 796-810, Feb 2019.

- RUSSO, R.; GAMBALE, A.; LANGELLA, C.; ANDOLFO, I. *et al.* Retrospective cohort study of 205 cases with congenital dyserythropoietic anemia type II: definition of clinical and molecular spectrum and identification of new diagnostic scores. **Am J Hematol**, 89, n. 10, p. E169-175, Oct 2014.
- RYAN, P.; MULLIGAN, A. M.; ARONSON, M.; FERGUSON, S. E. *et al.* Comparison of clinical schemas and morphologic features in predicting Lynch syndrome in mutation-positive patients with endometrial cancer encountered in the context of familial gastrointestinal cancer registries. **Cancer**, 118, n. 3, p. 681-688, Feb 1 2012.
- SALVESEN, H. B.; STEFANSSON, I.; KRETZSCHMAR, E. I.; GRUBER, P. *et al.* Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. **Int J Oncol**, 25, n. 6, p. 1615-1623, Dec 2004.
- SAMOWITZ, W. S. Genetic and epigenetic changes in colon cancer. **Exp Mol Pathol**, 85, n. 1, p. 64-67, Aug 2008.
- SANDERSON, P. A.; MOULLA, A.; FEGAN, K. S. Endometrial cancer – an update. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, 29, n. 8, p. 225-232, 2019.
- SANTONOCITO, C.; RIZZA, R.; PARIS, I.; MARCHIS, L. *et al.* Spectrum of Germline BRCA1 and BRCA2 Variants Identified in 2351 Ovarian and Breast Cancer Patients Referring to a Reference Cancer Hospital of Rome. **Cancers (Basel)**, 12, n. 5, May 19 2020.
- SAULE, C.; MOURET-FOURME, E.; BRIAUX, A.; BECETTE, V. *et al.* Risk of Serous Endometrial Carcinoma in Women With Pathogenic BRCA1/2 Variant After Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy. **J Natl Cancer Inst**, 110, n. 2, Feb 1 2018.
- SCHLACHER, K.; CHRIST, N.; SIAUD, N.; EGASHIRA, A. *et al.* Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. **Cell**, 145, n. 4, p. 529-542, May 13 2011.
- SCHMELER, K. M.; DANIELS, M. S.; BRANDT, A. C.; LU, K. H. Endometrial cancer in an adolescent: a possible manifestation of Cowden syndrome. **Obstet Gynecol**, 114, n. 2 Pt 2, p. 477-479, Aug 2009.
- SCHWARTZ, R. A.; TORRE, D. P. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. **J Am Acad Dermatol**, 33, n. 1, p. 90-104, Jul 1995.
- SECORD, A. A.; HASSELBLAD, V.; VON GRUENIGEN, V. E.; GEHRIG, P. A. *et al.* Body mass index and mortality in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. **Gynecol Oncol**, 140, n. 1, p. 184-190, Jan 2016.
- SEGEV, Y.; IQBAL, J.; LUBINSKI, J.; GRONWALD, J. *et al.* The incidence of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations: an international prospective cohort study. **Gynecol Oncol**, 130, n. 1, p. 127-131, Jul 2013.

- SGO, Clinical Practice Endometrial Cancer Working Group.; BURKE, W. M.; ORR, J.; LEITAO, M. *et al.* Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. **Gynecol Oncol**, 134, n. 2, p. 385-392, Aug 2014.
- SHARMA, S. Secretory Endometrial Adenocarcinoma: A Rare Sequelae in a Postmenopausal Woman Following Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. **J Midlife Health**, 11, n. 3, p. 171-174, Jul-Sep 2020.
- SHEN, R.; SESHAN, V. E. FACETS: allele-specific copy number and clonal heterogeneity analysis tool for high-throughput DNA sequencing. **Nucleic Acids Res**, 44, n. 16, p. e131, Sep 19 2016.
- SHINBROT, E.; HENNINGER, E. E.; WEINHOLD, N.; COVINGTON, K. R. *et al.* Exonuclease mutations in DNA polymerase epsilon reveal replication strand specific mutation patterns and human origins of replication. **Genome Res**, 24, n. 11, p. 1740-1750, Nov 2014.
- SHINMURA, K.; GOTO, M.; TAO, H.; KATO, H. *et al.* Impaired 8-hydroxyguanine repair activity of MUTYH variant p.Arg109Trp found in a Japanese patient with early-onset colorectal cancer. **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 617351, 2014.
- SHINMURA, K.; GOTO, M.; TAO, H.; SUGIMURA, H. Role of Base Excision Repair Enzyme MUTYH in the Repair of 8-Hydroxyguanine and MUTYH-Associated Polyposis (MAP). **Hereditary Genet**, 1, n. 111, p. 10, 2012. Review Article.
- SIMON, M. S.; PETRUCELLI, N. Hereditary breast and ovarian cancer syndrome : the impact of race on uptake of genetic counseling and testing. **Methods Mol Biol**, 471, p. 487-500, 2009.
- SMRZ, S. A.; CALO, C.; FISHER, J. L.; SALANI, R. An ecological evaluation of the increasing incidence of endometrial cancer and the obesity epidemic. **Am J Obstet Gynecol**, Oct 27 2020.
- SOLIMAN, P. T.; OH, J. C.; SCHMELER, K. M.; SUN, C. C. *et al.* Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, 105, n. 3, p. 575-580, Mar 2005.
- SOLIMAN, P. T.; WU, D.; TORTOLERO-LUNA, G.; SCHMELER, K. M. *et al.* Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer. **Cancer**, 106, n. 11, p. 2376-2381, Jun 1 2006.
- SON, J.; CARR, C.; YAO, M.; RADEVA, M. *et al.* Endometrial cancer in young women: prognostic factors and treatment outcomes in women aged ≤ 40 years. **Int J Gynecol Cancer**, 30, n. 5, p. 631-639, May 2020.
- SOTELO, N. S.; VALIENTE, M.; GIL, A.; PULIDO, R. A functional network of the tumor suppressors APC, hDlg, and PTEN, that relies on recognition of specific PDZ-domains. **J Cell Biochem**, 113, n. 8, p. 2661-2670, Aug 2012.

- SOUTH, C. D.; HAMPEL, H.; COMERAS, I.; WESTMAN, J. A. *et al.* The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. **J Natl Cancer Inst**, 100, n. 4, p. 277-281, Feb 20 2008.
- SPIER, I.; HOLZAPFEL, S.; ALTMULLER, J.; ZHAO, B. *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. **Int J Cancer**, 137, n. 2, p. 320-331, Jul 15 2015.
- SPURDLE, A. B.; BOWMAN, M. A.; SHAMSANI, J.; KIRK, J. Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing. **Mod Pathol**, 30, n. 8, p. 1048-1068, Aug 2017.
- STADLER, Z. K.; ROBSON, M. E. Inherited predisposition to endometrial cancer: moving beyond Lynch syndrome. **Cancer**, 121, n. 5, p. 644-647, Mar 1 2015.
- STEWART, A. P. Genetic testing strategies in newly diagnosed endometrial cancer patients aimed at reducing morbidity or mortality from lynch syndrome in the index case or her relatives. **PLoS Curr**, 5, Sep 16 2013.
- STODOLA, J. L.; BURGERS, P. M. Mechanism of Lagging-Strand DNA Replication in Eukaryotes. **Adv Exp Med Biol**, 1042, p. 117-133, 2017.
- SULLIVAN, K. D.; GALLANT-BEHM, C. L.; HENRY, R. E.; FRAIKIN, J. L. *et al.* The p53 circuit board. **Biochim Biophys Acta**, 1825, n. 2, p. 229-244, Apr 2012.
- TAKAHASHI, K.; SATO, N.; SUGAWARA, T.; KATO, A. *et al.* Clinical characteristics of Lynch-like cases collaterally classified by Lynch syndrome identification strategy using universal screening in endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, 147, n. 2, p. 388-395, Nov 2017.
- TALHOUK, A.; MCCONECHY, M. K.; LEUNG, S.; LI-CHANG, H. H. *et al.* A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. **Br J Cancer**, 113, n. 2, p. 299-310, Jul 14 2015.
- TAMURA, K.; KANEDA, M.; FUTAGAWA, M.; TAKESHITA, M. *et al.* Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. **Int J Clin Oncol**, 24, n. 9, p. 999-1011, Sep 2019.
- TATE, J. G.; BAMFORD, S.; JUBB, H. C.; SONDKA, Z. *et al.* COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D941-D947, Jan 8 2019.
- TAVERA-TAPIA, A.; PEREZ-CABORNERO, L.; MACIAS, J. A.; CEBALLOS, M. I. *et al.* Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. **Breast Cancer Res Treat**, 161, n. 3, p. 597-604, Feb 2017.
- TAVUSBAY, C.; ACAR, T.; KAR, H.; ATAHAN, K. *et al.* The patients with Peutz-Jeghers syndrome have a high risk of developing cancer. **Turk J Surg**, 34, n. 2, p. 162-164, 2018.

- TAYLOR, N. P.; POWELL, M. A.; GIBB, R. K.; RADER, J. S. *et al.* MLH3 mutation in endometrial cancer. **Cancer Res**, 66, n. 15, p. 7502-7508, Aug 1 2006.
- TIAINEN, M.; VAAHTOMERI, K.; YLIKORKALA, A.; MAKELA, T. P. Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). **Hum Mol Genet**, 11, n. 13, p. 1497-1504, Jun 15 2002.
- TIAN, W.; BI, R.; REN, Y.; HE, H. *et al.* Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. **Int J Cancer**, 145, n. 5, p. 1290-1298, Sep 1 2019.
- TISCHKOWITZ, M. D.; YILMAZ, A.; CHEN, L. Q.; KARYADI, D. M. *et al.* Identification and characterization of novel SNPs in CHEK2 in Ashkenazi Jewish men with prostate cancer. **Cancer Lett**, 270, n. 1, p. 173-180, Oct 18 2008.
- TIWARI, A. K.; ROY, H. K.; LYNCH, H. T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. **QJM**, 109, n. 3, p. 151-158, Mar 2016.
- TOHYA, T.; OGURA, T.; NISHI, K.; NISHI, H. *et al.* Muir-Torre syndrome associated with endometrial carcinoma. **Int J Clin Oncol**, 13, n. 6, p. 559-561, Dec 2008.
- TORRE, D. Multiple sebaceous tumors. **Arch Dermatol**, 98, n. 5, p. 549-551, Nov 1968.
- TUNG, N.; LIN, N. U.; KIDD, J.; ALLEN, B. A. *et al.* Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. **J Clin Oncol**, 34, n. 13, p. 1460-1468, May 1 2016.
- UMAR, A.; BOLAND, C. R.; TERDIMAN, J. P.; SYNGAL, S. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst**, 96, n. 4, p. 261-268, Feb 18 2004.
- VAN LIER, M. G.; WAGNER, A.; MATHUS-VLIEGEN, E. M.; KUIPERS, E. J. *et al.* High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. **Am J Gastroenterol**, 105, n. 6, p. 1258-1264; author reply 1265, Jun 2010.
- VAN LIER, M. G.; WESTERMAN, A. M.; WAGNER, A.; LOOMAN, C. W. *et al.* High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome. **Gut**, 60, n. 2, p. 141-147, Feb 2011.
- VASEN, H. F.; BLANCO, I.; AKTAN-COLLAN, K.; GOPIE, J. P. *et al.* Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. **Gut**, 62, n. 6, p. 812-823, Jun 2013.
- VASEN, H. F.; MECKLIN, J. P.; KHAN, P. M.; LYNCH, H. T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum**, 34, n. 5, p. 424-425, May 1991.
- VASEN, H. F.; WATSON, P.; MECKLIN, J. P.; LYNCH, H. T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology**, 116, n. 6, p. 1453-1456, Jun 1999.

- VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science**, 343, n. 6178, p. 1470-1475, Mar 28 2014.
- VENKITARAMAN, A. R. How do mutations affecting the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2 cause cancer susceptibility? **DNA Repair (Amst)**, 81, p. 102668, Sep 2019.
- VIETRI, M. T.; D'ELIA, G.; CALIENDO, G.; CASAMASSIMI, A. *et al.* Prevalence of mutations in BRCA and MMR genes in patients affected with hereditary endometrial cancer. **Med Oncol**, 38, n. 2, p. 13, Jan 23 2021.
- VILAR, E.; GRUBER, S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. **Nat Rev Clin Oncol**, 7, n. 3, p. 153-162, Mar 2010.
- VOGEL, W. H. Li-Fraumeni Syndrome. **J Adv Pract Oncol**, 8, n. 7, p. 742-746, Nov-Dec 2017.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, 10, n. 8, p. 789-799, Aug 2004.
- VOGT, S.; JONES, N.; CHRISTIAN, D.; ENGEL, C. *et al.* Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. **Gastroenterology**, 137, n. 6, p. 1976-1985 e1971-1910, Dec 2009.
- VON NICOLAI, C.; EHLEN, A.; MARTIN, C.; ZHANG, X. *et al.* A second DNA binding site in human BRCA2 promotes homologous recombination. **Nat Commun**, 7, p. 12813, Sep 15 2016.
- WAGNER, R., Jr.; MESELSON, M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 73, n. 11, p. 4135-4139, Nov 1976.
- WALKOWSKA, J.; KALLEMOSE, T.; JONSSON, G.; JONSSON, M. *et al.* Immunoprofiles of colorectal cancer from Lynch syndrome. **Oncoimmunology**, 8, n. 1, p. e1515612, 2019.
- WANG, A.; MCCracken, J.; LI, Y.; XU, L. The practice of universal screening for Lynch syndrome in newly diagnosed endometrial carcinoma. **Health Sci Rep**, 1, n. 7, p. e43, Jul 2018.
- WANG, F.; ZHAO, Q.; WANG, Y. N.; JIN, Y. *et al.* Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. **JAMA Oncol**, Aug 15 2019.
- WANG, Z.; CHEN, Y.; WU, B.; ZHENG, H. *et al.* A novel mutation in STK11 gene is associated with Peutz-Jeghers syndrome in Chinese patients. **BMC Med Genet**, 12, p. 161, Dec 14 2011.
- WEBER-LASSALLE, N.; HAUKE, J.; RAMSER, J.; RICHTERS, L. *et al.* BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. **Breast Cancer Res**, 20, n. 1, p. 7, Jan 24 2018.

- WESTDORP, H.; KOLDERS, S.; HOOGERBRUGGE, N.; DE VRIES, I. J. M. *et al.* Immunotherapy holds the key to cancer treatment and prevention in constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD) syndrome. **Cancer Lett**, 403, p. 159-164, Sep 10 2017.
- WIMMER, K.; KRATZ, C. P. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome. **Haematologica**, 95, n. 5, p. 699-701, May 2010.
- WIN, A. K.; CLEARY, S. P.; DOWTY, J. G.; BARON, J. A. *et al.* Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer. **Int J Cancer**, 129, n. 9, p. 2256-2262, Nov 1 2011.
- WIN, A. K.; REECE, J. C.; DOWTY, J. G.; BUCHANAN, D. D. *et al.* Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. **Int J Cancer**, 139, n. 7, p. 1557-1563, Oct 1 2016.
- WIN, A. K.; REECE, J. C.; RYAN, S. Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. **Obstet Gynecol**, 125, n. 1, p. 89-98, Jan 2015.
- WONG, A.; NGEOW, J. Hereditary Syndromes Manifesting as Endometrial Carcinoma: How Can Pathological Features Aid Risk Assessment? **Biomed Res Int**, 2015, p. 219012, 2015.
- WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, 378, n. 6559, p. 789-792, Dec 21-28 1995.
- WOOSTER, R.; NEUHAUSEN, S. L.; MANGION, J.; QUIRK, Y. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, 265, n. 5181, p. 2088-2090, Sep 30 1994.
- XU, Y.; HUANG, Z.; LI, C.; ZHU, C. *et al.* Comparison of Molecular, Clinicopathological, and Pedigree Differences Between Lynch-Like and Lynch Syndromes. **Front Genet**, 11, p. 991, 2020.
- YAMAUCHI, H.; TAKEI, J. Management of hereditary breast and ovarian cancer. **Int J Clin Oncol**, 23, n. 1, p. 45-51, Feb 2018.
- YANG, C.; CHEN, N.; LI, X.; LU, D. *et al.* Mutations in the coat complex II component SEC23B promote colorectal cancer metastasis. **Cell Death Dis**, 11, n. 3, p. 157, Mar 2 2020.
- YAO, J.; GONG, Y.; ZHAO, W.; HAN, Z. *et al.* Comprehensive analysis of POLE and POLD1 Gene Variations identifies cancer patients potentially benefit from immunotherapy in Chinese population. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 15767, Oct 31 2019.
- YEHA, L.; JINDAL, S.; KOMAR, A. A.; ENG, C. Non-canonical role of cancer-associated mutant SEC23B in the ribosome biogenesis pathway. **Hum Mol Genet**, 27, n. 18, p. 3154-3164, Sep 15 2018.

