

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

REGINALDO CRUZ ALVES ROSA

Caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA

RIBEIRÃO PRETO

2018

REGINALDO CRUZ ALVES ROSA

Caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Rosa, Reginaldo Cruz Alves

Caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA. Ribeirão Preto, 2018.

102 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Victor Evangelista de Faria Ferraz.

1. Câncer de endométrio. 2. Instabilidade de Microssatélites. 3. Síndrome de Lynch.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: ROSA, Reginaldo Cruz Alves

Título: Caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz, pelos inúmeros e valiosos ensinamentos transmitidos durante todo este período, com certeza eles contribuíram em muito para meu aprimoramento profissional e pessoal. Agradeço ainda por ter aceitado me orientar e por ter acreditado e confiado em mim, desde o primeiro dia de mestrado. Muito obrigado pela orientação totalmente presente e dedicação constante durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética por toda a infraestrutura e suporte. Em especial, agradeço à Susie Adriana Ribeiro Penha Nalon pela disponibilidade constante em me auxiliar com as inúmeras dúvidas que surgiram durante esta caminhada acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), pelo auxílio financeiro utilizado para a execução deste trabalho.

Aos professores que, por meio das disciplinas e palestras ministradas, contribuíram para minha formação como geneticista, professor e pesquisador.

Aos Prof.(s) Dr. Fernando Chahud e Alfredo Ribeiro Silva, docentes do Departamento de Patologia da FMRP/USP, por todo o auxílio e disponibilidade durante a execução da primeira etapa experimental deste trabalho. Em especial, agradeço à Mônica, Márcia e à Laura pela disponibilidade integral e ajuda com a construção dos blocos de TMAs e reações de imunohistoquímica.

A todos do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (FMRP/USP), em nome do Prof. Dr. Wilson Marques, por terem me acolhido como parte do grupo durante grande parte da etapa experimental deste trabalho. Em especial, à Sandra e à Daiana, por terem me ensinado, com profissionalismo, sabedoria, paciência e carinho, como trabalhar de forma adequada em uma bancada de Biologia Molecular.

A toda equipe do Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto por me acolherem como membro da equipe e por estarem sempre prontos a me ajudar. Em especial, agradeço à Márcia, Fátima, Rayanna, Thereza, Clarissa, Profa. Milena, Thalita e Vanessa, pela amizade, bons momentos e crescimento profissional mútuo em Oncogenética. Agradeço de forma especial à Lorena Alves Teixeira, por ter se tornado uma grande amiga e por confiar e acreditar sempre em meu potencial. Muito obrigado por ser uma pessoa a qual eu

tenho certeza que posso sempre contar. Muitos desafios nos aguardam e juntos venceremos todos eles.

A todos os amigos conquistados durante minha estadia na pensão da Jô, em especial à Juliana, Joelma, Fábio e Rodrigo que me proporcionaram momentos de alegria e descontração inesquecíveis. Em especial, agradeço à Jô por ter sido uma verdadeira mãe durante meus primeiros meses em Ribeirão Preto, e por ter se tornado uma grande amiga.

Ao Hugo e ao Romário, por terem se tornado mais do que amigos, verdadeiros irmãos, durante essa caminhada. Compartilhamos muitos momentos juntos, comemoramos os bons e nos fortalecemos uns aos outros nos maus. Muito obrigado por tudo.

Aos diversos amigos que a pós-graduação me trouxe, em especial ao Max, Simone, Tatiana, Victória, Verena, Isabela, Diana, Camila, Gabriela Maciel, Maritza, Maria Luiza, Nádia, Gabriela Diniz e tantos outros que se tornaram companheiros nessa caminhada acadêmica, cheia de desafios e incertezas. A caminhada com vocês é bem mais leve.

A toda minha família, em especial à minha mãe, por ser a fonte constante e inesgotável de onde eu retiro toda a motivação e perseverança para não desistir e continuar caminhando, mesmo em momentos difíceis.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ROSA, Reginaldo Cruz Alves. **Caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA**. 2018. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O câncer de endométrio (CE) é o tipo de neoplasia mais comum do aparelho reprodutor feminino. Cerca de noventa por cento dos casos deste tipo de câncer são esporádicos e os dez por cento restantes estão associados a fatores genéticos. A Síndrome de Lynch (SL) é uma afecção genética de predisposição hereditária a câncer que é responsável por grande parcela dos casos de CE hereditários. Os tumores que se desenvolvem em portadores dessa síndrome são, geralmente, deficientes do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR) e esta característica molecular pode ser detectada por imuno-histoquímica (IHQ) das principais proteínas desse sistema de reparo (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) ou pela análise de instabilidade de microssatélites (MSI). Adicionalmente, a análise de metilação no promotor do gene *MLH1* é utilizada para identificar casos esporádicos de câncer de endométrio. A identificação de portadores da SL é crucial para o correto aconselhamento genético e seguimento dos indivíduos afetados e de suas respectivas famílias, tendo em vista que essa síndrome aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento de diversos outros tipos de câncer. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR em uma casuística brasileira não selecionada. Casos de adenocarcinoma endometriode de endométrio foram caracterizados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR e os dados moleculares obtidos foram correlacionados com características clínico-patológicas. Cento e vinte e sete casos de CE foram caracterizados quanto à proficiência do sistema MMR e foram distribuídos em três categorias: 17/127 (13,39%) tumores dMMR Metilados (deficientes do sistema de reparo MMR por serem negativos para a expressão da proteína MLH1, com presença de metilação no promotor do gene *MLH1*); 52/127 (40,94%) tumores dMMR Não-metilados (negativos para a expressão de uma ou mais das quatro proteínas avaliadas por imuno-histoquímica ou tumores exibindo instabilidade de microssatélites, com ausência de metilação no promotor do gene *MLH1*) e, por fim, 58/127 (45,67%) tumores pMMR (proficientes da atividade do sistema MMR por expressarem as quatro proteínas de reparo avaliadas e não apresentarem instabilidade de microssatélites). Das características clínico-patológicas avaliadas, a presença de invasão tumoral em região angiolinfática demonstrou estar significativamente ($p=0,006$ – Teste do Qui Quadrado) associada à deficiência do sistema de reparo MMR. Tumores de endométrio classificados como dMMR Metilado exibiram invasão angiolinfática com maior frequência do que tumores dMMR Não-metilados ($p=0,002$) e do que tumores pMMR (0,0129). Não foi observada diferença estatística ($p=0,4759$) entre os tumores dMMR Não-metilados e os pMMR. A perda de expressão da proteína MSH6 foi o evento mais frequente e tem sido pouco relatado na literatura. A análise de MSI identificou 11 tumores deficientes do sistema MMR que não foram detectados pela técnica de IHQ. A análise de mutações germinativas em genes associados à síndrome de Lynch é fortemente recomendada para as mulheres cujos tumores de endométrio foram caracterizados como sendo deficientes do sistema de reparo MMR.

Palavras-chave: Câncer de endométrio. Instabilidade de Microssatélites. Síndrome de Lynch.

ABSTRACT

ROSA, Reginaldo Cruz Alves. **Molecular characterization of endometrial tumors for the proficiency of the DNA-Mismatch repair system.** 2018. 102 f. Dissertation (Master's degree in Genetics) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecologic malignancy in the world. About ninety percent of the cases of this type of cancer are sporadic and the remaining cases are associated with genetic factors. Lynch syndrome (LS) is a genetic disorder of hereditary predisposition to cancer that is responsible for a large portion of cases of hereditary CE. Tumors developed in LS carriers are generally deficient of the DNA mismatch repair system (MMR). This molecular feature can be detected by immunohistochemistry (IHC) of the main proteins of this repair system (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) or by microsatellite instability analysis (MSI). In addition, methylation analysis in the promoter of the *MLH1* gene is used to identify sporadic cases of endometrial cancer. The identification of LS carriers is crucial for the correct genetic counseling and follow up of the affected individuals and their respective relatives, since this syndrome increases the risk of development of several other types of cancer. Thus, the objective of this study was to characterize endometrial tumors for the proficiency of the MMR system in a Brazilian series of unselected EC. Cases of endometrioid adenocarcinoma of the endometrium were characterized for the proficiency of the MMR repair system and the molecular data were correlated with clinicopathologic characteristics. One hundred and twenty-seven EC cases were characterized for the MMR proficiency and were distributed into three categories: 17/127 (13.39%) Methylated dMMR tumors (MMR repair system deficient, since they were negative for the expression of the MLH1 protein in association with the presence of methylation in the *MLH1* promoter); 52/127 (40.94%) Non-Methylated dMMR tumors (negative for the expression of one or more of the four proteins assessed by IHC or tumors exhibiting microsatellite instability, with no methylation in the promoter of the *MLH1* gene); and, finally, 58/127 (45.67%) pMMR tumors (MMR system proficient, since they expressed the four proteins evaluated and did not present microsatellite instability). Of the clinicopathologic characteristics evaluated, the presence of tumor invasion in the angiolymphatic region was shown to be significantly ($p = 0.006$ - Chi-square test) associated with the MMR repair system deficiency. EC classified as Methylated dMMR exhibited angiolymphatic invasion more frequently than the Non-Methylated dMMR tumors ($p = 0.002$) and more frequently than the tumors classified as pMMR ($p=0.0129$). No statistical difference ($p=0.4759$) was observed between the Non-Methylated dMMR and the pMMR endometrial tumors. Loss of MSH6 was the most frequent event and has been little reported in the literature. MSI analysis identified 11 tumors deficient for the MMR system that were not detected by the IHC technique. The analysis of germline mutations in genes associated with Lynch syndrome is strongly recommended for women whose endometrial tumors were characterized as being deficient in the MMR repair system.