- YEHIA, L.; NIAZI, F.; NI, Y.; NGEOW, J. *et al.* Germline Heterozygous Variants in SEC23B Are Associated with Cowden Syndrome and Enriched in Apparently Sporadic Thyroid Cancer. **Am J Hum Genet**, 97, n. 5, p. 661-676, Nov 5 2015.
- YEHIA, L.; SEYFI, M.; NIESTROJ, L. M.; PADMANABHAN, R. *et al.* Copy Number Variation and Clinical Outcomes in Patients With Germline PTEN Mutations. **JAMA Netw Open**, 3, n. 1, p. e1920415, Jan 3 2020.
- YEN, T. T.; WANG, T. L.; FADER, A. N.; SHIH, I. M. *et al.* Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. **Int J Gynecol Pathol**, 39, n. 1, p. 26-35, Jan 2020.
- YIGIT, S.; EKINCI, N.; HAYRULLAH, L.; OCAL, I. *et al.* Dedifferentiated endometrioid adenocarcinoma; clinicopathologic and immunohistochemical features of five cases. **J Turk Ger Gynecol Assoc**, 19, n. 3, p. 132-136, Aug 6 2018.
- YOO, L. I.; CHUNG, D. C.; YUAN, J. LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. **Nat Rev Cancer**, 2, n. 7, p. 529-535, Jul 2002.
- YURGELUN, M. B.; ALLEN, B.; KALDATE, R. R.; BOWLES, K. R. *et al.* Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. **Gastroenterology**, 149, n. 3, p. 604-613 e620, Sep 2015.
- ZANELLA, I.; MEROLA, F.; BIASIOTTO, G.; ARCHETTI, S. *et al.* Evaluation of the Ion Torrent PGM sequencing workflow for the routine rapid detection of BRCA1 and BRCA2 germline mutations. **Exp Mol Pathol**, 102, n. 2, p. 314-320, Apr 2017.
- ZBUK, K. M.; ENG, C. Hamartomatous polyposis syndromes. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, 4, n. 9, p. 492-502, Sep 2007.
- ZHANG, H.; WAN, W.; LIU, X.; WEN, C. *et al.* A case report of congenital erythropoietic anemia II in China with a novel mutation. **Ann Hematol**, 98, n. 4, p. 1041-1043, Apr 2019.
- ZHANG, L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. **J Mol Diagn**, 10, n. 4, p. 301-307, Jul 2008.
- ZHAO, S.; CHOI, M.; OVERTON, J. D.; BELLONE, S. *et al.* Landscape of somatic single-nucleotide and copy-number mutations in uterine serous carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 8, p. 2916-2921, Feb 19 2013.
- ZHENG, W.; XIANG, L.; FADARE, O.; KONG, B. A proposed model for endometrial serous carcinogenesis. **Am J Surg Pathol**, 35, n. 1, p. e1-e14, Jan 2011.
- ZHOU, W. J.; ZHANG, J.; YANG, H. L.; WU, K. *et al.* Estrogen inhibits autophagy and promotes growth of endometrial cancer by promoting glutamine metabolism. **Cell Commun Signal**, 17, n. 1, p. 99, Aug 20 2019.
- ZHOU, X.; YANG, X.; SUN, X.; XU, X. *et al.* Effect of PTEN loss on metabolic reprogramming in prostate cancer cells. **Oncol Lett**, 17, n. 3, p. 2856-2866, Mar 2019.

ZHOU, X. P.; KUISMANEN, S.; NYSTROM-LAHTI, M.; PELTOMAKI, P. *et al.* Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. **Hum Mol Genet**, 11, n. 4, p. 445-450, Feb 15 2002.

APÊNDICES

8. APÊNDICES

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

TÍTULO DA PESQUISA: Investigação de predisposição hereditária a câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Victor Evangelista de Faria Ferraz CARGO/FUNÇÃO: médico geneticista (CRM-SP 71347), professor doutor do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Jessica Oliveira de Santis CARGO/FUNÇÃO: biomédica, mestrando do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é realizar a identificação de alterações genéticas que possam ser causa de um risco maior de desenvolver câncer, com isso, podendo melhorar o acompanhamento clínico dessas pacientes e de familiares, além de ser possível realizar um diagnóstico precoce de outros tumores que possam surgir.

Caso concorde em participar, não terá necessidade do deslocamento fora de horários de atendimentos previamente marcados, sendo respeitado o tempo e disponibilidade de todos os participantes. Em datas determinadas, seu material genético será coletado. Como pesquisadores responsáveis pelo projeto de pesquisa, nós nos comprometemos a identificar as amostras coletadas de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de DNA será identificada por meio de números registrados de acordo com a ficha de cadastro de cada amostra, seguindo o padrão de numeração das outras amostras de DNA já contidas no Centro de Medicina Genômica.

Os riscos da pesquisa são relacionados ao desconforto da coleta de sangue e a possibilidade de perda de sigilo dos dados coletados. Primeiro, a coleta de sangue vai funcionar como uma coleta de sangue para exames comum (exame de sangue, hemograma), e será realizada com uma picada no braço. Para isso, será utilizada uma agulha fina, o que pode causar desconforto, dor local e, raramente, uma marca roxa que desaparecerá em pouco tempo, sem nenhum risco para a saúde. Quanto ao sigilo dos dados, tudo que for conversado será confidencial, e sempre identificado apenas com um código numérico (Paciente 01, 02...). Nenhum dado será revelado em relação a nome da paciente ou familiar. Apenas os pesquisadores terão acesso a esses dados, assim também diminuindo o risco de que algo será revelado ao contrário do que acordado.

Você poderá não se beneficiar diretamente com a pesquisa, no entanto, se houver a determinação de uma causa genética herdada, há a possibilidade de contribuir para a melhora do cuidado e prevenção de câncer tanto das pacientes quanto de seus familiares que também podem estar em risco para o desenvolvimento de câncer, caso eles também tenham as mutações estudadas. Todos os casos necessários, e por opção da paciente, serão encaminhados para o aconselhamento genético com o médico geneticista da equipe.

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico
versão 02 data 25 Junho 2019

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa. Quaisquer dúvidas relacionadas à pesquisa e quanto a sua participação nela poderão ser esclarecidas através de contato com um dos pesquisadores responsáveis pelo projeto, pelos telefones (16) 3315-4500 e (14) 99817-0743 ou e-mail: jessica.santis@usp.br. Além do contato dos pesquisadores, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pode ser contatado pelo telefone (16) 3602-2228, em caso de dúvidas ou até mesmo reclamações relacionadas à pesquisa.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório Câncer de Endométrio Hereditário criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de material genético (DNA) extraído a partir de sangue total para a pesquisa de alterações e mutações que possam estar relacionadas as doenças estudadas.

Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de DNA para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante qualquer período em que o senhor(a) esteja disponível e já se encontre no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, não havendo necessidade de deslocamento fora desse período. A coleta será realizada em um dos ambulatórios dentro do Hospital, e será realizada apenas uma coleta. Após coletado será guardado em biorrepositório estocado no Centro de Medicina Genômica (CMG), que está localizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (telefone: 016 36022410) onde as amostras serão armazenadas e permanecerá estocado até o momento em que os testes serão realizados e somente terá acesso a ele, os profissionais envolvidos nesta pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de DNA será identificada por meio de números.

Quanto ao material, será coletado cerca de 10 ml de sangue (quantidade que equivale a duas colheres de chá). Em decorrência da coleta partir de punção em uma veia do braço poderá ocorrer pouco desconforto na região pelo uso da agulha da coleta, no entanto, este desconforto não apresenta nenhum risco para a saúde do participante, podendo ser aliviado por repouso da área durante alguns minutos.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

As informações obtidas a partir destes testes serão utilizadas na pesquisa. Para que possamos saber se é de seu interesse, ou não, saber o resultado dos exames genéticos, marque com um “x” uma das opções abaixo:

- SIM, eu quero saber o resultado dos meus exames genéticos.
 NÃO, eu não quero saber o resultado dos meus exames genéticos.

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

As pacientes que desejarem saber os resultados dos exames de diagnóstico das síndromes estudadas serão chamadas novamente ao ambulatório de aconselhamento genético do câncer do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, onde será fornecido o aconselhamento genético por médico geneticista especializado, sem nenhum custo à paciente.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado em situações em que o material não esteja em qualidade ou quantidade suficiente para ser utilizado em outras análises.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Eu, _____, declaro que fui informada dos objetivos do estudo descrito acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Por fim, declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Dados do participante:

Nome: _____ RG: _____
Endereço: _____ n° _____
Bairro _____ Cidade _____ Telefone _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____
Assinatura: _____ data: _____

Abaixo seguem os dados de contato dos pesquisadores, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do pesquisador: Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Contato: E-mail: vferraz@usp.br e Telefone: (16) 3315-4500

Nome da pesquisadora: Jessica Oliveira de Santis

Contato: E-mail: jessica-santis@usp.br e Telefone: (16) 3315-4500

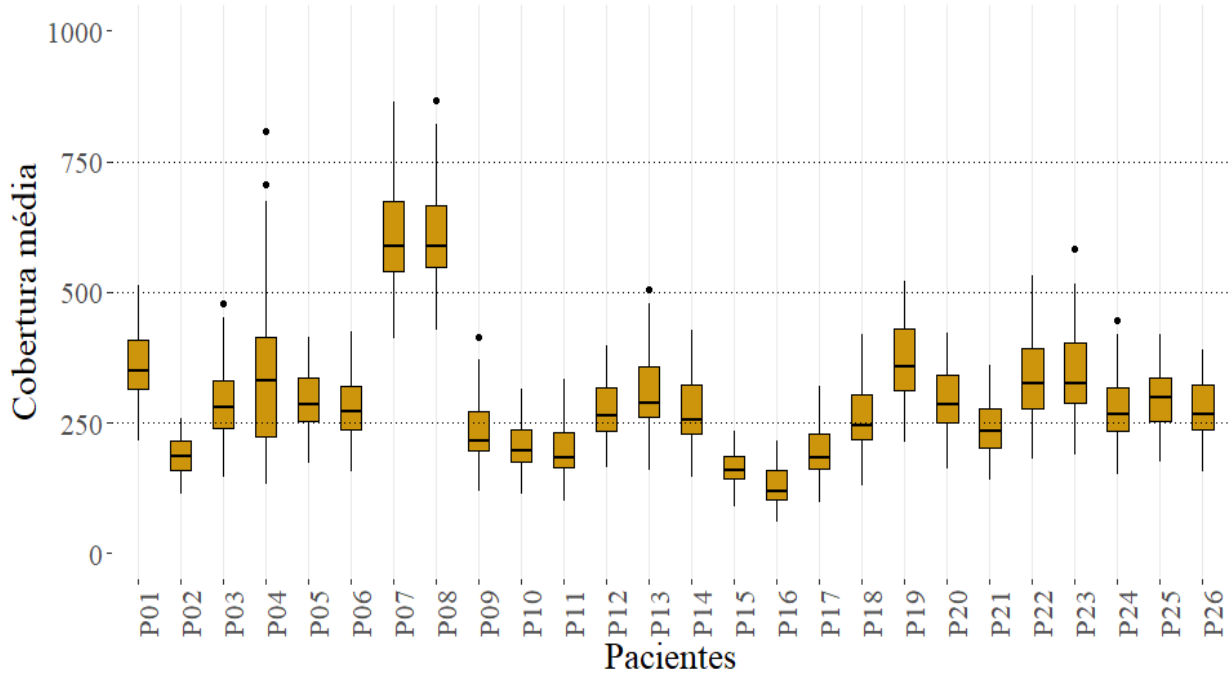
Assinatura: _____ **data:** _____

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

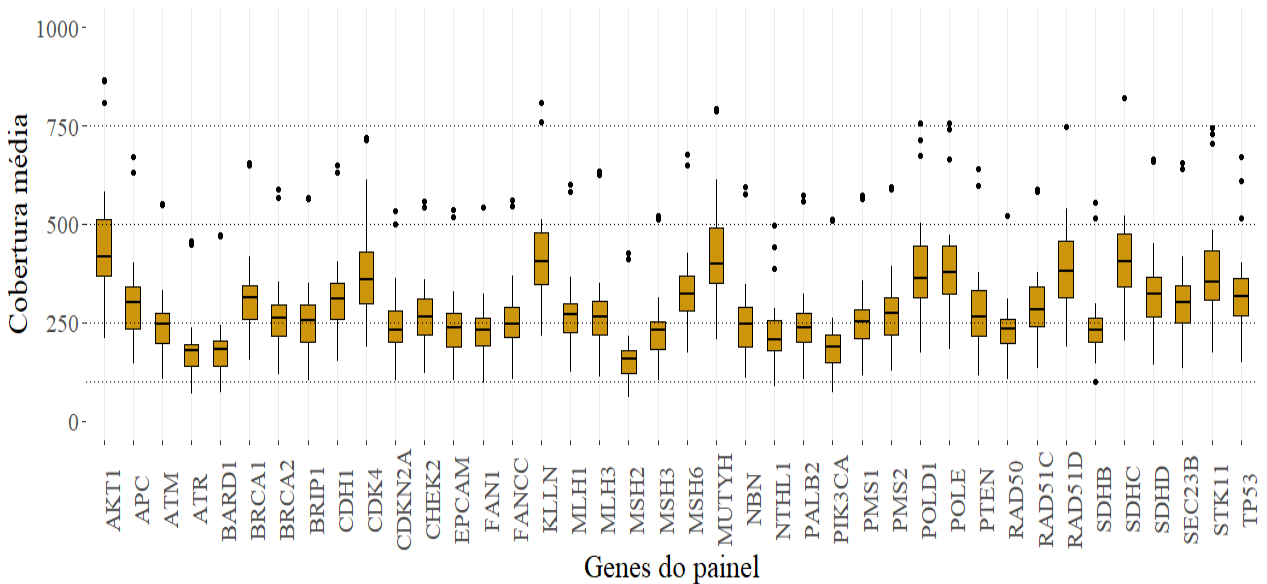
8.2 Gráficos de cobertura média dos sequenciamentos