Keywords: Endometrial cancer. Microsatellite Instability. Lynch Syndrome

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação de lâmina histológica corada em eosina/hematoxilina de um adenocarcinoma endometriode bem diferenciado.....	18
Figura 2 -	Sistema de reparo de DNA do tipo MMR em <i>E. coli</i>	27
Figura 3 -	Sistema de reparo de DNA do tipo MMR em organismos eucariontes.....	29
Figura 4 -	Representação esquemática da deleção terminal no gene <i>EPCAM</i>	31
Figura 5 -	Construção dos microarranjos de tecido.....	50
Figura 6 -	Interpretação de reação de imuno-histoquímica em cortes histológicos de adenocarcinoma endometriode de endométrio.....	54
Figura 7 -	Interpretação de reação de instabilidade de microssatélites por eletroforese capilar.....	60
Figura 8 -	Fluxograma das etapas metodológicas.....	62
Figura 9 -	Resultados de reações de imuno-histoquímica em cortes histológicos de câncer de endométrio.....	65
Figura 10 -	Eletroferogramas das análises de metilação do promotor do gene <i>MLH1</i> ...	67
Figura 11 -	Eletroferogramas referentes às análises de instabilidade de microssatélites em amostras de adenocarcinoma endometriode de endométrio.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proteínas que participam do sistema MMR de <i>E. coli</i> e de humanos.....	30
Tabela 2 -	Características gerais da síndrome de Lynch.....	33
Tabela 3 -	Critérios de Amsterdam I.....	34
Tabela 4 -	Critérios de Amsterdam II.....	35
Tabela 5 -	Recomendações de Bethesda.....	35
Tabela 6 -	Recomendações de Bethesda Revisadas.....	36
Tabela 7 -	Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch com probabilidade de 5 a 10% de possuírem uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR.....	37
Tabela 8 -	Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch com probabilidade de 20 a 25% de possuírem uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR.....	37
Tabela 9 -	Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	52
Tabela 10 -	Características dos <i>primers</i> utilizados para análise de metilação do promotor do gene <i>MLH1</i> pela técnica de MSP.....	56
Tabela 11 -	Relação de reagentes, quantidade e concentrações utilizados para a realização das reações de MSP.....	57
Tabela 12 -	Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos <i>amplicons</i> pela técnica de MSP.....	57
Tabela 13 -	Características dos marcadores microssatélites e dos respectivos <i>primers</i> utilizados para geração dos <i>amplicons</i>	58
Tabela 14 -	Descrição dos reagentes utilizados nas reações de PCR multiplex.....	59
Tabela 15 -	Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos <i>amplicons</i> por PCR multiplex.....	59
Tabela 16 -	Características clínico-patológicas da casuística.....	63
Tabela 17 -	Resultados das reações de imunohistoquímica nas amostras de adenocarcinoma endometriode de endométrio.....	65

Tabela 18 -	Resultado da análise de metilação na região promotora do gene <i>MLH1</i> em tumores de endométrio negativos para a expressão da proteína MLH1.....	66
Tabela 19 -	Resultado da análise de instabilidade de microssatélites.....	67
Tabela 20 -	Correlação das características clínico-patológicas da casuística com a caracterização dos tumores quanto à proficiência do sistema de reparo MMR...	70
Tabela 21 -	Levantamento bibliográfico sobre as frequências de tumores de endométrio, do tipo endometriode, caracterizados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>
CE	Câncer de Endométrio
dMMR	Tumores de Endométrio Deficientes da Atividade do Sistema MMR
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ER α	do inglês, <i>estrogen receptor-α</i>
FAP	do inglês, <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FIGO	do inglês, <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HNPPC	do inglês, <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Syndrome</i>
IARC	do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de Massa Corporal
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
MMR	do inglês, <i>Mismatch Repair</i>
MSI	Instabilidade de Microssatélites
MSI-H	Instabilidade de Microssatélites Alta
MSI-L	Instabilidade de Microssatélites Alta
MSP	PCR específico para análise de metilação
MSS	Estabilidade de Microssatélites
NCI	do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
PCNA	do inglês, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pMMR	Tumores de Endométrio Proficientes da Atividade do Sistema MMR
RFC	do inglês, <i>Replication Factor C</i>
SERPAT	Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
SGO	do inglês, <i>Society of Gynecologic Oncology</i>

SL	Síndrome de Lynch
SSB	do inglês, <i>Single Stranded Binding Proteins</i>
TMA	do inglês, <i>Tissue Micro-Array</i>
TCLE	Termo De Consentimento Livre e Esclarecido
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer de endométrio	16
1.1.1 Epidemiologia	16
1.1.2 Patologia	17
1.1.3 Fatores de Risco	19
1.1.3.1 Predisposição genética	21
1.2 Síndrome de Lynch	22
1.2.1 Histórico	22
1.2.2 Etiologia	24
1.2.2.1 Sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR)	25
1.2.2.2 O envolvimento do gene <i>EPCAM</i> na funcionalidade do sistema MMR	30
1.2.3 Fenótipo	32
1.2.4 Abordagem diagnóstica	33
1.2.4.1 Critérios clínico-patológicos de triagem	33
1.2.4.2 Abordagem de triagem universal nos tumores	38
1.2.4.2.1 Instabilidade de Microsatélite	39
1.2.4.2.2 Imuno-histoquímica	41
1.2.4.2.3 Metilação do promotor do gene <i>MLH1</i>	42
1.2.5 Manejo clínico e aconselhamento genético	44
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Casuística	49
4.2 Aspectos éticos	49

4.3 Caracterização clínico-patológica	49
4.4 Caracterização molecular da proficiência do sistema MMR	49
4.4.1 Análise de expressão das proteínas do MMR	49
4.4.2 Análise de metilação do promotor do gene <i>MLH1</i>	54
4.4.3 Instabilidade de microssatélites.....	57
4.5 Classificação molecular dos tumores	60
4.6 Análise estatística.....	61
4.7 Fluxograma das etapas metodológicas	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Caracterização clínico-patológica da casuística.....	63
5.2 Caracterização molecular dos tumores de endométrio.....	64
5.2.1 Imuno-histoquímica	64
5.2.2 Análise de metilação	66
5.2.3 Instabilidade de microssatélites.....	67
5.3 Correlação do <i>status</i> de proficiência do Sistema MMR com as características clínico-patológicas	69
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Caracterização clínico-patológica	72
6.2 Caracterização molecular dos tumores	74
6.3 Associação entre as características clínico-patológicas e o sistema MMR.....	83
7 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de endométrio

Anatomicamente, o útero pode ser dividido em duas partes principais: o colo uterino (ou cérvix) e o corpo uterino. Tumores que se originam a partir do corpo uterino são essencialmente distintos de tumores de colo do útero com relação à etiologia e características clínicas. O câncer de endométrio é o tipo de neoplasia maligna uterina mais frequente, representando mais de 75% de todos os casos de câncer no corpo do útero, os demais casos são compostos por tumores que se originam a partir do miométrio (EINHORN, 1996; PATEL et al., 2010).

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de endométrio é o tipo de neoplasia do aparelho reprodutor feminino mais comum, com incidência em torno de 150 mil casos diagnosticados anualmente em todo o mundo (OKUDA et al., 2010). Segundo estimativas realizadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês – *International Agency for Research on Cancer*), aproximadamente 386 mil novos casos de câncer do corpo do útero serão registrados em todo mundo no ano de 2020 (IARC, 2017). No Brasil, os dados mais recentes disponibilizados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram cerca de 6.950 novos casos de câncer de corpo do útero para o biênio 2016-2017 (INCA, 2017).

O câncer do corpo do útero (incluindo todos os tipos de câncer de endométrio) é o oitavo tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, representando em 2012 cerca de 280 mil casos estimados em um período de um ano (IARC, 2017). De todos os tipos de neoplasias diagnosticadas em mulheres no mundo, o câncer de corpo de útero é o quarto mais prevalente. Estima-se que, aproximadamente, 7 em cada 100.000 brasileiras sejam acometidas por neoplasias do corpo do útero (IARC, 2017).

A taxa de mortalidade por câncer de corpo do útero é substancialmente mais baixa do que a taxa de incidência. Uma das justificativas para esse cenário ser diferente da maioria dos outros tipos de câncer consiste em uma melhor sobrevida observada em pacientes diagnosticadas com câncer do corpo do útero, chegando a cerca de 80% em um período de cinco anos (INCA, 2017). Embora seja observada uma maior incidência em países desenvolvidos, a mortalidade por câncer de corpo do útero é maior em países em desenvolvimento (IARC, 2017).

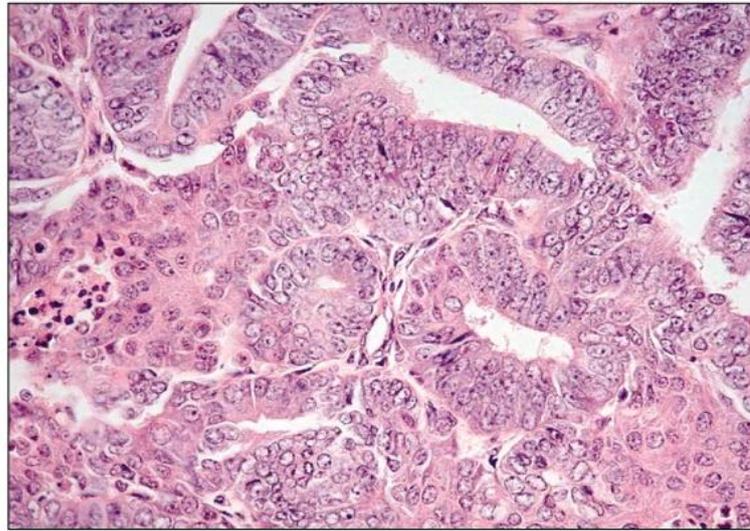
1.1.2 Patologia

Tumores do corpo do útero compreendem alguns tipos histológicos distintos que são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde, em carcinomas epiteliais (representados pelos tipos endometriode, seroso, de células claras, mucinoso, de células escamosas, de células transicionais, de células pequenas, e indiferenciado), tumores mistos epiteliais e mesenquimais (carcinosarcoma), tumores mesenquimais (estromal endometrial, tumores de músculos lisos) e outros tumores malignos (MURALI; SOSLOW; WEIGELT, 2014).

Tumores de endométrio do tipo adenocarcinoma endometriode são o tipo histológico mais prevalente, sendo diagnosticados em cerca de 90% dos casos; os 10% restantes são diagnosticados como tumores de endométrio de alto grau, incluindo carcinoma de células claras, carcinoma seroso papilífero, carcinoma de endométrio misto e adenocarcinoma indiferenciado (ARORA et al., 2012). O termo “endometriode” refere-se às glândulas do tipo endometriode de diferenciação variável que são facilmente reconhecidas ao microscópio por se assemelharem às glândulas de tecido endometrial saudável, com vários graus de complexidade arquitetural (BARTOSCH; LOPES; LOPES, 2011) (Figura 1). Alguns tumores desse subtipo histopatológico podem ser subdivididos, de acordo com algumas diferenciações celulares, em diferenciação escamosa, viloglandular, secretório e de células ciliadas (AMANT et al., 2005).

Com base em diferenças histológicas e características clínicas, o câncer de endométrio é dividido em dois tipos: carcinomas de endométrio do tipo I e carcinomas de endométrio do tipo II (BOKHMAN, 1983; FELIX et al. 2010). Tumores de endométrio do tipo II são geralmente menos diferenciados e apresentam um pior prognóstico em relação aos tumores do tipo I. Os tumores de endométrio do tipo I representam a maior parcela dos cânceres de endométrio e são, em sua maioria, do tipo histológico adenocarcinoma endometriode. Além disso, tumores do tipo I estão associados com a estimulação desbalanceada de estrógenos e são, frequentemente, precedidos por hiperplasias endometriais. Tumores de endométrio do tipo II são, predominantemente, carcinomas serosos e são, em sua maioria, descritos como sendo estrógeno-independentes; surgindo em endométrios atróficos e derivando de carcinomas intra-epiteliais, que são um tipo de lesão pré-cancerosa (SETIAWAN et al., 2013).

Figura 1 – Representação de lâmina histológica corada em eosina/hematoxilina de um adenocarcinoma endometriode bem diferenciado



Fonte: Amant e colaboradores (2005).

Estes dois tipos de adenocarcinoma endometriais apresentam diferenças epidemiológicas, etiológicas e clínicas, podendo envolver eventos genéticos distintos relacionados à patogênese e progressão de cada tipo (WONG et al., 2006; BRINTON et al., 2013). Cerca de 40% dos óbitos por câncer de endométrio são decorrentes de tumores do tipo II, apesar de representem apenas 10 a 20% dos casos de câncer de endométrio (MOORE, FADER, 2011).

O estadiamento patológico dos tumores de endométrio é estabelecido por meio de diretrizes estabelecidas de dois sistemas de classificação distintos: 1) pelo sistema da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, do inglês - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (PECORELLI, 2009); 2) pelo Sistema de Classificação TNM, que é definido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2009). O grau dos tumores de endométrio também é estabelecido por critérios definidos pela FIGO (PECORELLI, 2009). A definição do estadiamento patológico dos tumores é importante para agrupar pacientes que apresentam características clínico-patológicas semelhantes visando à padronização de medidas de seguimento clínico e à comparação de estratégias terapêuticas. Esses sistemas de classificação são baseados no estadiamento cirúrgico e incluem a análise do tamanho do tumor primário, da extensão da invasão miometrial pela lesão, descrição se há disseminação do câncer para os linfonodos regionais e se há doença metastática à distância do sítio primário da neoplasia (MORICE et al., 2016).

O sistema de determinação do grau histológico tumoral é aplicado apenas aos casos de carcinoma endometriode, tendo em vista que os carcinomas de células claras e carcinomas do tipo seroso são considerados tumores de alto grau. De acordo com o Sistema Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, um carcinoma endometriode de grau 1 apresenta glândulas bem formadas, com não mais do que 5% de áreas sólidas, não escamosas; carcinomas de grau 2 possuem de 6 a 50% de áreas sólidas e os tumores de grau 3 apresentam mais de 50% de áreas sólidas, não escamosas. Os tumores são reclassificados de grau 1 para 2 e de grau 2 para 3 se for observada a presença significativa de atipias celulares (AMANT et al., 2005).

Além de ser classificado com base em parâmetros histológicos, o câncer de endométrio pode ser classificado a partir de aspectos moleculares. Foram estabelecidas quatro categorias de câncer de endométrio, com base no perfil e frequência de mutações encontradas no genoma tumoral, variação no número de cópias do genoma tumoral e no perfil de instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*). Estas quatro categorias são: *POLE* ultra-mutado, MSI hiper-mutado, Baixo número de cópias e Alto número de cópias, cujas incidências são 7,3; 28; 38,8 e 25,9%, respectivamente (LEVINE et al., 2013).

Os tumores de endométrio classificados como *POLE* ultra-mutado possuem mutações no domínio exonuclease da DNA-Polimerase ϵ e apresentam uma alta frequência de mutações somáticas em outros genes, tais como *PTEN*, *PIK3R1* e *PIK3CA*. Os tumores de endométrio enquadrados nas categorias Baixo e Alto número de cópias apresentam uma frequência reduzida de mutações e são caracterizados com base na existência de alterações somáticas no número de cópias do genoma tumoral. A categoria MSI hiper-mutado é a segunda categoria de tumores de endométrio com maior frequência de mutações somáticas espalhadas pelo genoma e compreende tumores de endométrio hipermetilados, especialmente na região promotora do gene *MLH1*, além de serem tumores histologicamente caracterizados por uma maior ocorrência de infiltrado linfocitário e imunogenicidade (KUNITOMI et al., 2017).