8.2.1 Cobertura do sequenciamento germinativo

8.2.1.1 Cobertura do sequenciamento por amostra

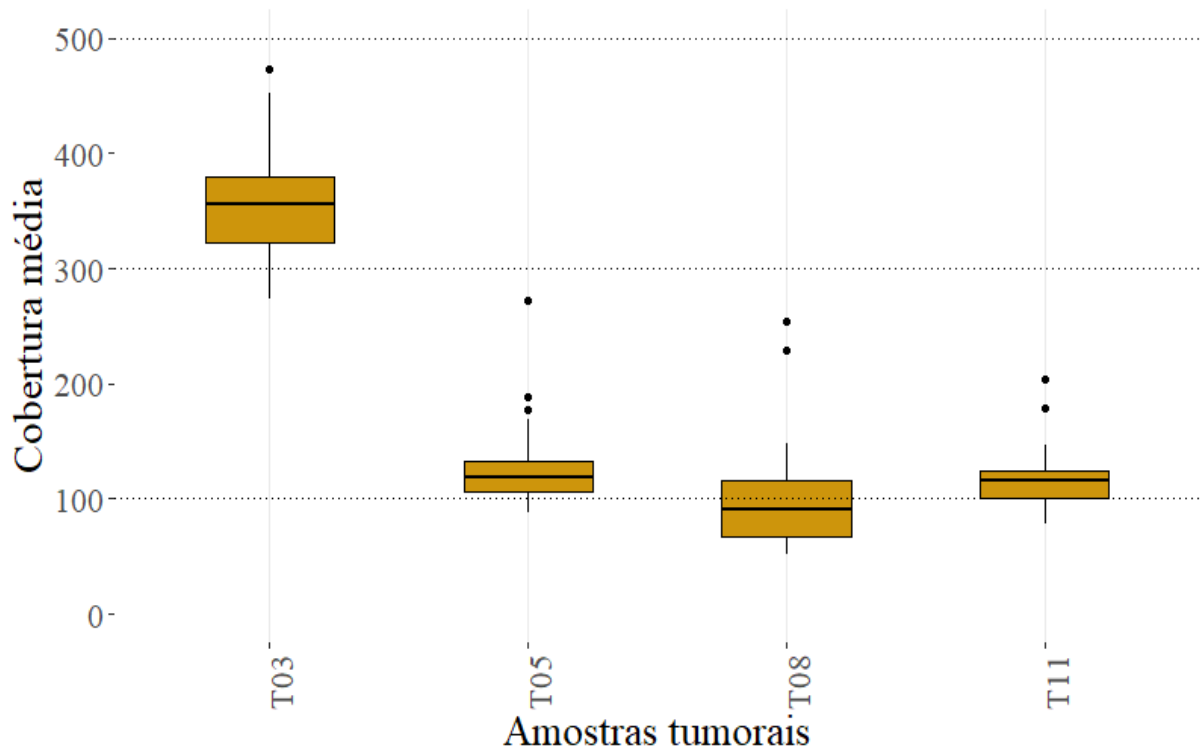


8.2.1.2 Cobertura do sequenciamento por gene do painel

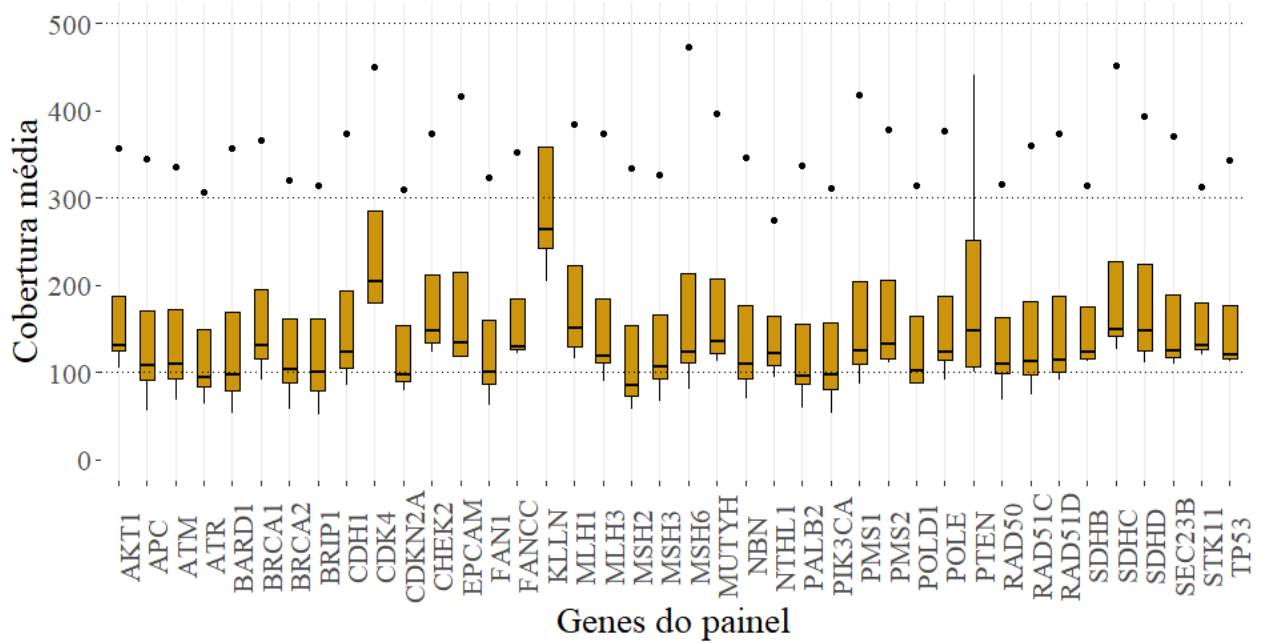


8.2.2 Cobertura do sequenciamento somático

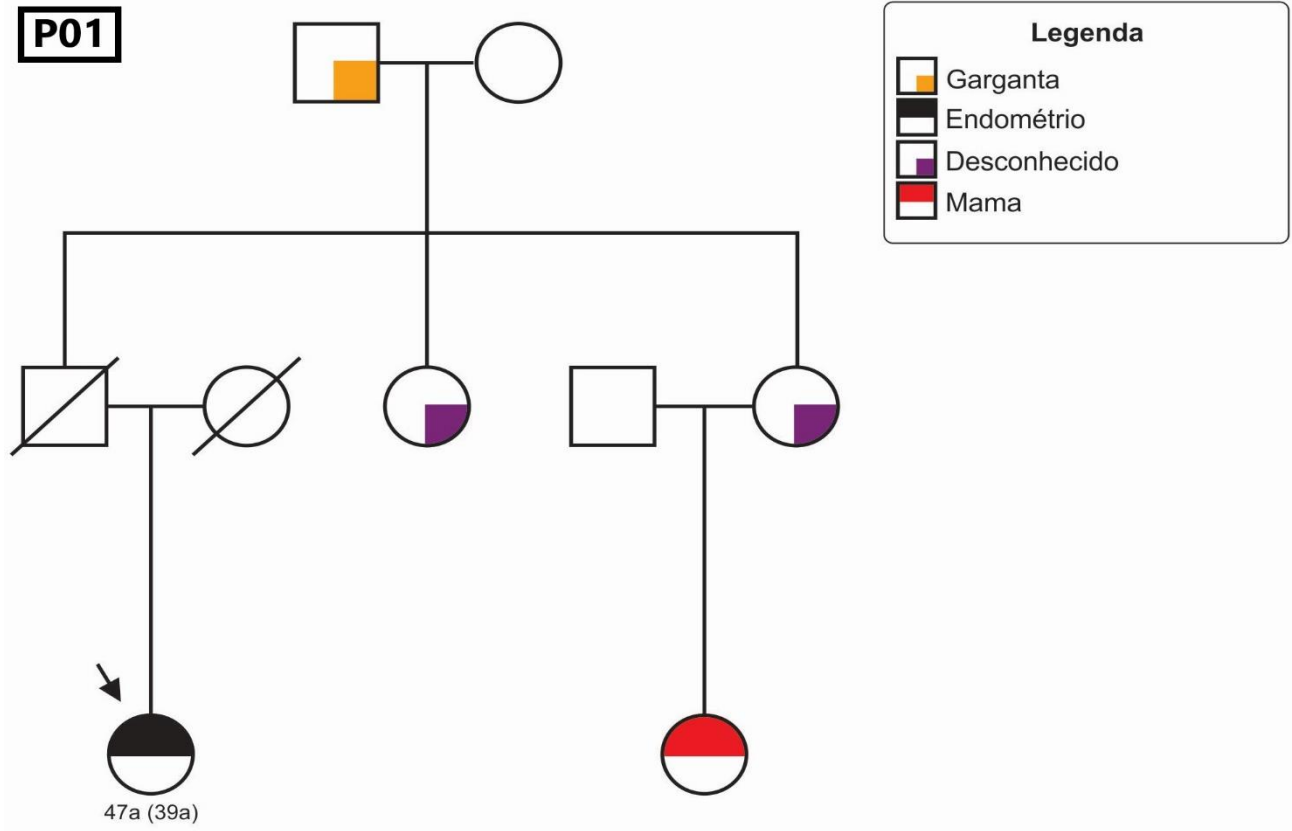
8.2.2.1 Cobertura do sequenciamento por amostra

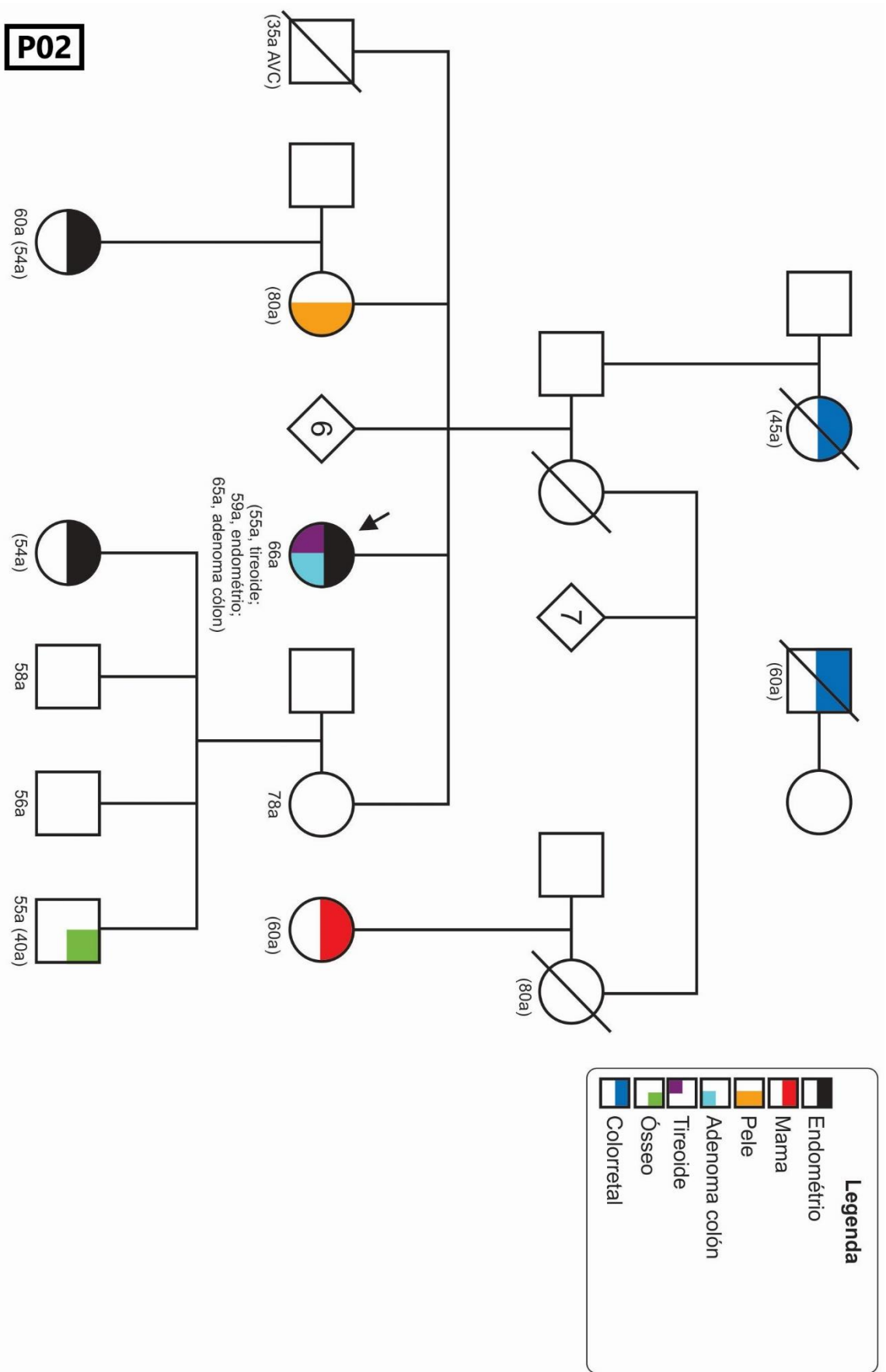


8.2.2.2 Cobertura do sequenciamento por gene do painel

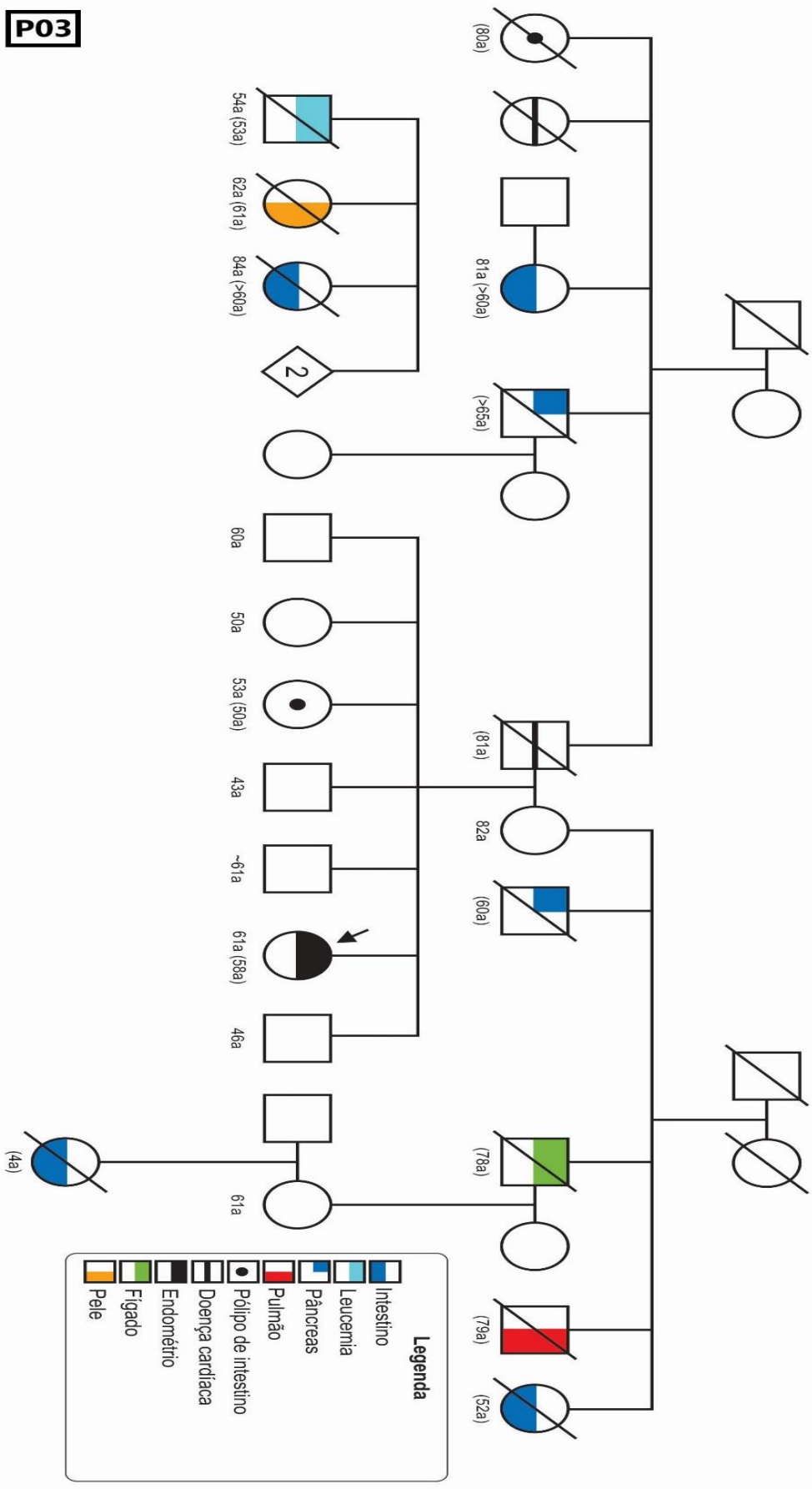


8.3 Heredogamas das pacientes de alto risco para predisposição ao CE

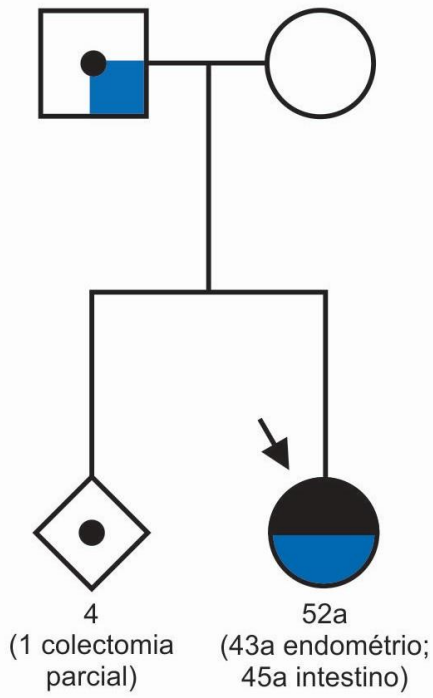




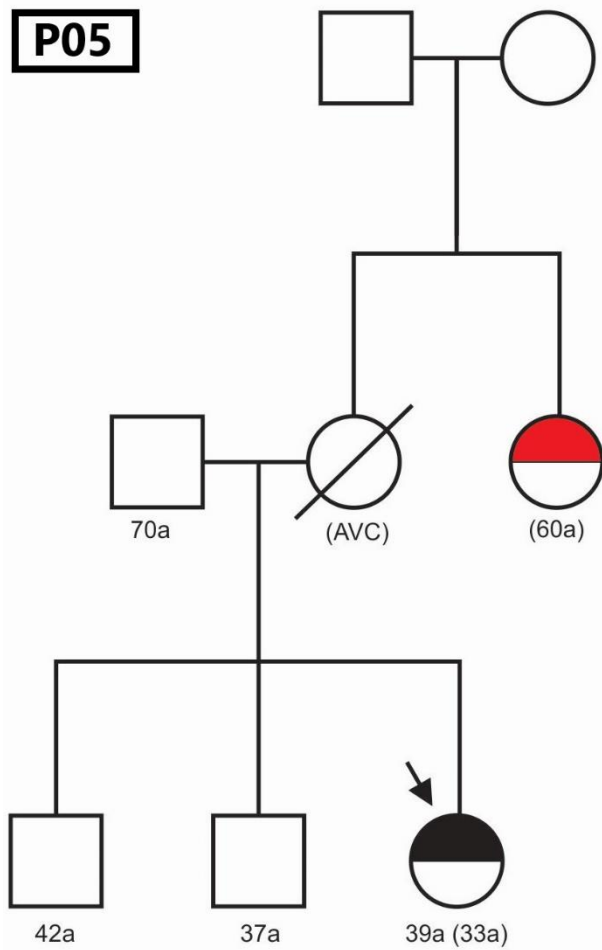
P03

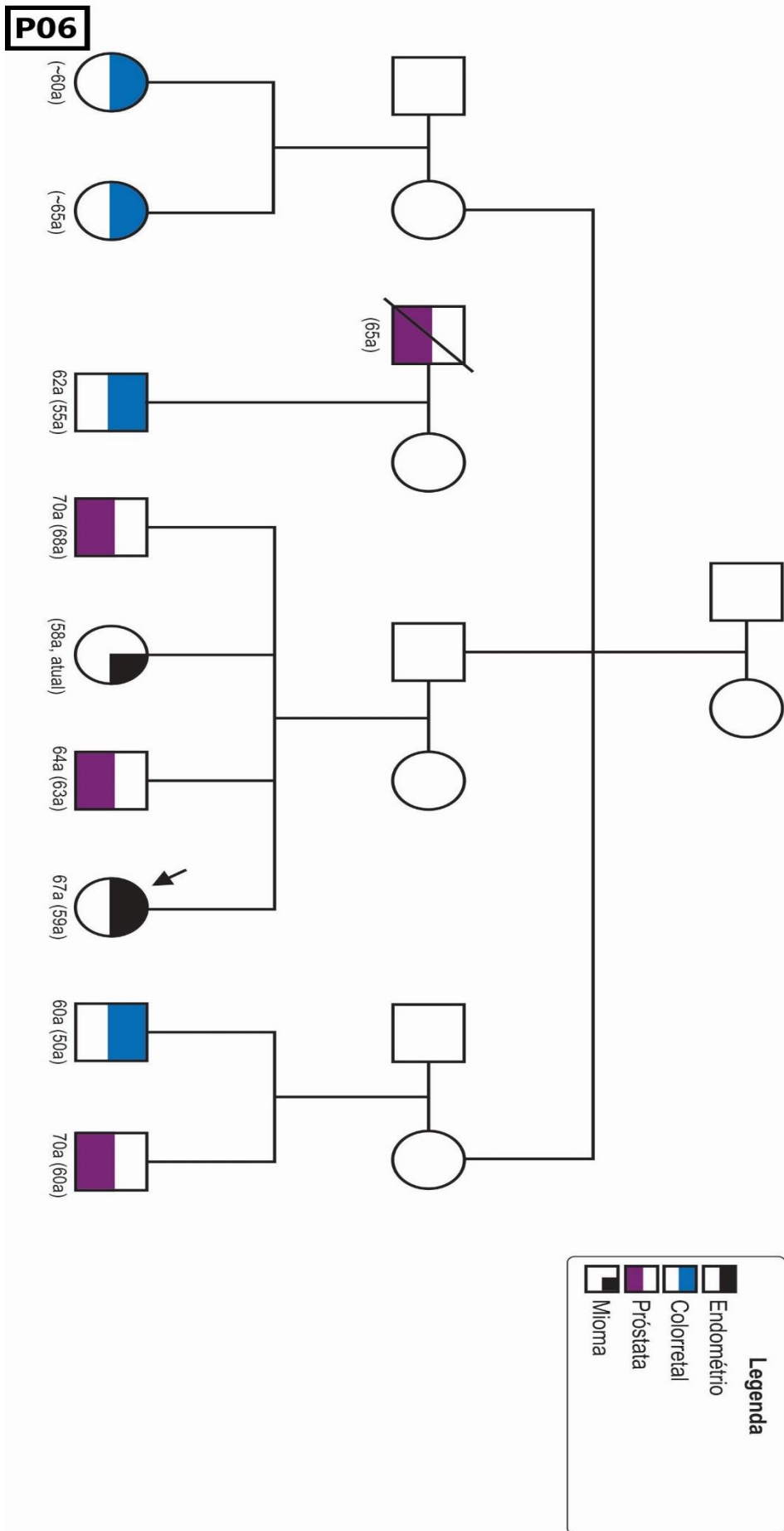


P04




P05