1.1.3 Fatores de Risco

Hormônios do tipo estrógeno estimulam a proliferação de células do endométrio e aumentam sua atividade mitótica podendo estar relacionado com processos tumorigênicos (AKHMEDKHANOV; ZELENIUCH-JACQUOTTE; TONIOLO, 2001). A exposição desbalanceada a hormônios do tipo estrógeno, de fonte endógena ou exógena, é o principal fator de risco associado ao desenvolvimento de carcinomas endometriais, especialmente tumores do tipo I (MORICE et al., 2016).

O aumento do índice de massa corporal (IMC) e a obesidade são fatores de alto risco associados à incidência e mortalidade do câncer de endométrio (JENABI; POOROLAJAL, 2015). Mulheres obesas apresentam uma probabilidade de duas a cinco vezes maior de desenvolver este tipo de neoplasia em relação àquelas com IMC normal (SECORD et al., 2016). Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno são pouco compreendidos. Uma das hipóteses formuladas para explicar essa associação envolve a produção de estrona pelo tecido adiposo e sua posterior conversão em estradiol no endométrio. Contudo, os detalhes desse processo são pouco compreendidos (SCHMANDT et al., 2011; ARORA et al., 2012).

Diabetes é um quadro clínico tido como sendo um fator de risco independente, fortemente associado à ocorrência do câncer de endométrio (MAATELA et al., 1994; ZHANG et al., 2013). Mulheres diabéticas apresentam um risco duas vezes mais elevado de desenvolver câncer de endométrio em relação às mulheres não diabéticas (FRIBERG et al., 2007). No entanto, grande parte dos trabalhos que estimaram a associação entre os quadros clínicos de diabetes e câncer de endométrio não foi ajustada para fatores de confusão, tais como o histórico de obesidade e a prática de atividades físicas, que devem ser ajustados antes de se considerar o diabetes como um fator de risco independente para o surgimento de tumores endometriais (LUCENTEFORTE et al., 2007; LUO et al., 2014).

O número de gestações também é outro fator de risco associado ao desenvolvimento de câncer de endométrio. De acordo com uma meta-análise publicada em 2015, o número de paridades é inversamente proporcional ao risco de câncer de endométrio (WU et al., 2015). Essa associação inversa pode ser explicada, ao menos parcialmente, pela ação contínua de progesterona sobre as células endometriais ao longo das gestações. Sabe-se que a progesterona possui efeitos antimitótico e estimulador de diferenciação que, potencialmente, reduzem o risco de desenvolvimento de câncer (AKHMEDKHANOV; ZELENIUICH-JACQUOTTE; TONIOLO, 2001). Além disso, a remoção mecânica de células endometriais cancerosas e pré-cancerosas a cada parto pode estar envolvida com a redução do risco de câncer de endométrio pelo aumento do número de gestações (ALBREKTSSEN et al., 1995; WU et al., 2015).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é outro fator de risco relacionado à ocorrência do câncer de endométrio. De acordo com dados recentes, obtidos a partir de um estudo de revisão sistemática e meta-análise, mulheres com HAS podem apresentar um aumento de até 61% no risco relativo de desenvolver câncer de endométrio. Todavia, como a hipertensão é uma condição que está fortemente relacionada ao estilo de vida e a fatores médicos, tais como obesidade e diabetes, a possibilidade da associação encontrada entre hipertensão e câncer de

endométrio ter sido advinda, ao menos parcialmente, desses fatores de confusão não pode ser excluída (AUNE; SEM; VATTEN, 2017).

Outras condições clínicas tais como a síndrome de ovários policísticos e a presença de tumores secretores de estrógenos estão associadas à estimulação desbalanceada de estrógenos de fonte endógena e, conseqüentemente, podem estar relacionadas a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de endométrio (SOLIMAN et al., 2005; ARORA et al., 2012; BURKE et al., 2014).

O tamoxifeno é um trifeniletileno não esteroide utilizado no 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*). Este composto atua como um antagonista nos receptores ER α bloqueando sua via de sinalização em células cancerosas de tumores de mama positivos para ER α . O risco de recorrência do câncer de mama e o risco de desenvolvimento de câncer de mama contralateral são significativamente reduzidos pelo tratamento com tamoxifeno. Esta substância atua como um modulador seletivo de receptores de estrógeno, atuando como um agente antagonista de estrógenos nos tecidos mamários e agonista em tecidos da medula óssea e do endométrio. O uso do tamoxifeno é um importante fator de risco por exposição exógena a estrógenos e está associado com um aumento de seis a oito vezes na incidência do câncer de endométrio (SWERDLOW; JONES, 2005; BURKE et al., 2014; CHEN et al., 2014; HU; HILAKIVI-CLARKE; CLARKE, 2015).

1.1.3.1 Predisposição genética

Um dos principais fatores que aumentam, consideravelmente, o risco para o surgimento do câncer de endométrio envolve fatores relacionados à predisposição genética para a ocorrência deste tipo de neoplasia. Estima-se que 10% de todos os casos de câncer de endométrio estejam relacionados a componentes genéticos (DOLL et al., 2008). Um histórico familiar de câncer uterino compartilhado entre familiares com parentesco em primeiro grau está associado a um risco aumentado de câncer de endométrio. Este risco é ainda maior em mulheres com faixa etária próxima a 55 anos de idade (LUCENTEFORTE et al., 2009). Mulheres com familiares em primeiro grau diagnosticadas com câncer de endométrio apresentam um risco duas vezes maior de desenvolverem o mesmo tipo de neoplasia do que mulheres sem histórico familiar de câncer de endométrio (WIN; REECE; RYAN, 2015).

Existem dois cenários distintos em que componentes genéticos atuam sobre o desenvolvimento de tumores. O primeiro cenário está relacionado ao envolvimento de diversos

fatores de risco genéticos para diferentes tipos de câncer (herança poligênica) na etiologia do tumor. O segundo cenário compreende algumas síndromes de predisposição hereditária a tumores que são causadas por uma alteração genética única (herança monogênica), altamente penetrante, que confere um risco substancialmente elevado para o desenvolvimento de certos tipos de tumores (STEINKE et al., 2013). A síndrome de Lynch é a principal síndrome relacionada à predisposição hereditária ao desenvolvimento do câncer de endométrio. Cerca de 2 a 3% de todos os casos de câncer de endométrio são atribuídos a esta síndrome (DANIELS et al., 2013). Mulheres portadoras da síndrome de Lynch apresentam um risco entre 40 e 60% de desenvolverem alguma neoplasia de endométrio ao longo da vida e, embora outros tumores possam surgir em portadores da síndrome de Lynch, o câncer de endométrio é o primeiro tumor a ser diagnosticado na maioria dos casos (LU; BROADDUS, 2005; LU et al., 2005).

1.2 Síndrome de Lynch

A síndrome de Lynch, também conhecida como Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipoide (HNPCC, do inglês: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Syndrome*) é uma afecção genética autossômica dominante, que predispõe a diversos tipos de neoplasias, incluindo câncer colorretal e câncer de endométrio (LEENEN et al., 2012). O padrão autossômico dominante de herança da síndrome é causado por alterações genéticas mono-alélicas em genes do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*) (LYNCH; CHAPELLE, 2003).

Apesar de ter sido amplamente utilizado, o termo HNPCC é considerado inadequado para a descrição da síndrome de predisposição a câncer descrita por Lynch, uma vez que tumores extra-colônicos são reconhecidamente parte da síndrome. Além disso, é conhecida a ocorrência de pólipos em portadores desta síndrome. Desse modo, por consenso, o termo síndrome de Lynch é o mais correto de ser empregado (LYNCH et al., 2015).

1.2.1 Histórico

A síndrome, hoje conhecida como síndrome de Lynch, foi originalmente descrita em 1913 pelo Dr. Aldred Scott Warthin, um patologista da Universidade de Michigan, que descreveu a primeira família com suscetibilidade a neoplasias gastrointestinais e ginecológicas, principalmente câncer gástrico e câncer de endométrio, relacionada à síndrome de Lynch. Esta família ficou conhecida como “Família G” (WARTHIN, 1913). Estudos sistemáticos sobre a

Família G de Warthin foram cruciais para a posterior identificação de outras famílias com características similares (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Em 1966, Henry Lynch relatou achados similares aos descritos por Warthin em duas famílias, as Famílias M e N, com diversos membros afetados por tumores colorretais, gástricos e endometriais (LYNCH et al., 1966). Após revisar e atualizar os achados de Warthin, e com base em suas próprias observações, Lynch estabeleceu que os tumores nestas famílias eram advindos de uma síndrome autossômica dominante de câncer familiar (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Em 1984, a síndrome responsável pelos tumores relatados nas famílias G, M e N foi nomeada de síndrome de Lynch, sendo dividida, posteriormente, em síndrome de Lynch tipo I e síndrome de Lynch tipo II. Pacientes portadores do tipo I apresentavam apenas câncer de cólon e reto ao passo que portadores do tipo II da síndrome de Lynch eram acometidos por tumores colorretais, assim como por tumores extra-colônicos (BOLAND; LYNCH, 2013). À medida que a doença foi sendo melhor elucidada, ficou claro que havia uma grande sobreposição fenotípica entre estes dois grupos e, então, a síndrome foi renomeada como Síndrome do Câncer Colorretal Não-Polipoide (HNPCC), para diferenciá-la da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês: *Familial Adenomatous Polyposis*), cujos portadores apresentam vários pólipos colorretais que não eram observados em portadores da então chamada HNPCC (BANSIDHAR; SILINSKY, 2012).

Em 1989, o Grupo Internacional Colaborativo em HNPCC foi criado e, em 1991, formulou e publicou um conjunto de critérios conhecidos como “Critérios de Amsterdam I” para estabelecer o diagnóstico clínico de HNPCC e facilitar a posterior identificação dos genes responsáveis pela etiologia da doença. Estes critérios foram modificados em 1999 para incorporar tumores extra-colônicos. A nova versão dos critérios foi nomeada de “Critérios de Amsterdam II” (VASEN, et al., 1991; VASEN et al., 1999; SEHGAL et al., 2014).

Em 1993, foram publicados achados que estabeleceram a associação entre o fenômeno de instabilidade de microssatélites em tumores de indivíduos portadores da síndrome de Lynch (AALTONEN et al., 1993; PELTOMÄKI et al., 1993; THIBODEAU; BREN; SCHAID, 1993; WOLF; BUCHANAN; FARKAS, 2013). Este fenômeno será pormenorizadamente abordado no tópico 1.2.4.2.1 desta dissertação.

Em 1996, em uma conferência internacional sobre HNPCC promovida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, do inglês – *National Cancer Institute*) foram formuladas e, em 1997 foram publicadas as “Recomendações de Bethesda” (*Bethesda Guidelines*) que visavam identificar um espectro maior de pacientes em risco e aumentar a

sensibilidade do diagnóstico da Síndrome de Lynch, identificando tumores colorretais que deveriam ser testados quanto à presença de MSI. As Recomendações de Bethesda apresentavam critérios de inclusão de casos que deveriam ser investigados que eram baseados em história familiar e idade ao diagnóstico de câncer. Estes critérios são mais amplos que os critérios de Amsterdam, e também incluíram características histopatológicas que eram mais frequentes em tumores de portadores da síndrome de Lynch. Estes critérios foram revisados e simplificados em 2004, dando origem às “Recomendações de Bethesda Modificadas” (RODRIGUEZ-BIGAS, et al., 1997; UMAR et al., 2004; PINO; CHUNG, 2010).

A era da genética molecular para a síndrome de Lynch começou com a descoberta de dois *loci* ligados à suscetibilidade a câncer em pacientes diagnosticados clinicamente com esta síndrome (LINDBLOM et al., 1993; PELTOMÄKI; AALTONEN; SISTONEN, 1993; LYNCH et al., 2009). A associação do fenômeno de instabilidade de microssatélites em tumores do espectro da síndrome de Lynch suportou a hipótese de que erros na via do sistema de reparo de DNA do tipo MMR poderiam ser a causa genética da doença. Estes achados culminaram na clonagem dos quatro principais genes do sistema MMR envolvidos com a etiologia da síndrome de Lynch: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (KASTRINOS; STOFFEL, 2014). A posterior descoberta de mutações germinativas nos genes do sistema MMR elucidou a base genética da maioria dos casos com suspeita de serem advindos da síndrome de Lynch (STOFFEL; KASTRINOS, 2014).

1.2.2 Etiologia

A síndrome de Lynch é causada por mutações patogênicas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Estes genes codificam proteínas centrais envolvidas com o sistema de reparo MMR que é responsável por manter a fidelidade genômica corrigindo erros de pareamento de nucleotídeos que escaparam da função revisora das DNA-Polimerases durante a replicação de DNA. Erros em nucleotídios individuais, pareados incorretamente, e alças de inserção-deleção que se formam durante a replicação de DNA, podem resultar em mutações em genes que regulam o crescimento celular e, desta forma, podem dar início a um processo tumorigênico (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Na maioria dos indivíduos com síndrome de Lynch, as mutações germinativas são encontradas em heterozigose em um dos quatro principais genes do sistema MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*). Um evento somático adicional no alelo selvagem é necessário para que a inativação bialélica do gene mutado resulte na perda da função do sistema de reparo MMR

nas células afetadas. Este cenário predispõe ao acúmulo de mutações somáticas em regiões de DNA altamente repetitivo do tipo microssatélite, presentes em regiões codificadoras e não codificadoras de diferentes genes, culminando no fenótipo hipermutável denominado “instabilidade de microssatélites”, que é observado na maioria dos tumores dos indivíduos afetados pela síndrome de Lynch (KASTRINOS; STOFFEL, 2014).

Conforme será explicado no tópico 1.2.2.2 deste trabalho, uma pequena parcela dos casos de síndrome de Lynch, cerca de 1 a 3%, é causada pela herança de deleções em heterozigose na extremidade 3' terminal do gene *EPCAM*, resultando na inativação do gene *MSH2* que faz parte do sistema MMR e, desse modo, conferindo o fenótipo da síndrome de Lynch (TUTLEWSKA; LUBINSKI; KURZAWSKI, 2013).

1.2.2.1 Sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA (MMR)

Danos no material genético, quando não são reparados, podem gerar mutações em células somáticas e germinativas, alterando o fenótipo celular e podendo causar disfunções e doenças. A inativação do sistema de reparo MMR está associada à ocorrência de casos de câncer hereditários e esporádicos em humanos (LI, 2008).

O sistema de reparo MMR é um mecanismo altamente conservado que contribui para a manutenção da estabilidade genômica, tanto em organismos procariontes quanto em eucariontes (FUKUI, 2010). Sua principal função consiste em no reconhecimento e posterior eliminação de bases únicas, pareadas incorretamente, e de alças intra-filamentares geradoras de inserções ou deleções (*indels*) que podem surgir como consequência de erros cometidos pelas DNA-Polimerases durante a síntese de DNA (SILVA et al., 2009). Os genes do sistema MMR também participam do reparo de quebras bifilamentares de DNA, além de atuarem nos processos de apoptose e recombinação genética (RICHMAN, 2015).

O mecanismo de reparo MMR é acoplado ao processo de replicação de DNA e pode ser dividido em quatro fases principais: (1) detecção da(s) base(s) malpareada(s) (2) identificação da fita de DNA recém-sintetizada que contém o(s) nucleotídeo(s) incorporado(s) incorretamente (3) remoção da fita recém-sintetizada e (4) ressíntese e ligação da sequência de DNA correta (THAM; KANAAR; LEBBINK, 2016).

A atuação do sistema MMR na manutenção da fidelidade genômica depende de sua capacidade em discriminar as fitas de DNA de modo a direcionar o mecanismo de reparo para a fita recém-sintetizada e não para a fita original. Na bactéria *Escherichia coli*, a clivagem dependente da ausência de metilação possibilita que o mecanismo MMR reconheça e atue sobre

a fita recém-sintetizada de DNA que contém um erro de pareamento de bases. Já em organismos eucariontes, a distinção entre as fitas ocorre pela presença de extremidades 3' livres na fita recém-sintetizada, geradas pelos fragmentos de Okazaki presentes nas fitas *lagging* (GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016; HU et al., 2017).