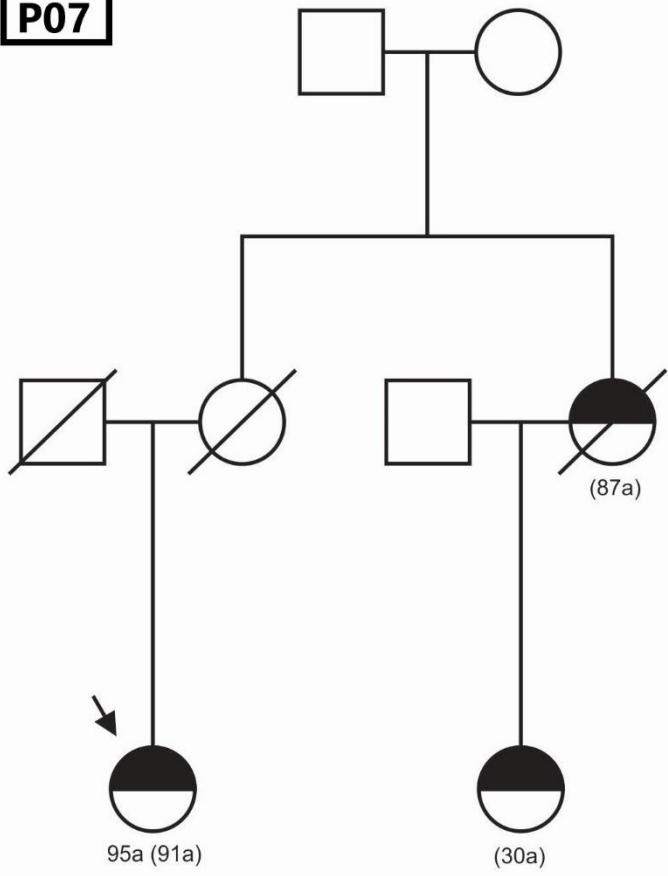




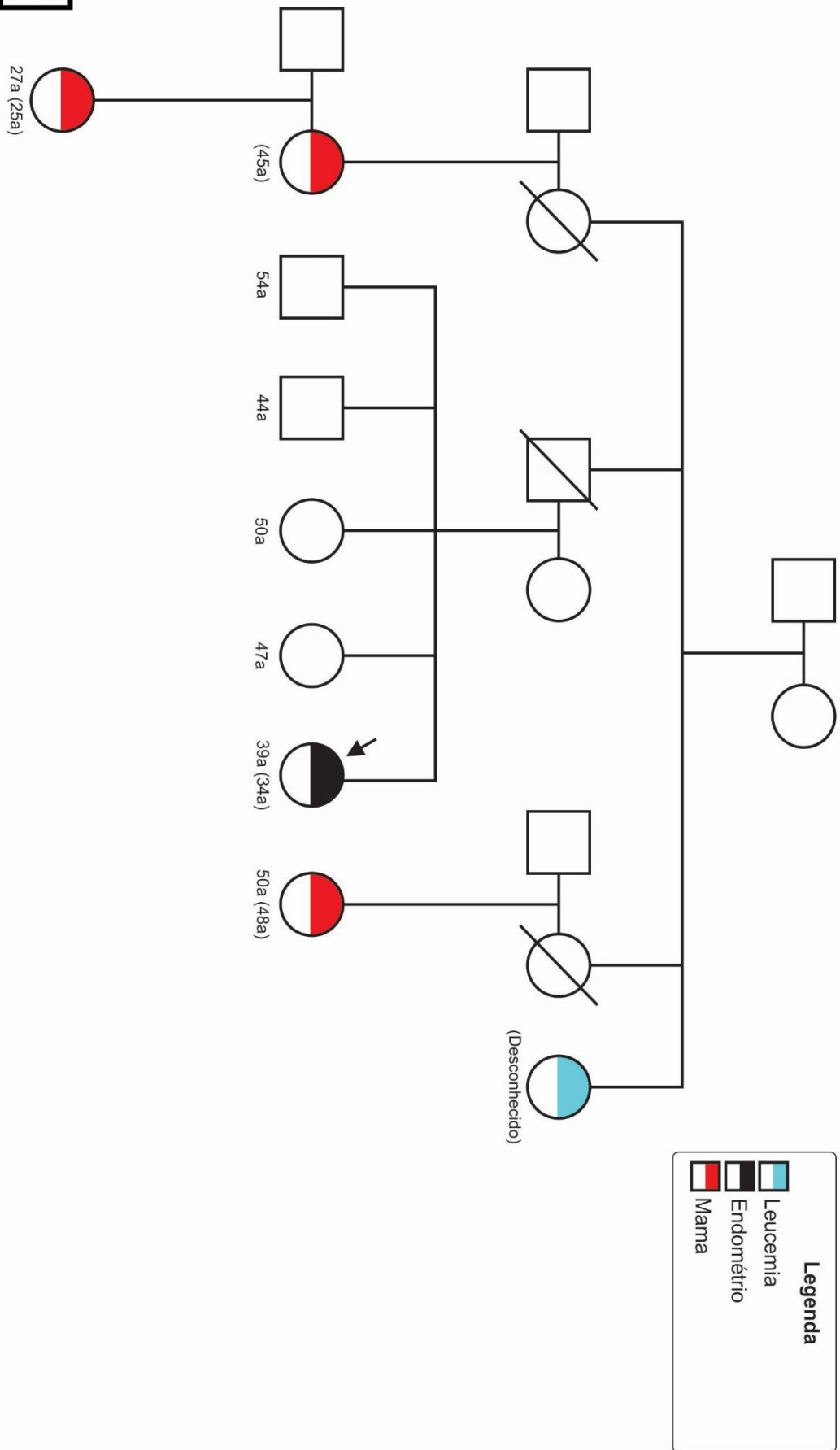
P07

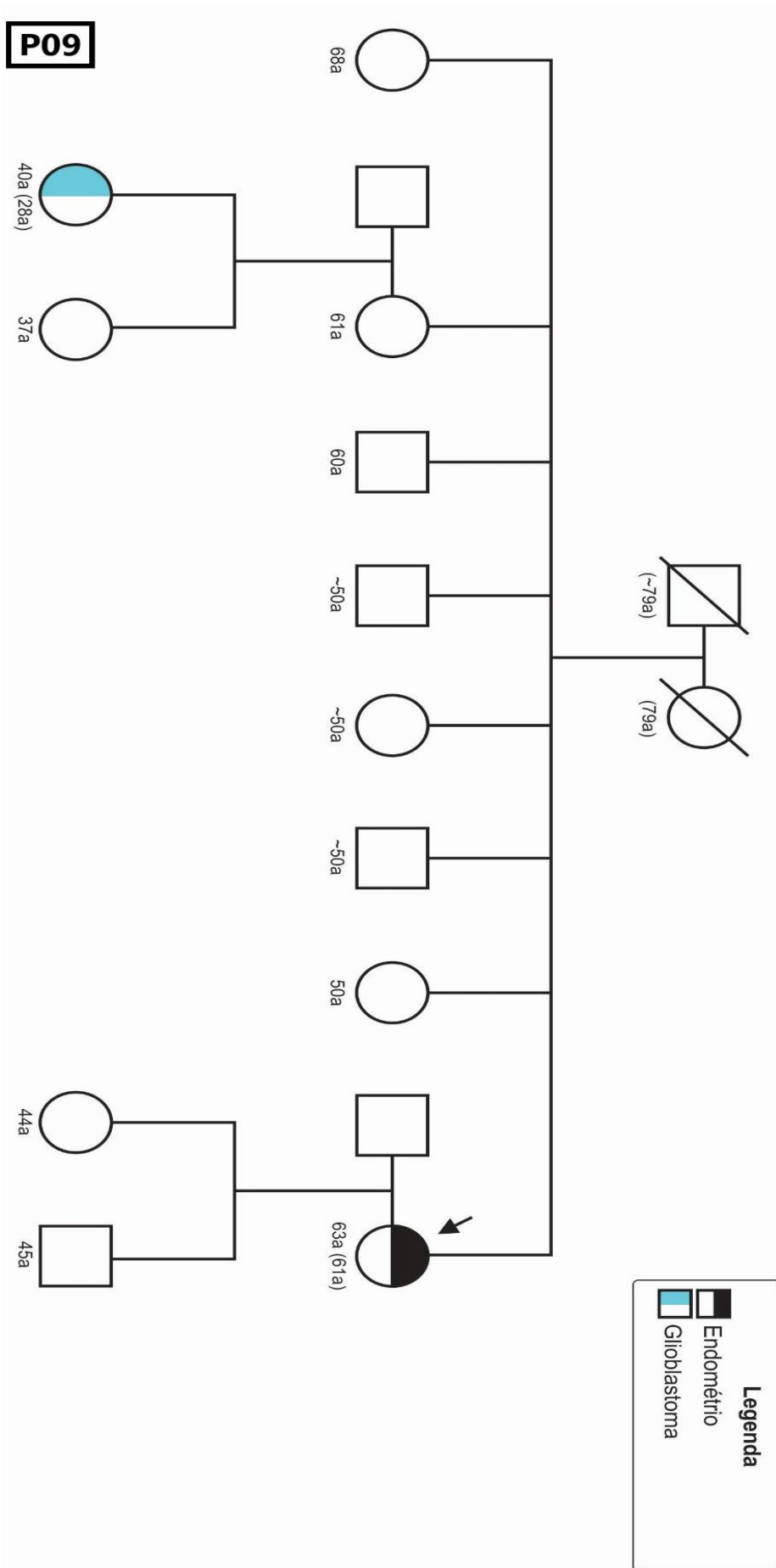
Legenda

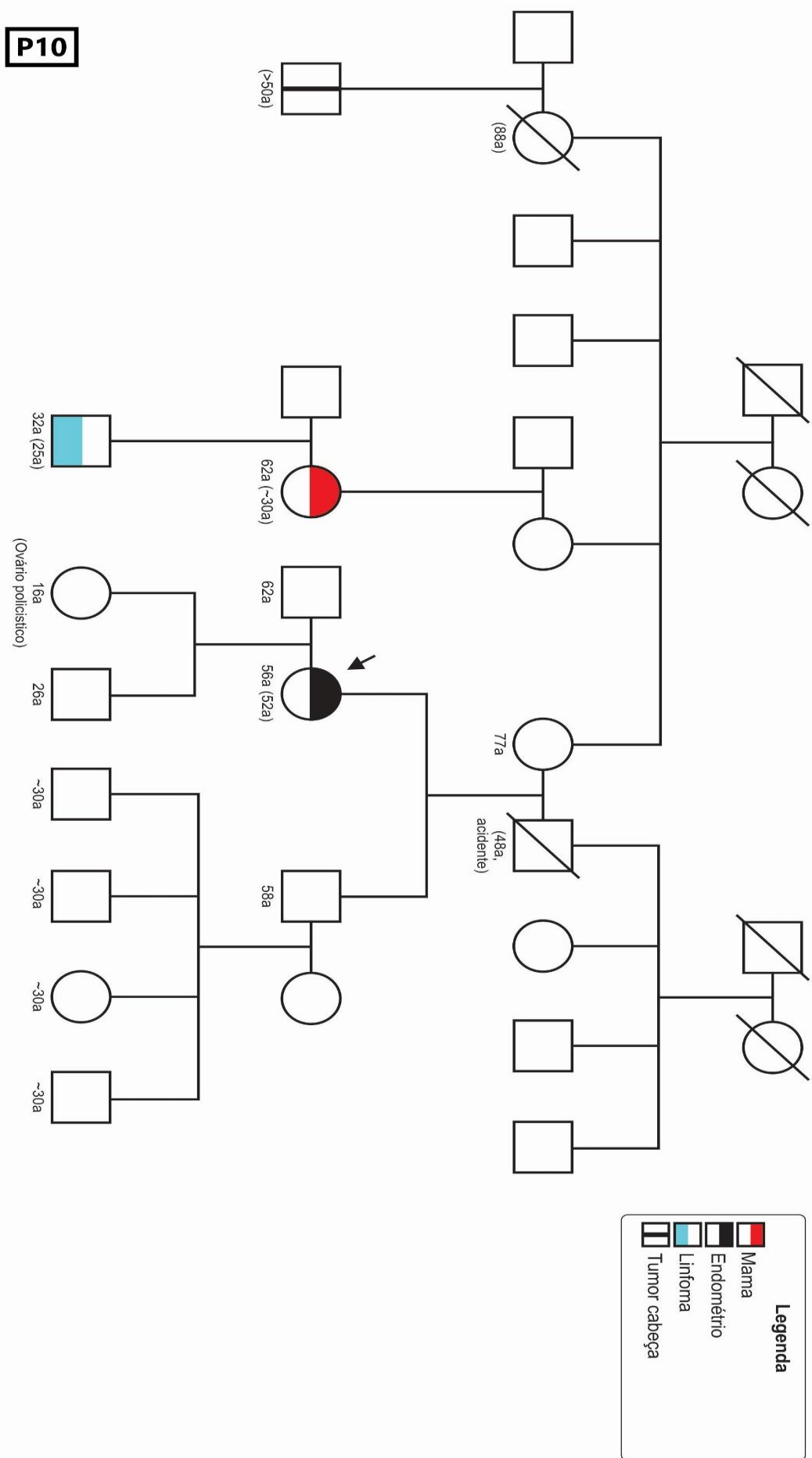
 Endométrio

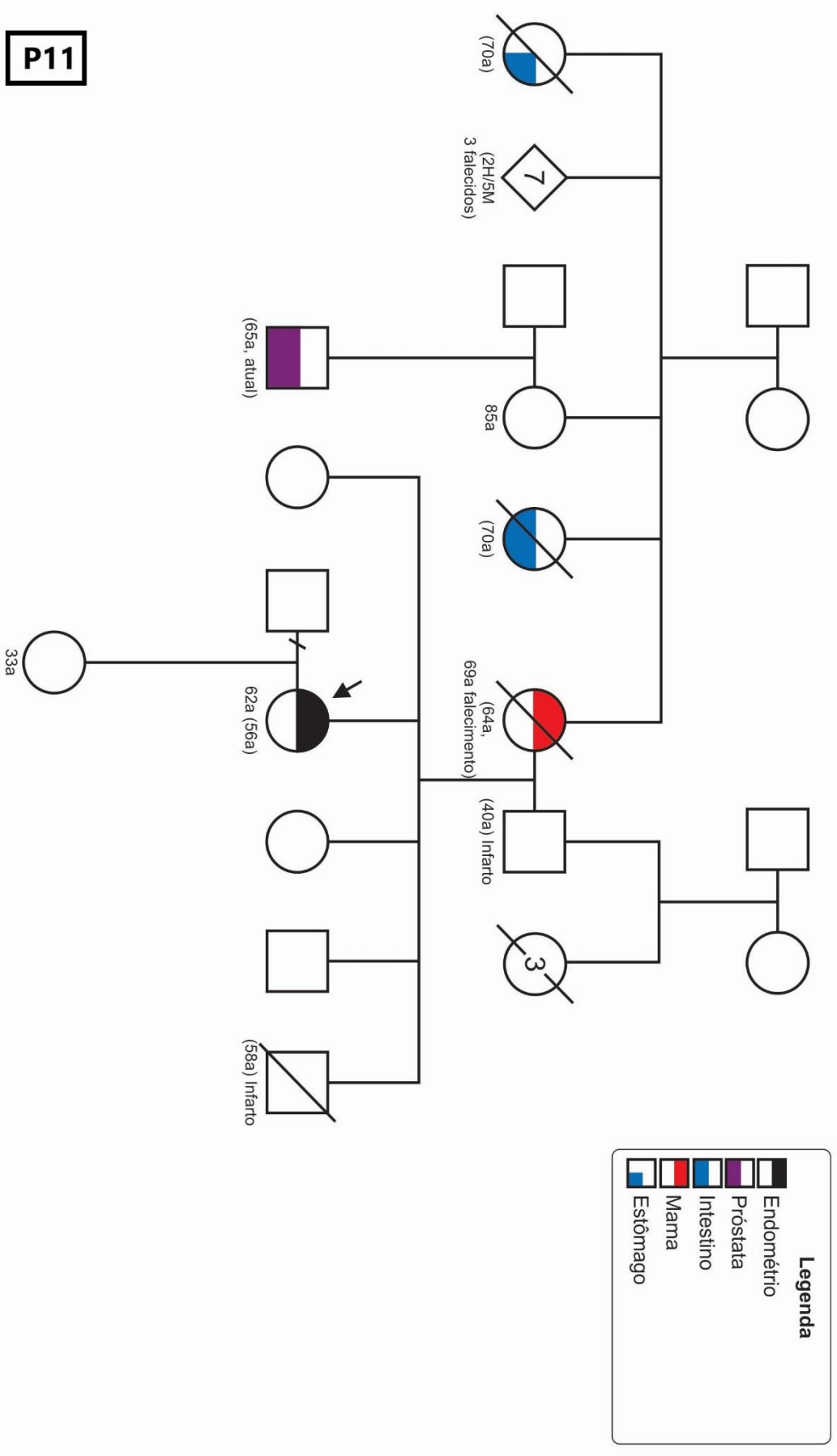


P08

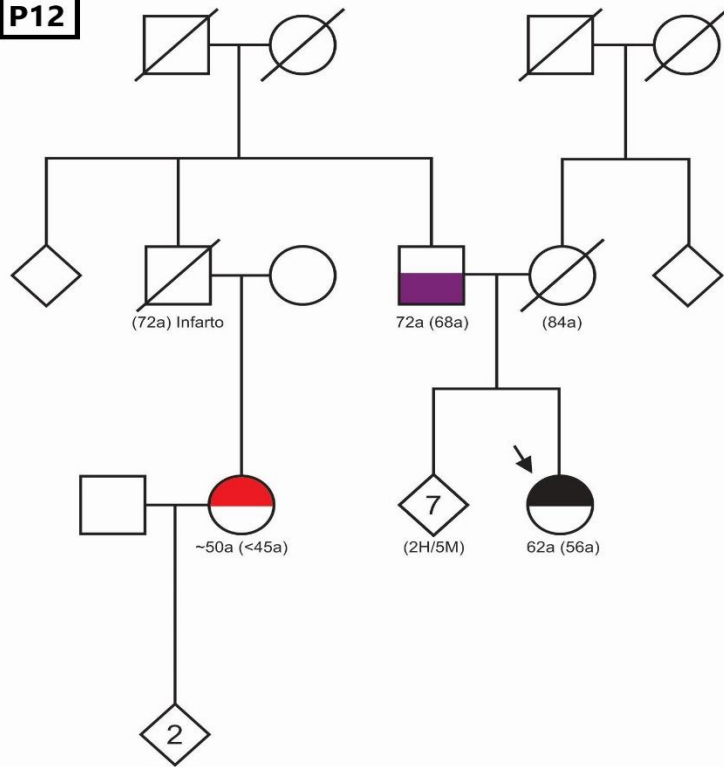








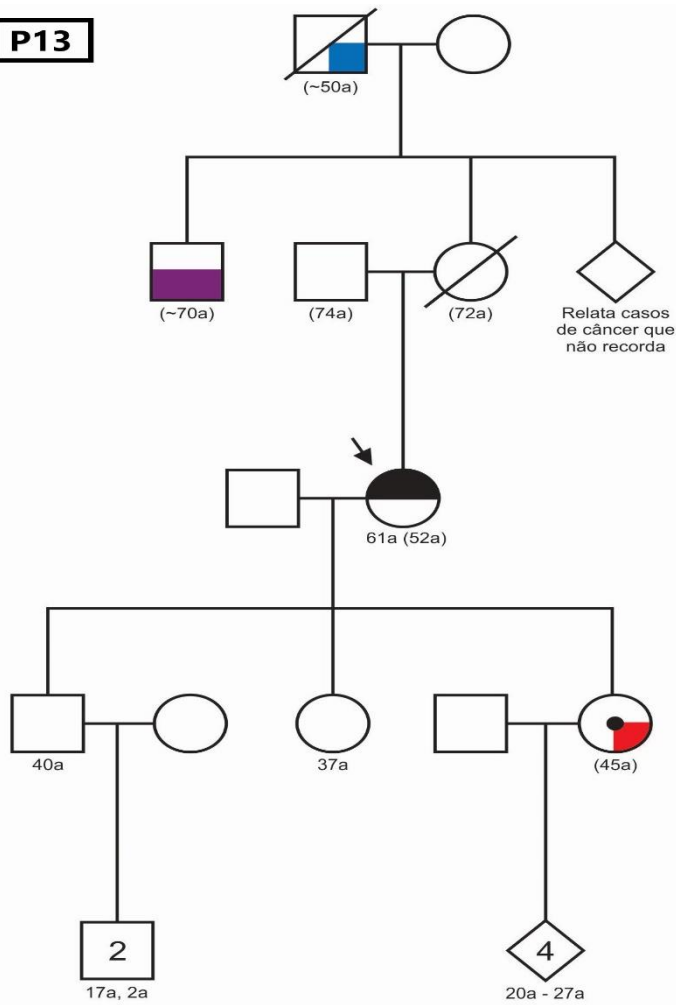
P12



Legenda