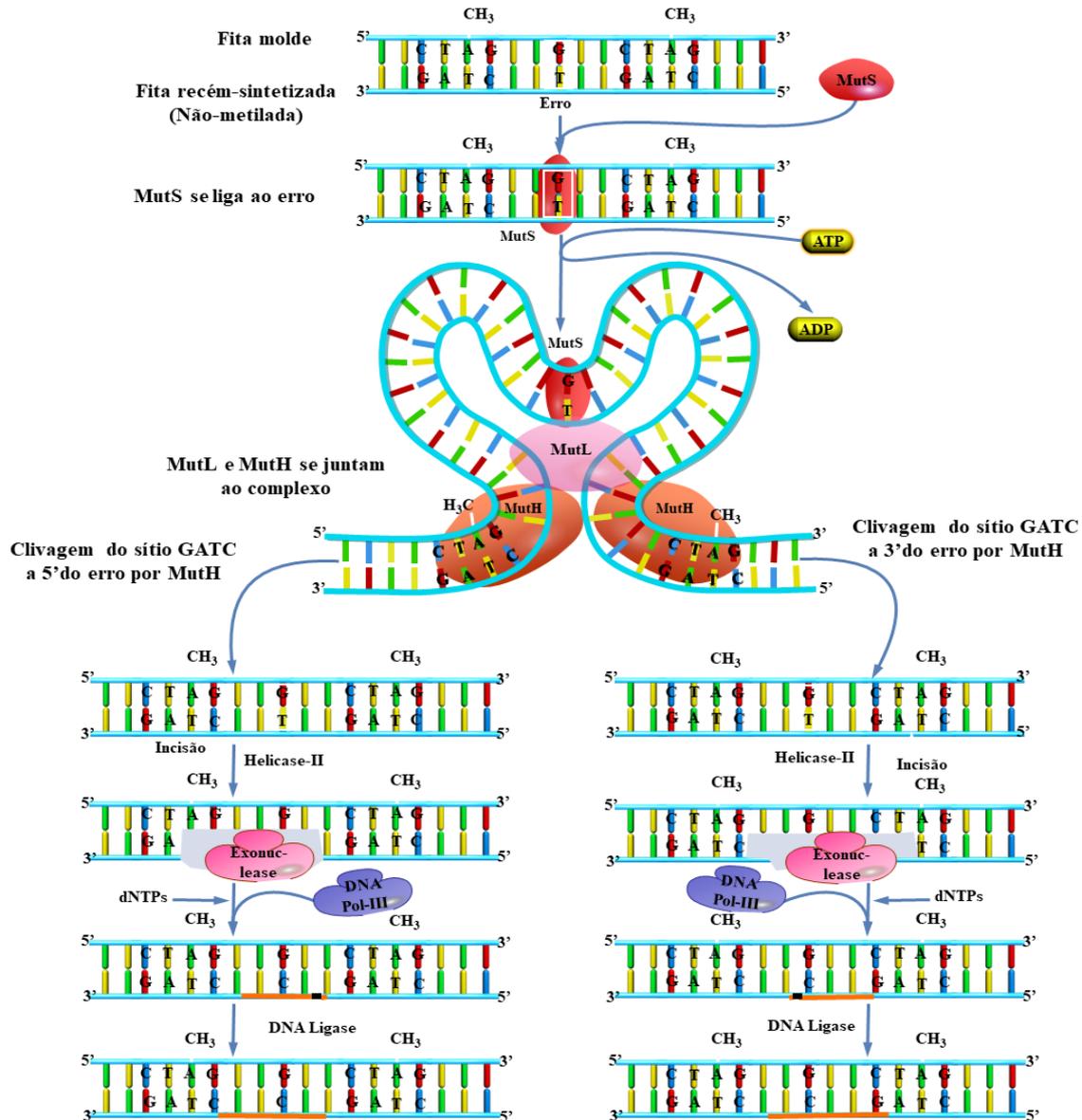
Em células procarióticas, especificamente em *E. coli*, o sistema de reparo MMR é iniciado quando erros na fita de DNA recém-sintetizada são reconhecidos pela proteína MutS que atua como homodímero se ligando às bases pareadas incorretamente. Após o reconhecimento do dano, MutS interage com uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP, do inglês, *Adenosine Triphosphate*) e sofre uma mudança conformacional adotando uma estrutura de grampo que possibilita seu deslizamento ao longo da molécula de DNA. Em seguida, uma segunda proteína, MutL que também atua como homodímero, é recrutada para o sítio de reconhecimento e interage fisicamente com MutS, promovendo a ativação de uma terceira proteína, MutH, que atua como uma endonuclease de restrição. A proteína MutH cliva a fita de DNA, temporariamente não metilada após a replicação, em adeninas de sequências nucleotídicas hemi-metiladas GATC. A quebra unifilamentar gerada pela proteína MutH serve como o ponto de partida para o processo de reparo do dano que ocorre por remoção da fita recém-sintetizada por helicases do tipo UvrD e por exonuclease, seguida pela síntese de uma nova fita pelas enzimas DNA-Polimerases III, proteínas de ligação ao DNA unifilamentar (SSB, do inglês, *Single Stranded Binding Proteins*) e DNA-Ligases. Após o reparo dos nucleotídeos incorporados incorretamente, a fita recém-sintetizada, contendo a sequência nucleotídica corrigida, sofre metilação nas adeninas das sequências GATC pela enzima DNA metil-transferase (HSIEH; YAMANE, 2008; LI, 2008; FUKUI, 2010; GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016; PUTNAM, 2016).

O mecanismo de reparo MMR é um processo bidirecional em procariotos. Dependendo da posição com que a quebra unifilamentar gerada por MutH ocorre, um grupo específico de exonucleases atuará, removendo o filamento contendo o erro por meio de atividade exonucleotídica no sentido 5'-3' ou no sentido 3'-5' (LI, 2008). O sistema de reparo MMR em *E. coli* encontra-se na Figura 2.

Em outros organismos, os homólogos dos homodímeros MutS e MutL estão presentes e seguem essencialmente os mesmos passos iniciais do mecanismo de reparo, embora eles possam apresentar um maior grau de complexidade. Em eucariontes, as proteínas homodiméricas, presentes no mecanismo de reparo procarioto, são substituídas por heterodímeros e suas funções dividem-se em variantes dos componentes dos heterodímeros.

Nenhum homólogo da proteína MutH de *E. coli* foi identificado em outros organismos até o momento (HSIEH; YAMANE, 2008; FUKUI, 2010; GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016).

Figura 2 – Sistema de reparo de DNA do tipo MMR em *E. coli*



Fonte: Modificado de Qiagen (2017). A versão original da imagem pode ser acessada em: <https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/pathwaydetails/?pwid=294&task=ppt&task=ppt&action=Accept>.

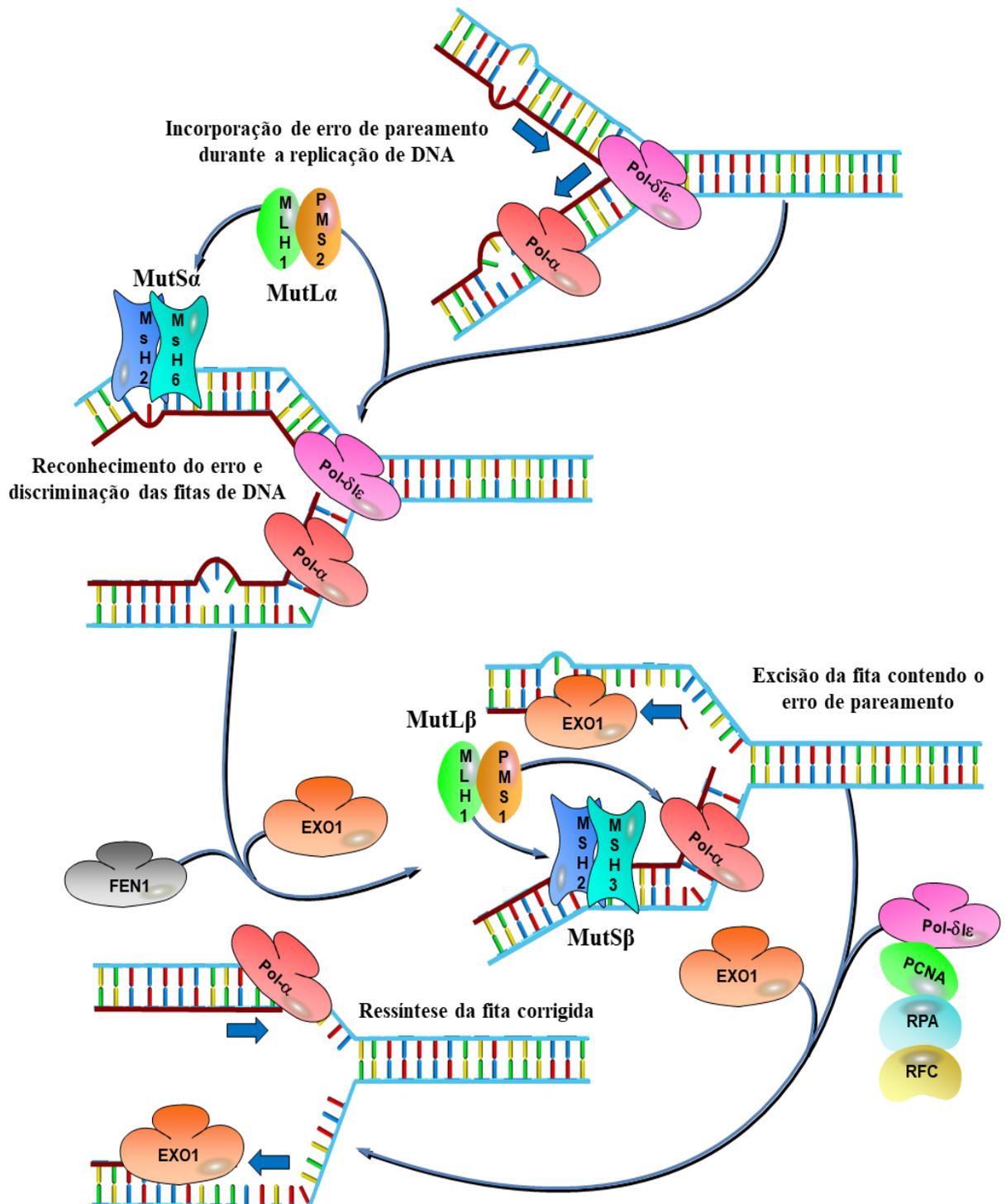
Grande parte do conhecimento sobre o mecanismo de reparo MMR em eucariotos refere-se à via mediada pelos complexos MutS α e MutL α , que são responsáveis por reparar a maioria dos erros de replicação. Esta via é iniciada quando um heterodímero MutS α , formado pelas proteínas MSH2 e MSH6 reconhece e se liga a um erro de pareamento no DNA

(KUNKEL; ERIE, 2015). O heterodímero MutS α possui dois sítios com atividade ATPase que são essenciais ao reparo pois, quando ativados, promovem uma mudança conformacional do heterodímero permitindo sua movimentação ao longo do DNA (HINGORANI, 2016). O estado ATP ativo do complexo MutS α interage com MutL α , um heterodímero formado por MLH1 e PMS2. Subsequentemente, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), carregado pelo fator de replicação C (RFC, do inglês: *Replication Factor C*), ativa o heterodímero MutL α para promover clivagens na fita de DNA nascente de DNA utilizando ATP (KADYROV et al., 2006). A fita contendo o erro é discriminada pela presença de quebras na fita *lagging* deixadas pelos fragmentos de Okazaki (FUKUI, 2010). A quebra unifilamentar gerada pela clivagem do DNA pelo heterodímero MutL é então utilizada para dirigir a remoção dos erros de replicação e, após a remoção completa do dano por endonucleases (FEN1) e exonucleases (EXO1), a síntese de uma nova fita contendo a sequência correta de DNA ocorre por meio da DNA-Polimerase δ ou pela DNA-Polimerase ϵ , seguida pela ligação das extremidades dos filamentos recém-sintetizados (LONGLEY; PIERCE; MODRICH, 1997; GOELLNER et al., 2014; KUNKEL; ERIE, 2015; FRIEDHOFF; LI; GOTTHARDT, 2016).

Além dos complexos MutS α and MutL α , outros heterodímeros participam dos processos do sistema MMR em eucariontes. O heterodímero MutS β (formado pelas proteínas MSH2 e MSH3) reconhecem, primariamente, as alças intrafilamentares de *indels* parcialmente maiores do que as reconhecidas pelo complexo MutS α , além de atuar no reparo de vários tipos de pareamento incorreto de pares de bases. Com relação ao complexo MutL, além do heterodímero MutL α , outros heterodímeros (MutL β formado pelas proteínas MLH1 e PMS1 e MutL γ formado por MLH1 e MLH3) executam funções redundantes aos desempenhados por MutL α e também contribuem para o reparo de danos do tipo alças intrafilamentares (KUNKEL; ERIE, 2015; FRIEDHOFF; LI; GOTTHARDT, 2016). A figura 3 ilustra o mecanismo de reparo MMR em eucariotos.

O mecanismo de reparo MMR é uma via biológica altamente conservada que apresenta muita similaridade entre humanos e procariotos. Estas similaridades incluem a especificidade de substrato, bidirecionalidade do mecanismo de reparo e uma especificidade de reparo de fita de DNA dirigida por quebra unifilamentar (LI, 2008). Várias proteínas do sistema MMR em humanos foram identificadas com base em sua homologia com proteínas do sistema MMR de *E. coli*, conforme mostra a Tabela 1.

Figura 3 – Sistema de reparo de DNA do tipo MMR em organismos eucariontes



Fonte: Modificado de Qiagen (2017). A versão original pode ser acessada em: <https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=293>.

Tabela 1 – Proteínas que participam do sistema de reparo MMR em *E. coli* e em humanos

<i>E. coli</i>	Humanos	Função
MutS	hMutS α (MSH2 – MSH6) * hMutS β (MSH2 – MSH3)	Reconhecimento do dano/erro
MutL	hMutL α (MLH1 – PMS2) * hMutL β (MLH1 – PMS1) hMutL γ (MLH1 – MLH3)	Coordena a interação entre o complexo de reconhecimento do dano e o de excisão, endonuclease fita-específica e regula o término de excisão (humanos)
MutH	?**	Endonuclease fita-específica
UvrD	?**	DNA-Helicase
ExoI, ExoVII,	-	Exonuclease 3' - 5', excisão do erro
ExoX, RecJ	hExoI	Exonuclease 5' - 3', excisão do erro
DNA-Polimerase III	DNA-Polimerase δ	Promove a síntese de DNA pós-reparo
Grampo β	PCNA	Grampo molecular, ativação da atividade endonuclease de hMutL α e participa na etapa de síntese de DNA pós-reparo
Complexo γ	RFC	Carreador do PNCA, reparo dirigido por quebra, ativação da atividade endonuclease de hMutL α
SSB	RPA	Proteínas de ligação a DNA unifilar, síntese de DNA pós replicação, regula o término de excisão (RPA)
-	HMGB1	Proteína acessória, estimula excisão
DNA-Ligase	DNA-Ligase I	Proteína acessória, aumenta seletividade de reparo de danos

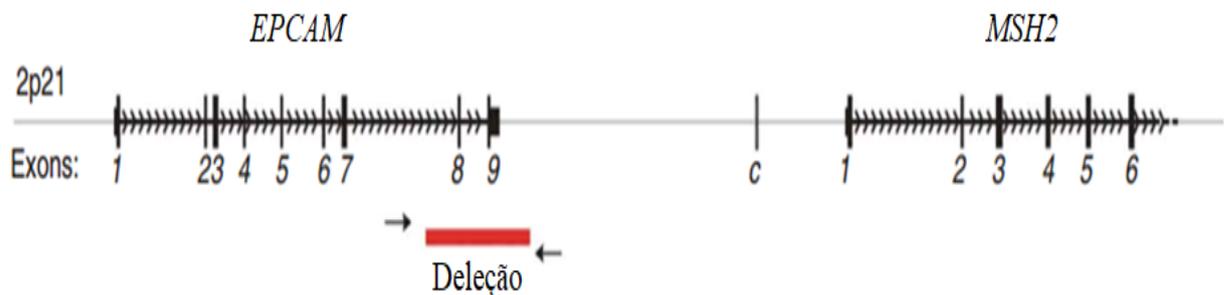
Legenda: (*) principais componentes celulares, representando cerca de 90% dos conteúdos dos complexos de MSH e MLH celulares. (**) ainda não identificado. (-) ausente. Fonte: Modificado de Fukui (2010) e de Jiricny (2013).

1.2.2.2 O envolvimento do gene *EPCAM* na funcionalidade do sistema MMR

O gene *EPCAM*, também conhecido como *TACSTD1*, codifica a molécula de adesão de células epiteliais (CD326), que é expressa em células epiteliais normais e em carcinomas (GUARINOS et al., 2010). Além da função de adesão, a proteína codificada pelo gene *EPCAM* também está envolvida nos processos de sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular (PATRIARCA et al., 2012). Em humanos, este gene possui nove éxons e está localizado no cromossomo 2 (2p21), antecedendo fisicamente o gene de reparo *MSH2* em cerca de 17 quilobases (kb) de distância (SCHNELL; CIRULLI; GIEPMANS, 2013).