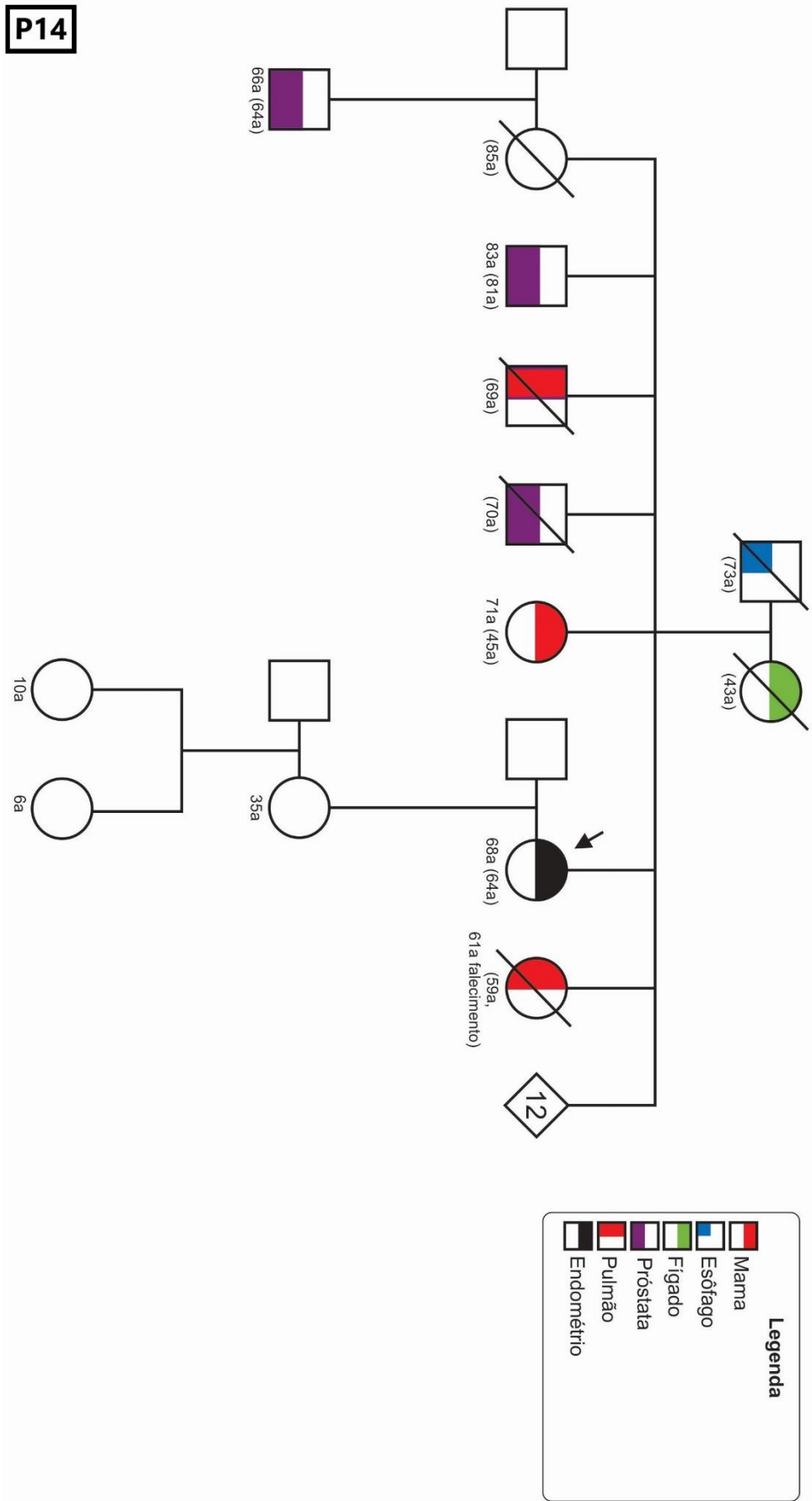
- Prostata
- Endométrio
- Mama

P13

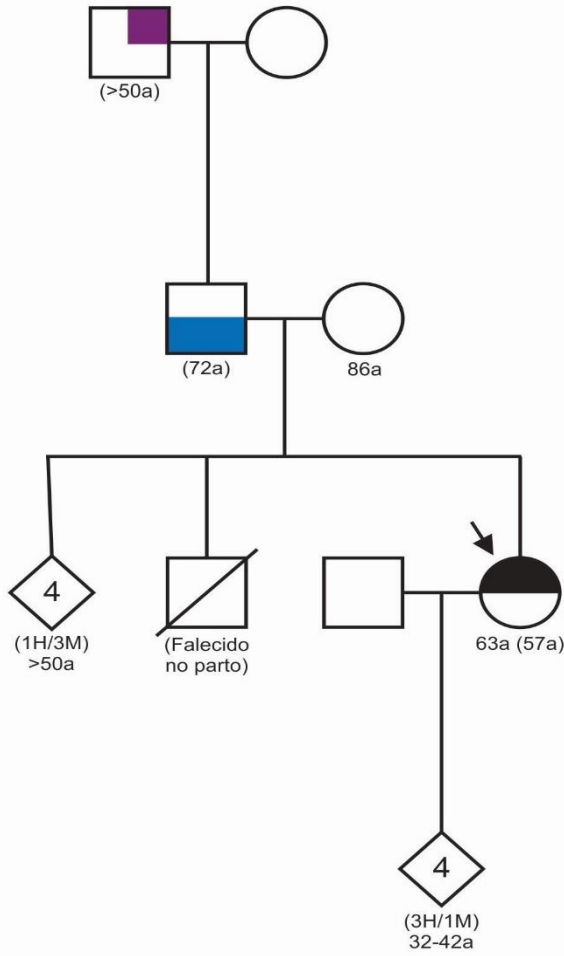


Legenda

- Prostata
- Endométrio
- Nódulo Mama
- Estômago



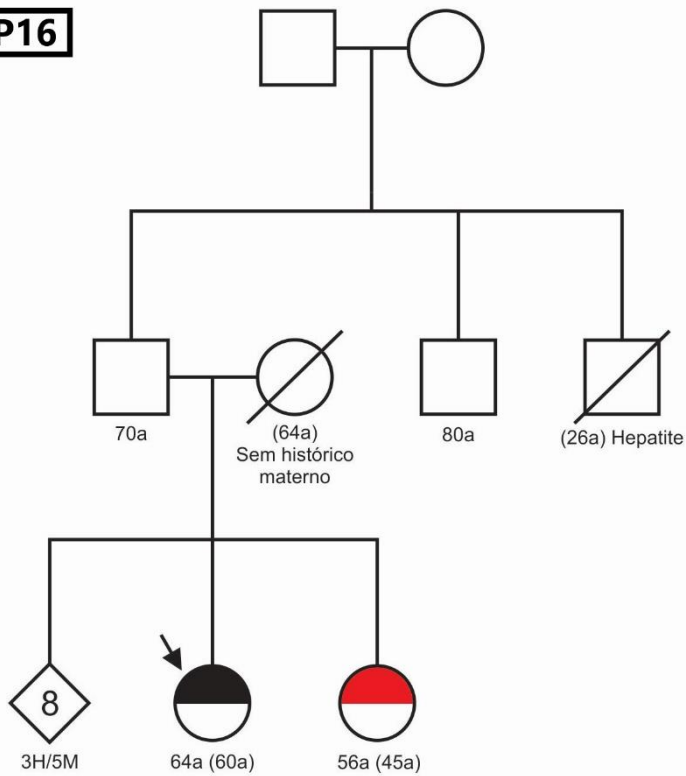
P15



Legenda

- Intestino/Bexiga
- Intestino
- Endométrio

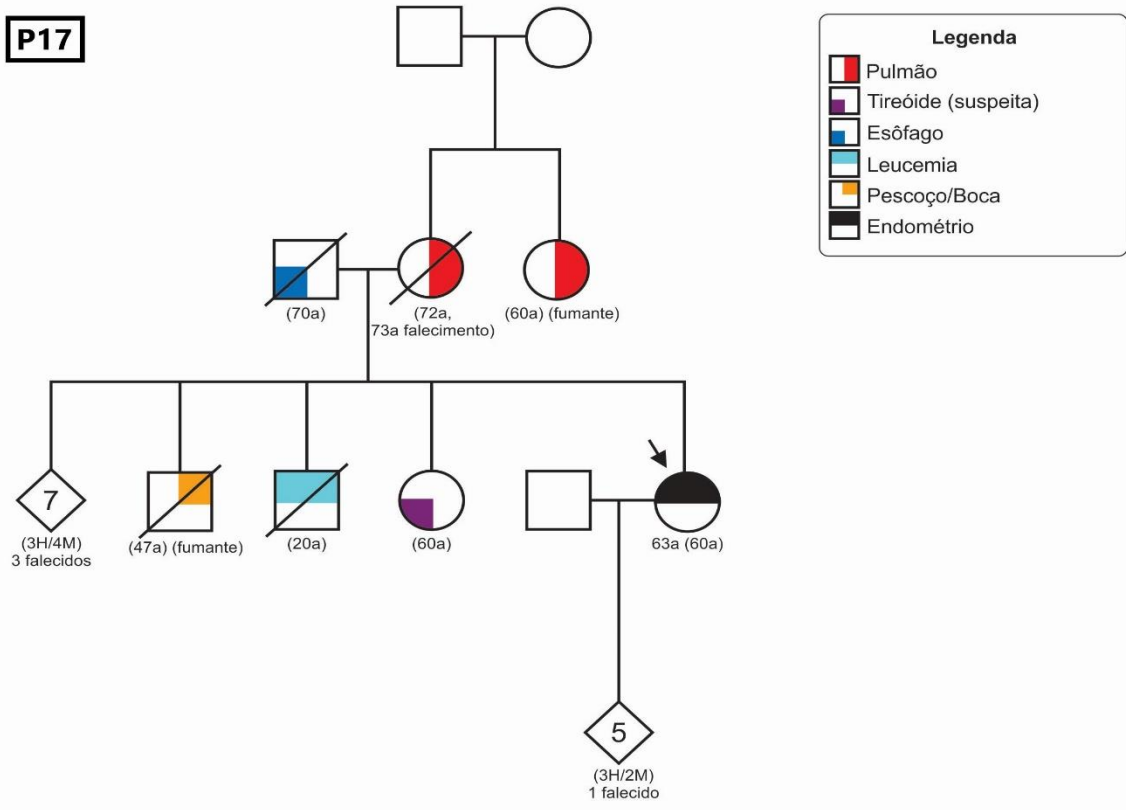
P16



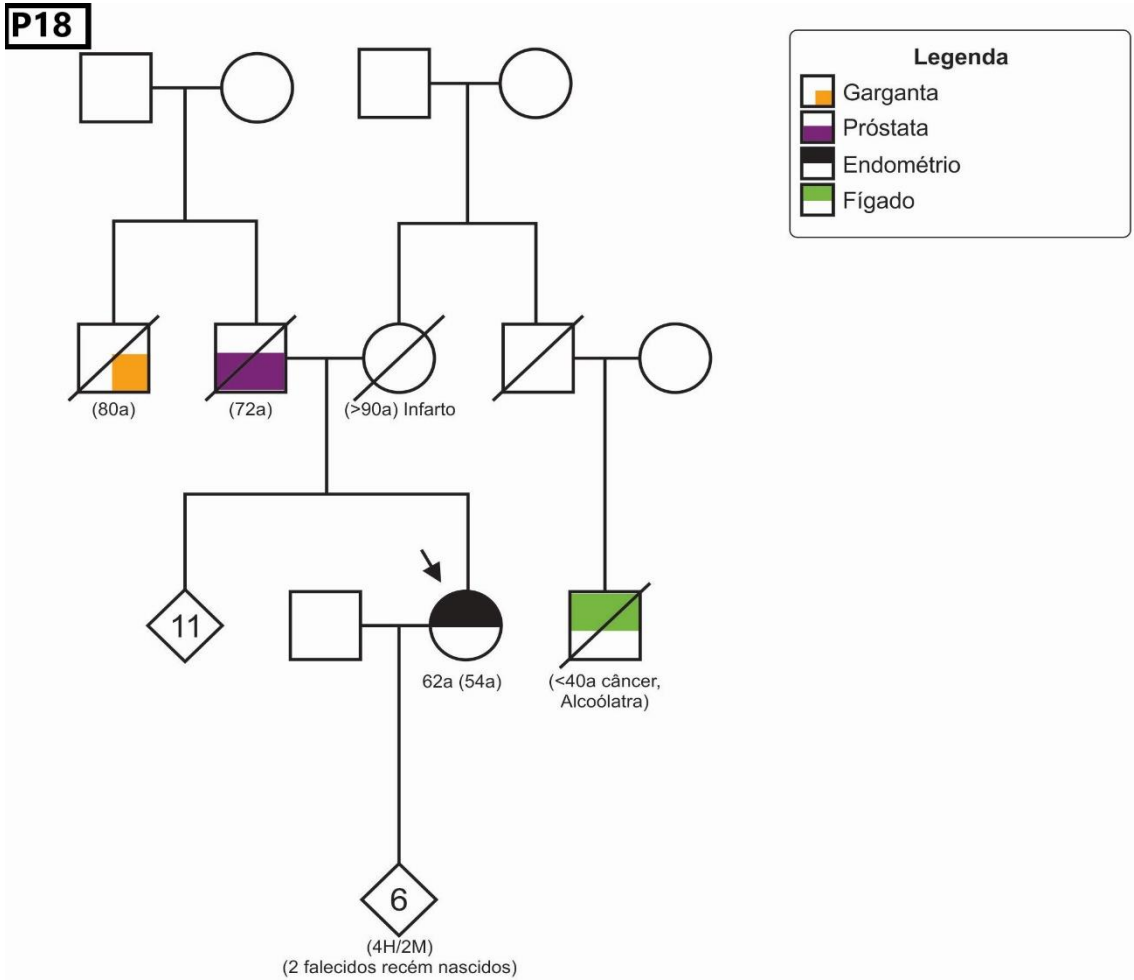
Legenda

- Mama
- Endométrio

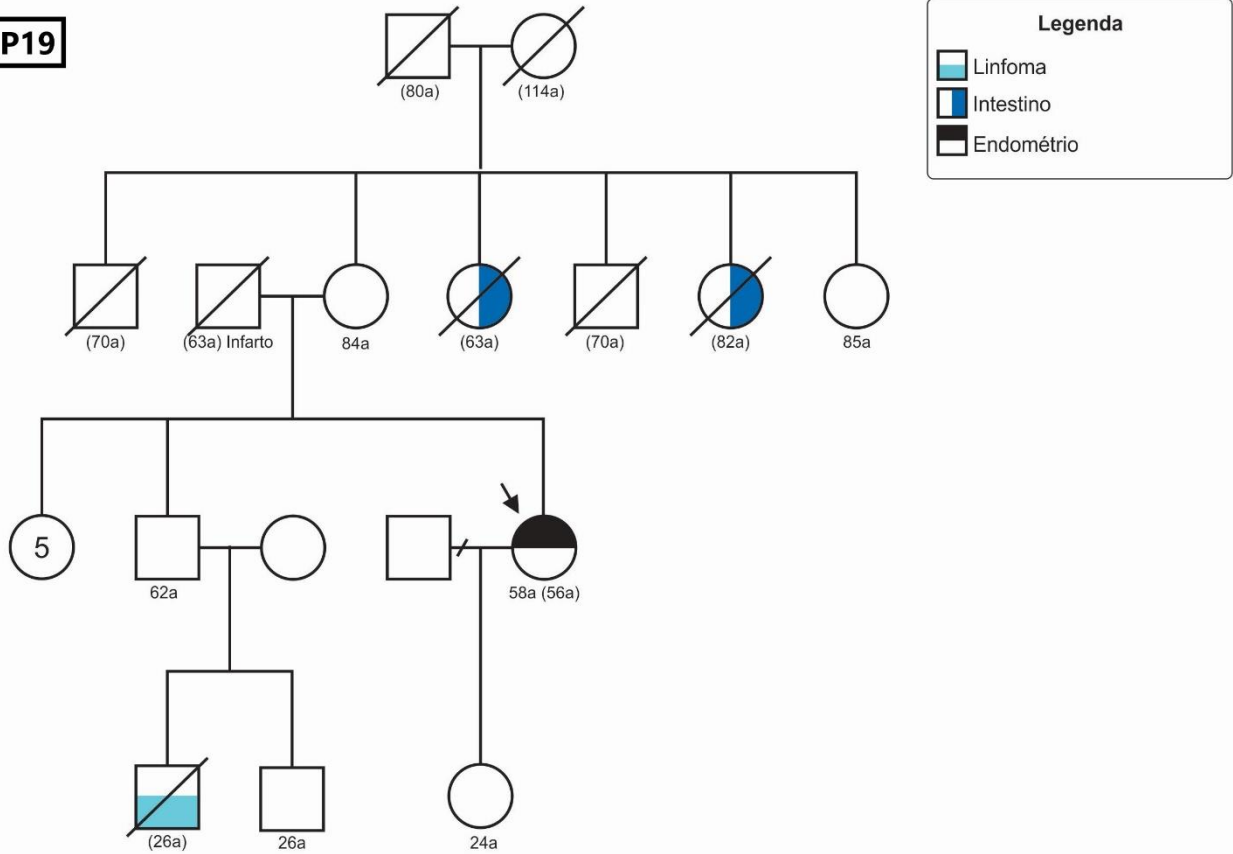
P17

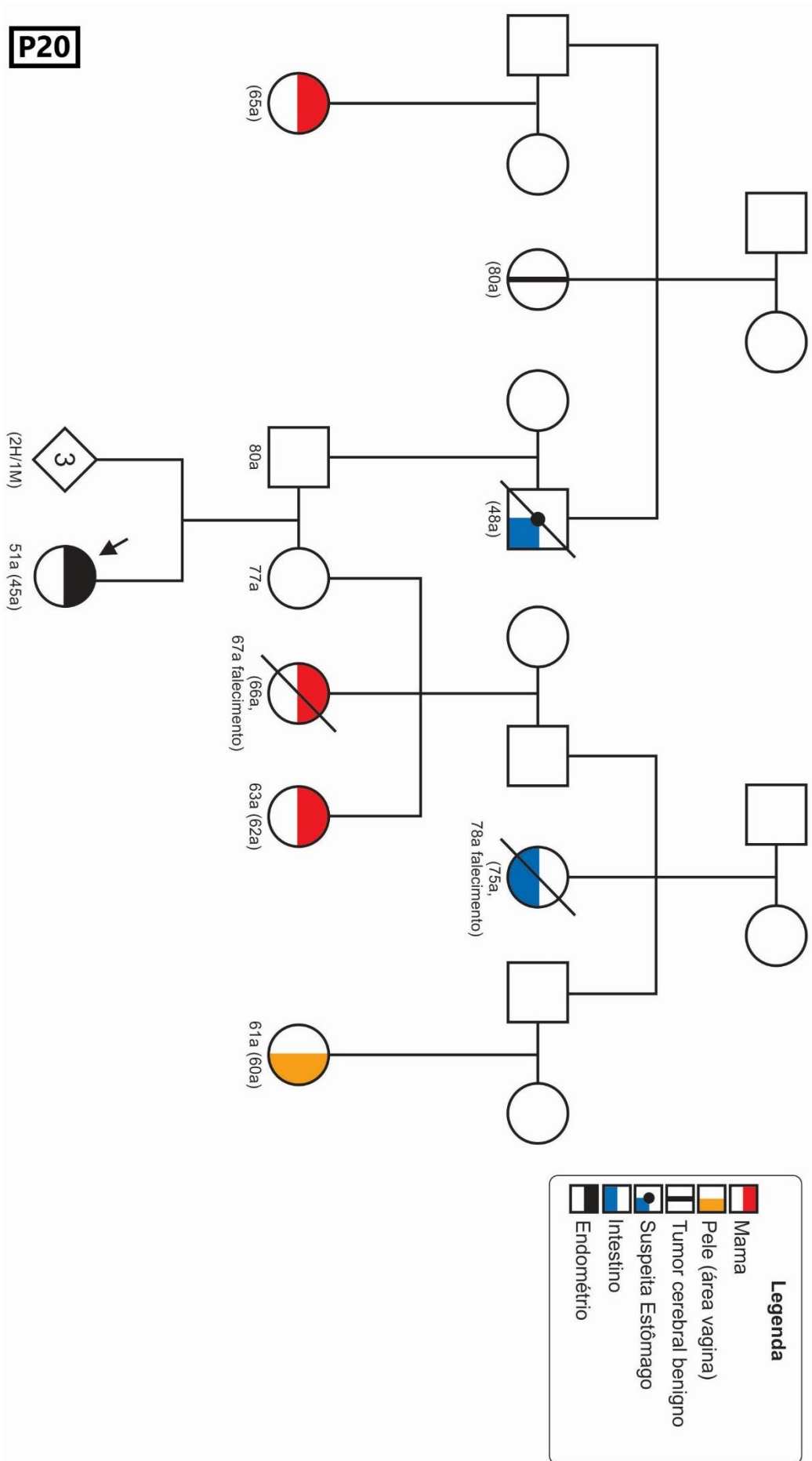


P18

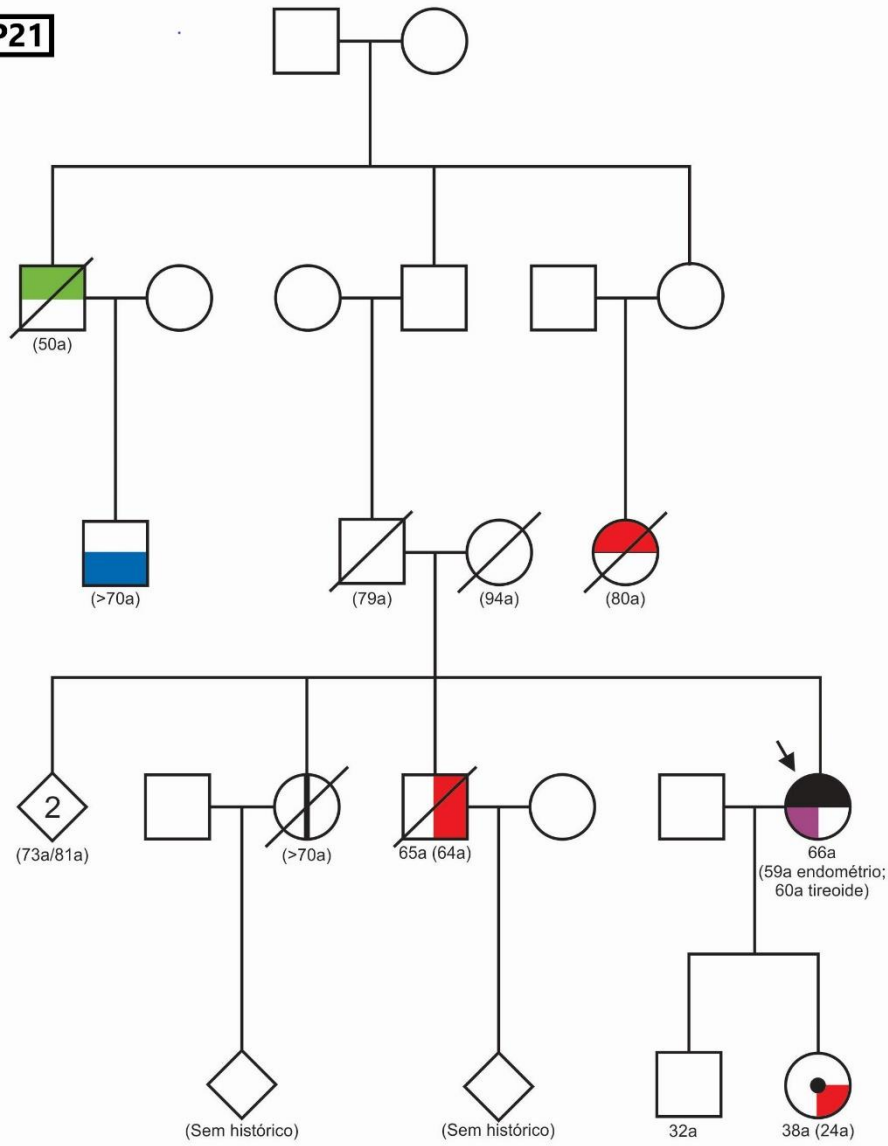


P19



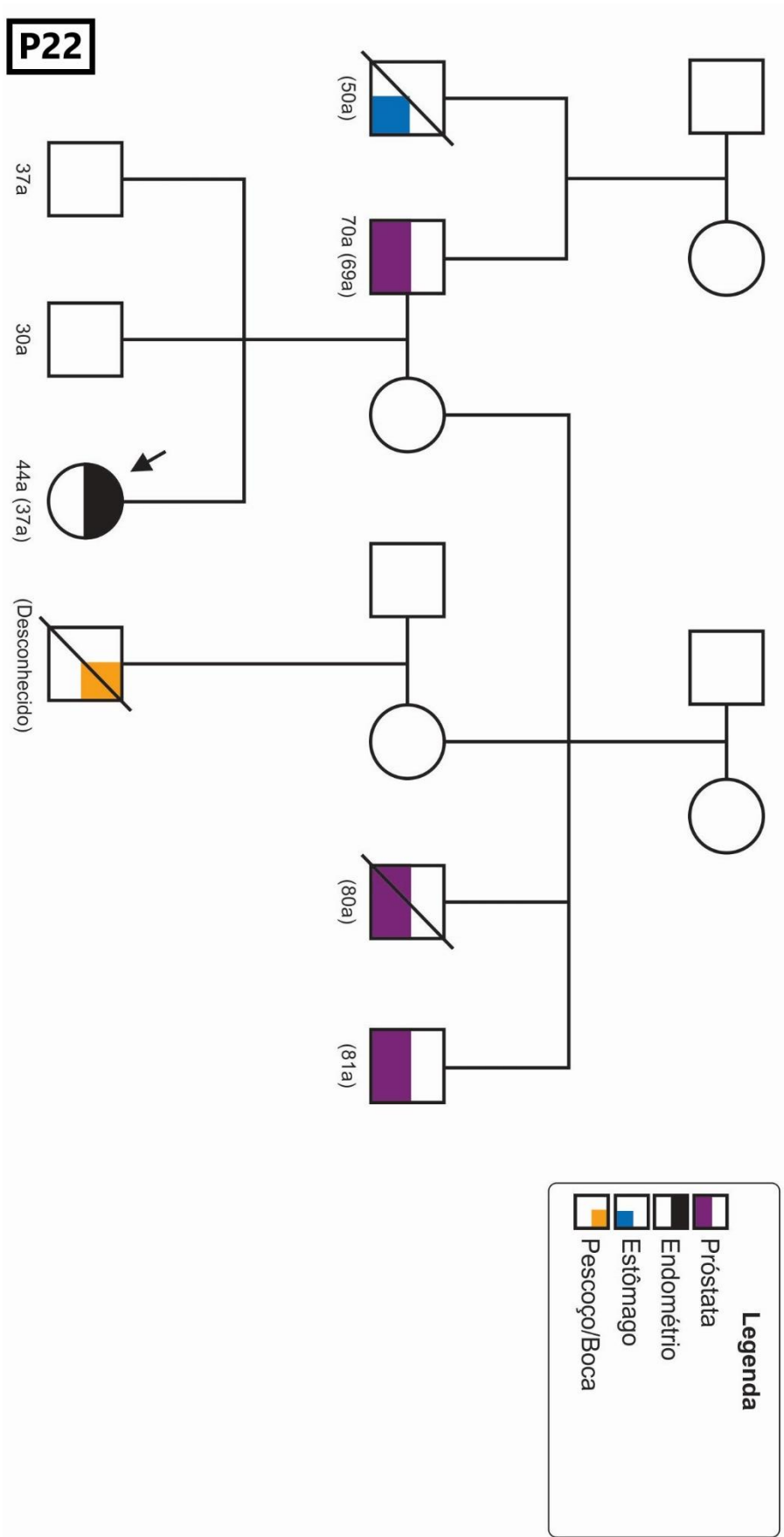


P21



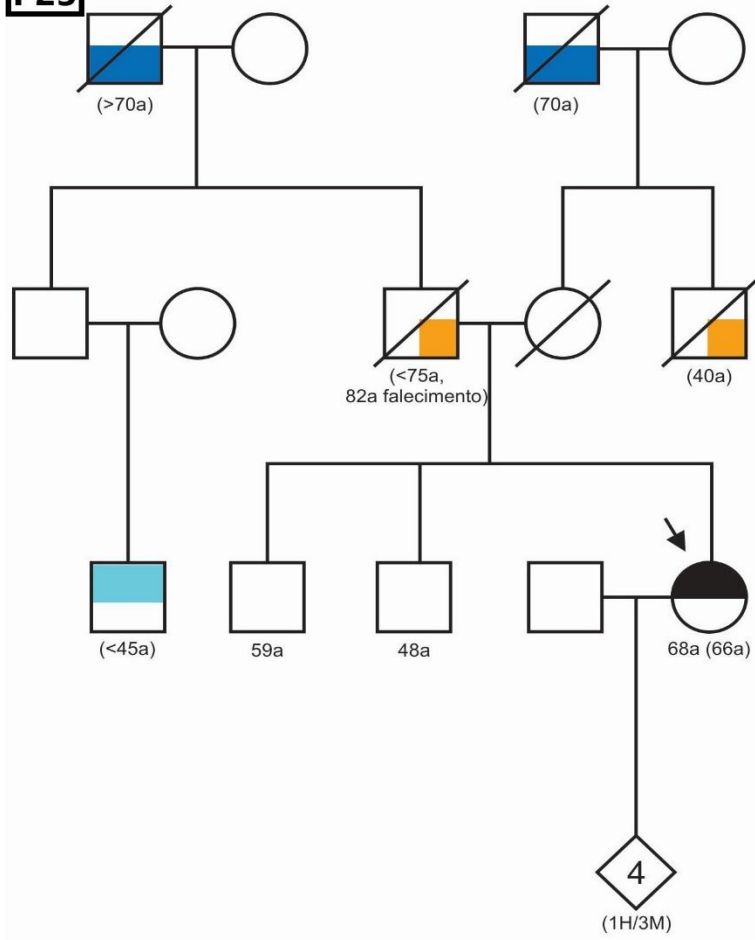
Legenda

-  Mama
-  Intestino
-  Nódulo Mama
-  Tireoide
-  Pulmão
-  Tumor cabeça
-  Endométrio
-  Fígado



Apêndices

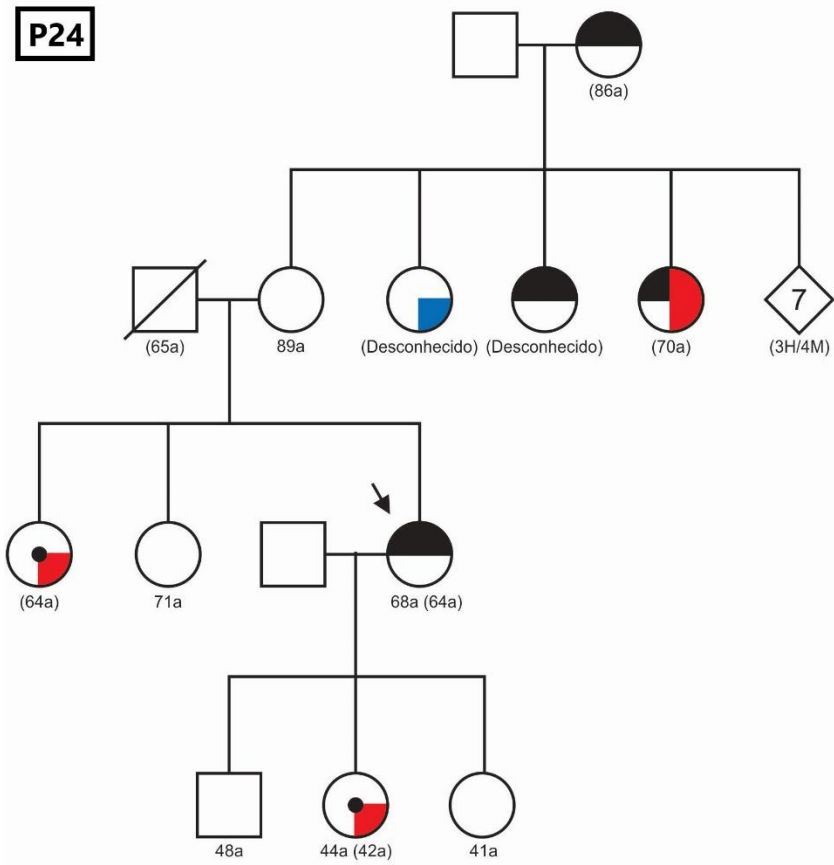
P23



Legenda

- Garganta
- Intestino
- Endométrio
- Leucemia

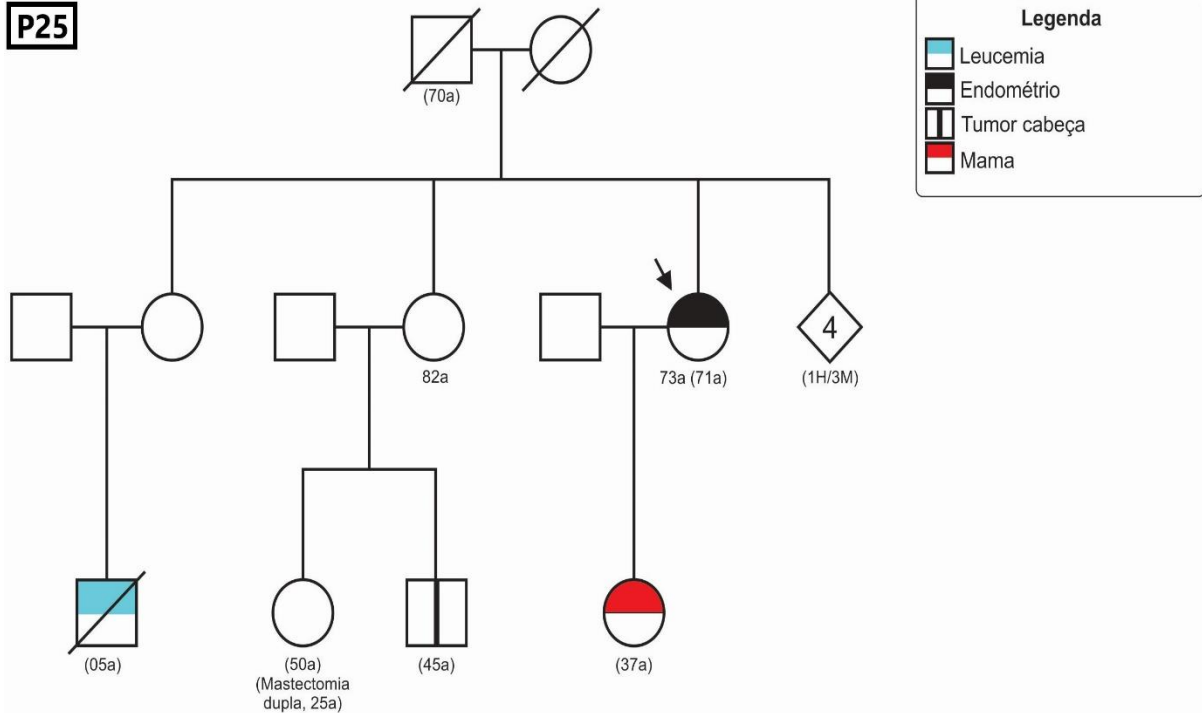
P24



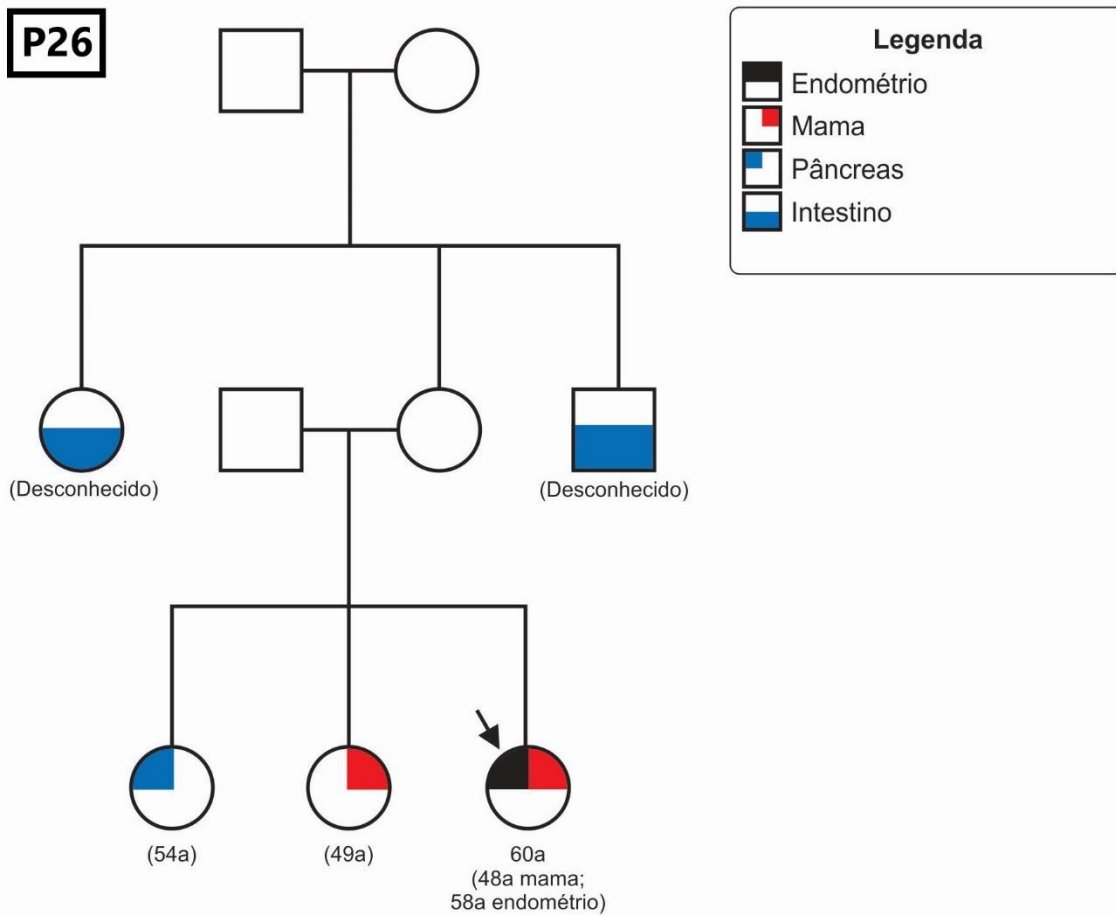
Legenda

- Nódulo Mama
- Estômago
- Endométrio
- Pulmão

P25



P26

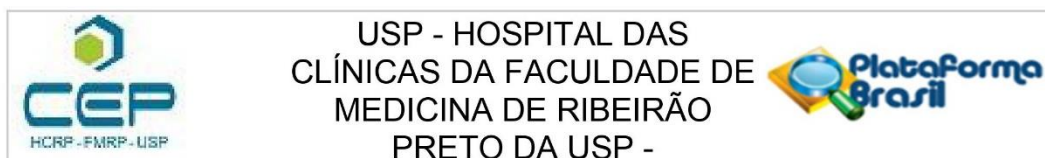


ANEXOS

9. ANEXOS

9.1 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP

9.1.1 Aprovação do projeto original



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de predisposição hereditária a câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento.

Pesquisador: Jessica Oliveira de Santis

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 13694619.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.474.021

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa para a investigação de predisposição hereditária ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento. Um dos principais problemas encontrado no câncer de endométrio é a limitação dos estudos direcionados apenas para genes com mutações já associadas a síndromes clínicas conhecidas. O presente projeto propõe a criação de um painel de genes que possam representar diversos genes de reparo presentes em vias distintas, assim como genes responsáveis por adesão celular, sinalização de estresse e recombinação.

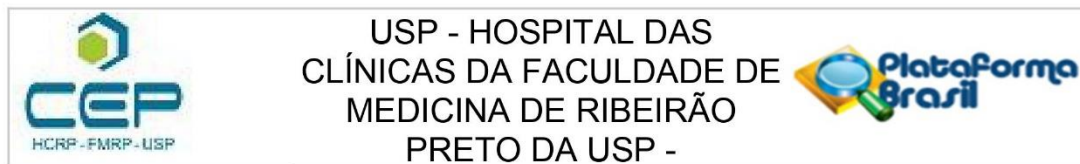
Objetivo da Pesquisa:

Determinar presença de mutações germinativas em regiões codificadoras e regulatórias de genes de predisposição ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema MMR, com histórico familiar e/ou pessoal de câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O estudo possui risco mínimo. Incluem os riscos da coleta de sangue periférico, onde será utilizada uma agulha fina, o que pode causar desconforto, dor local e, raramente, uma marca roxa que desaparecerá em pouco tempo, sem nenhum risco para a saúde; riscos relacionados ao

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.474.021

diagnóstico de mutações patogênicas, o que pode gerar desconforto a paciente, porém a mesma só receberá o resultado do seu estudo se concordar com o mesmo; riscos relacionados a perda de sigilo, que serão evitados pelo uso de códigos numéricos para identificação das pacientes, e da anonimidade, sendo que apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso a qualquer dado fornecido pela paciente.

Benefícios: O projeto apresenta os benefícios do conhecimento adquirido sobre mutações germinativas que caracterizam predisposição ao câncer de endométrio, tanto para a paciente quanto para a comunidade científica. A avaliação das pacientes por uma metodologia de painel será importante para triagem das mutações mais prevalentes que devem ser estudadas em casos de indicação clínica de síndromes familiares que incluam câncer de endométrio. Para as pacientes, os resultados poderão contribuir para um aumento na qualidade e expectativa de vida tanto das pacientes quanto de seus familiares que também podem estar em risco para o desenvolvimento de câncer caso eles também sejam portadores das mutações estudadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto proposto é relevante e propõe o estudo de alterações genéticas que possam auxiliar na avaliação de risco e predisposição ao desenvolvimento de câncer de endométrio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto proposto é relevante e propõe o estudo de alterações genéticas que possam auxiliar na avaliação de risco e predisposição ao desenvolvimento de câncer de endométrio.

Recomendações:

Foram atendidas adequadamente as recomendações solicitadas no parecer anterior.

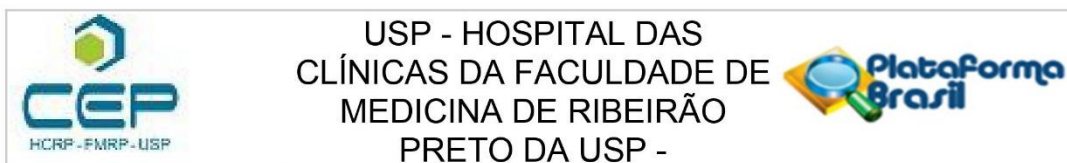
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 02, 25 de Junho de 2019, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico versão 02 data 25 Junho 2019, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.474.021

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1322495.pdf	26/06/2019 13:38:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JessicaSantis_MESTRADO_ver_sao2.pdf	26/06/2019 13:37:52	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP.pdf	25/06/2019 11:56:12	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio_JessicaSantis_ver_sao2.pdf	25/06/2019 11:55:17	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Consentimentodeguardadematerial_JessicaSantis.pdf	14/05/2019 15:44:58	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartaCriacaoBiorrepositorio_JessicaSantis.pdf	14/05/2019 15:44:13	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JessicaSantis_MESTRADO.pdf	14/05/2019 15:43:53	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Orçamento	AprovacaoOrçamento_JessicaSantis.pdf	06/05/2019 14:03:08	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_JessicaSantis.pdf	06/05/2019 13:59:11	Jessica Oliveira de Santis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

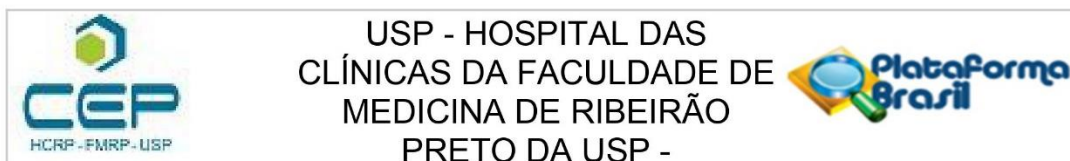
RIBEIRAO PRETO, 29 de Julho de 2019

Assinado por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

9.1.2 Aprovação da emenda do projeto



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação de predisposição hereditária a câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema de reparo de malpareamento.

Pesquisador: Jessica Oliveira de Santis

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 13694619.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.841.769

Apresentação do Projeto:

Trata-se de EMENDA ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 10 de fevereiro de 2020.

Resumo:

Câncer de endométrio (CE) é considerado como a neoplasia mais comum em mulheres, e além de fatores ambientais e de hábitos de vida, o histórico familiar é considerado um fator de risco independente, estando relacionados à origem de cerca de 5% de todos os casos de CE. Algumas síndromes já apresentam uma associação conhecida com câncer de endométrio, como síndrome de Cowden, Peutz-Jeghers, e Lynch, que apresenta um defeito no sistema MMR e tem a com maior prevalência entre os casos, sendo, portanto, essa mutação germinativa a mais encontrada. O objetivo deste trabalho é analisar uma possível correlação entre mulheres com câncer de endométrio sem instabilidade de microssatélite com história sugestiva de predisposição hereditária, com alguma síndrome ou variante nova ou já descrita. O projeto será realizado em uma casuísta de mulheres com câncer de endométrio proficiente para o sistema de reparo de malpareamento, que tenham histórico pessoal e/ou familiar de câncer. Para todas que forem incluídas como de alto risco para predisposição pelos critérios do histórico coletado, será realizado sequenciamento por NGS e análise de mutações germinativas, e conseguinte todas as

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

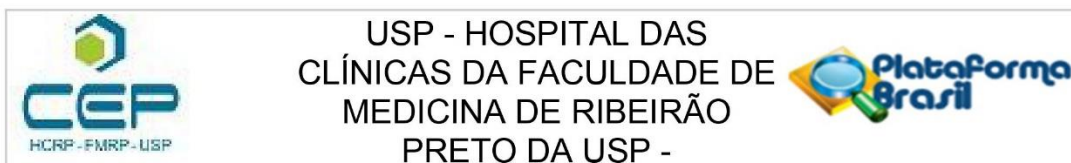
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.841.769

mutações encontradas serão caracterizadas e validadas quanto o grau de patogenicidade.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar presença de mutações germinativas em regiões codificadoras e regulatórias de genes de predisposição ao câncer em mulheres com câncer de endométrio proficientes para o sistema MMR, com histórico familiar e/ou pessoal de câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo possui risco mínimo. Incluem os riscos da coleta de sangue periférico, onde será utilizada uma agulha fina, o que pode causar desconforto, dor local e, raramente, uma marca roxa que desaparecerá em pouco tempo, sem nenhum risco para a saúde; riscos relacionados ao diagnóstico de mutações patogênicas, o que pode gerar desconforto a paciente, porém a mesma só receberá o resultado do seu estudo se concordar com o mesmo; riscos relacionados a perda de sigilo, que serão evitados pelo uso de códigos numéricos para identificação das pacientes, e da anonimidade, sendo que apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso a qualquer dado fornecido pela paciente; risco associados ao contato com familiares para análise de segregação, para evitar desconfortos nesses casos, a paciente será inicialmente contatada e consultada sobre o estudo, antes do contato ser estendido aos familiares.

Benefícios:

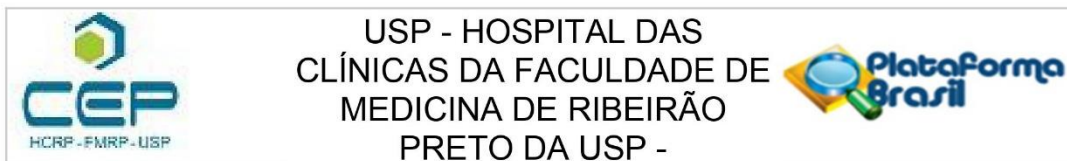
O projeto apresenta os benefícios do conhecimento adquirido sobre mutações germinativas que caracterizam predisposição ao câncer de endométrio, tanto para a paciente quanto para a comunidade científica. A avaliação das pacientes por uma metodologia de painel será importante para triagem das mutações mais prevalentes que devem ser estudadas em casos de indicação clínica de síndromes familiares que incluam câncer de endométrio. Para as pacientes, os resultados poderão contribuir para um aumento na qualidade e expectativa de vida tanto das pacientes quanto de seus familiares que também podem estar em risco para o desenvolvimento de câncer caso eles também sejam portadores das mutações estudadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

A inclusão das metodologias tem como objetivo investigar com maior precisão o efeito das variantes germinativas na predisposição ao câncer. Os resultados encontrados no projeto em andamento apresentaram questões em relação ao efeito das variantes que não puderam ser respondidas pela metodologia que já foi aprovada. A análise das variantes somáticas do tecido

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.841.769

tumoral permitirá que seja feito um estudo comparativo entre dados de ambos sequenciamentos (sangue e tumor), podendo esclarecer as etiologias dos cânceres. Em adicional, para que seja possível analisar qual a penetrância da variante e, assim, determinar grau de efeito patogênico na predisposição ao câncer, é importante realizar um estudo de segregação da variante na família, em familiares com ou sem histórico de câncer. Para isso, precisamos determinar, entre os familiares, quem é portador da variante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos da emenda:

- AndamentoMestrado_JessicaSantis.pdf
- Carta_AutorizacaoUsoBlocosParafina_JessicaSantis.pdf
- Carta_DispensaTCLE_JessicaSantis.pdf
- Carta_ApresentacaoJustificativaEmenda_JessicaSantis.pdf
- Projeto_JessicaSantis_Versao3.pdf

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

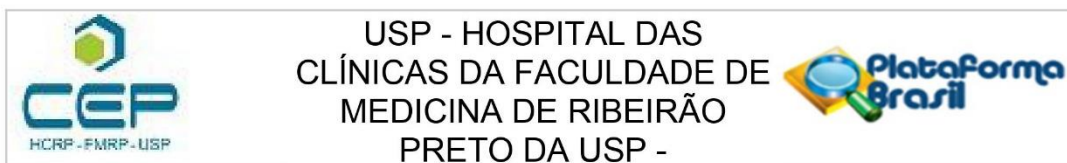
O CEP analisou e aprovou a EMENDA bem como o Projeto de pesquisa Mestrado Versão 03, 10 de Fevereiro 2020 e a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O CEP tomou ciência do Relatório parcial.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1506421_E1.pdf	10/02/2020 16:44:52		Aceito
Outros	AndamentoMestrado_JessicaSantis.pdf	10/02/2020 16:42:29	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Outros	Carta_AutorizacaoUsoBlocosParafina_JessicaSantis.pdf	10/02/2020 16:41:51	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_DispensaTCLE_JessicaSantis.pdf	10/02/2020 16:41:14	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Solicitação	Carta_ApresentacaoJustificativaEmen	10/02/2020	Jessica Oliveira de	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.841.769

Assinada pelo Pesquisador Responsável	da_JessicaSantis.pdf	16:41:01	Santis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JessicaSantis_Versao3.pdf	10/02/2020 16:40:07	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP.pdf	25/06/2019 11:56:12	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio_JessicaSantis_ver sao2.pdf	25/06/2019 11:55:17	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartaCriacaoBiorrepositorio_JessicaSan tis.pdf	14/05/2019 15:44:13	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Orçamento	AprovacaoOrçamento_JessicaSantis.pdf	06/05/2019 14:03:08	Jessica Oliveira de Santis	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_JessicaSantis.pdf	06/05/2019 13:59:11	Jessica Oliveira de Santis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:



Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

9.2 Carta de autorização de uso do tecido fixado em formalina e embebido em blocos de parafina



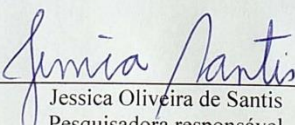
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CARTA DE AUTORIZAÇÃO DE USO DO TECIDO FIXADO EM FORMALINA E
EMBEBIDO EM BLOCOS DE PARAFINA

Ribeirão Preto, 07 de Fevereiro de 2020.

A Profª. Drª. Leandra Naira Zambelli Ramalho,

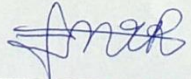
Eu, Jessica Oliveira de Santis (nº USP 11189714), aluna de mestrado do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), solicito autorização para uso do material (blocos de parafina de carcinomas de endométrio) do Arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) para realização da pesquisa intitulada **INVESTIGAÇÃO DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER EM MULHERES COM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO PROFICIENTES PARA O SISTEMA DE REPARO DE MALPAREAMENTO.**



Jessica Oliveira de Santis
Pesquisadora responsável

Ciência e concordância da chefia do SERPAT-HCRP:

Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2019.



Profª. Drª Leandra Naira Zambelli Ramalho

Scanned by CamScanner