A ocorrência de deleções envolvendo o sítio de poliadenilação que está localizado no éxon 9 do gene *EPCAM* foram determinadas como sendo uma causa alternativa da síndrome de Lynch. Deleções nessa região do gene *EPCAM* fazem com que a maquinaria de transcrição avance para além do gene *EPCAM* e invada a sequência do gene *MSH2*, causando o silenciamento deste último gene por meio de hipermetilação de sua região promotora. (HUTH et al., 2012). Este mecanismo leva ao silenciamento do gene *MSH2* apenas em tecidos onde o gene *EPCAM* é expresso (KOVACS et al., 2008; LIGTENBERG et al., 2009; GUARINOS et al., 2010). A Figura 4 mostra uma representação esquemática da deleção da região 3' de *EPCAM* e sua localização em relação ao gene *MSH2*.

Figura 4 – Representação esquemática da deleção terminal no gene *EPCAM*



Fonte: Modificado de Ligtenberg e colaboradores (2009).

Tendo em vista que o evento de silenciamento do gene *MSH2* é restrito a células que expressam *EPCAM*, portadores de deleções neste último gene apresentam um padrão de inativação do gene *MSH2* em mosaico que, em comparação aos portadores de mutações exclusivamente na sequência do gene *MSH2*, pode levar a diferenças no fenótipo de ocorrência e espectro de tumores (KEMPERS, et al., 2011).

Cerca de 20 a 25% dos tumores que não expressam a proteína *MSH2* e que não possuem mutações germinativas nesse gene são causados por herança de deleções na porção 3' terminal do gene *EPCAM*. Estes números correspondem a 2 a 3% de todos os casos de síndrome de Lynch (RUMILLA et al., 2011).

Mulheres aos 70 anos portadoras de deleções na extremidade 3' do gene *EPCAM* possuem um risco cumulativo de 12% de desenvolver câncer de endométrio que é consideravelmente maior do que o risco da população em geral (1,6%), mas muito menor do que o risco cumulativo de mulheres portadoras de mutações no gene *MSH2* (51%) e de portadoras de deleção combinada dos genes *MSH2* e *EPCAM* (55%). Além disso, o risco de

desenvolvimento de câncer de endométrio em portadoras de deleção no *EPCAM* é dependente do tamanho da deleção e de sua proximidade com o promotor do gene *MSH2* (KEMPERS, et al., 2011).

1.2.3 Fenótipo

Portadores de uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR possuem um risco maior de desenvolverem câncer colorretal, assim como câncer de endométrio e outros tumores. Tumores observados em famílias com síndrome de Lynch são diagnosticados em uma idade precoce e podem ser detectados múltiplos casos de câncer em um mesmo indivíduo ao longo da vida. Como consequência da inativação do sistema MMR, os tumores que se desenvolvem em portadores da síndrome de Lynch apresentam instabilidade em marcadores moleculares do tipo microssatélites e perda de expressão do gene mutado, características que são observadas em mais de 90% dos tumores associados à síndrome de Lynch (LYNCH; CHAPELLE, 2003; LIPTON et al., 2004; VASEN et al., 2007; GUARINOS et al., 2010). As características típicas da síndrome de Lynch podem ser consultadas na Tabela 2.

Além de um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer colorretal e câncer de endométrio, indivíduos com síndrome de Lynch também podem desenvolver neoplasias em outros sítios, tais como: ovário, estômago, intestino delgado, trato urinário, cérebro, pâncreas e glândulas cutâneas sebáceas (KASTRINOS; STOFFEL, 2014). Uma variedade de outros tumores, tais como câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, neoplasias adrenocorticais, mesoteliomas, carcinomas pancreáticos de células acinares, tumores pancreáticos neuroendócrinos e alguns tipos de sarcoma, foram descritos em famílias com síndrome de Lynch, e são mencionados na literatura como tumores incomuns do espectro desta síndrome (KARAMURZIN et al., 2012).

Em mulheres portadoras da síndrome de Lynch, o risco cumulativo de desenvolvimento de câncer de endométrio pode chegar a 60%, excedendo a probabilidade de desenvolvimento de câncer colorretal, que varia de 25 a 50% nessas mulheres (BARROW; HILL; EVANS, 2013). Mais da metade das mulheres com síndrome de Lynch desenvolvem um câncer ginecológico, geralmente de endométrio, como sendo o câncer “sentinela”, ou seja, o primeiro câncer a ser diagnosticado (LU et al, 2005; JASPERSON et al., 2010; LU; DANIELS et al., 2013; STEINKE et al, 2013).

Tabela 2 – Características gerais da síndrome de Lynch

1 - Padrão de herança autossômico dominante
2 - Tumores associados: câncer de colo e reto, endométrio, ovário, estômago, ureter e pelve renal, intestino liso, cérebro (geralmente glioblastoma), trato hepatobiliar e pele (adenoma de glândulas sebáceas e queratoacantomas)
3 - Idade de desenvolvimento dos cânceres menor que a observada na população em geral
4 - Desenvolvimento de cânceres múltiplos
5 - Características do câncer colorretal: predisposição ao colo proximal, maior sobrevida, cânceres colorretais múltiplos, tumores pouco diferenciados e infiltração de linfócitos do tipo Crohn
6 - Características dos adenomas: o número varia de um a poucos, maior proporção de adenomas com crescimento do tipo viloso, alto grau de displasia e progressão rápida de adenoma para carcinoma
7 – Tumores com alta instabilidade de microssatélites
8 – Tumores com imuno-histoquímica negativa para as proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e/ou PMS2

Nota: mais de uma destas características são, geralmente, observadas em portadores da síndrome de Lynch, mas não necessariamente devem estar presentes em todos os indivíduos portadores desta síndrome. Fonte: Adaptado de Vasen (2007).

1.2.4 Abordagem diagnóstica

O diagnóstico da síndrome de Lynch se dá pela detecção de uma mutação germinativa patogênica em um dos genes do sistema MMR (BRUEGL et al., 2014). A identificação dessas mutações é um processo dispendioso, tendo em vista que pelo menos cinco genes distintos estão envolvidos na etiologia molecular dessa síndrome e o espectro de mutações que podem ocorrer é amplo, sendo necessária mais de uma técnica de diagnóstico molecular para identificar todas elas (VASEN et al., 2007). Desse modo, foram criados métodos de triagem para selecionar pacientes com câncer colorretal e de endométrio com maior probabilidade de serem portadores da síndrome de Lynch para que seja oferecida a análise de mutações germinativas. Estes métodos de triagem são baseados em características clínico-patológicas ou moleculares dos tumores.

1.2.4.1 Critérios clínico-patológicos de triagem

Critérios clínico-patológicos de triagem são aqueles que se baseiam em dados de história pessoal e familiar de câncer, tais como idade ao diagnóstico e sítio primário da neoplasia, assim como características da patologia dos tumores para identificar indivíduos com maior

probabilidade de serem portadores de mutações germinativas em genes do sistema MMR relacionados à síndrome de Lynch para posterior investigação molecular (WIN et al., 2013b).

Diversos critérios foram criados com o objetivo de facilitar a identificação de possíveis portadores da síndrome de Lynch para posterior avaliação molecular dos mesmos. Dentre os mais utilizados, destacam-se os critérios de Amsterdam I e Amsterdam II e as versões original e revisada das Recomendações de Bethesda, além dos critérios da Sociedade Americana de Oncologia Ginecológica (SGO, do inglês, *Society of Gynecologic Oncology*) para detectar casos de câncer de endométrio com maior probabilidade de serem hereditários (VASEN, et al., 1991; VASEN et al., 1999; RODRIGUEZ-BIGAS, et al., 1997; UMAR et al., 2004; LANCASTER et al., 2007).

Os critérios de Amsterdam I (Tabela 3) foram criados para identificar famílias com síndrome de Lynch a partir da observação da ocorrência de câncer colorretal. À medida que tumores extra-colônicos, de endométrio em especial, foram incluídos no espectro da síndrome de Lynch, os critérios de Amsterdam foram reformulados, derivando nos critérios de Amsterdam II (Tabela 4). As Recomendações de Bethesda (Tabela 5) foram criadas com o objetivo de identificar tumores colorretais com instabilidade de microssatélites e a versão revisada das Recomendações de Bethesda (Tabela 6) especificaram todos os cânceres que faziam parte do espectro da síndrome de Lynch na época de sua elaboração (SJURSEN et al., 2010).

Tabela 3 – Critérios de Amsterdam I

Todos os critérios a seguir devem ser preenchidos para que uma família seja diagnosticada, clinicamente, com síndrome de Lynch:

No mínimo três familiares devem ser diagnosticados com câncer colorretal

No mínimo um dos familiares deve possuir parentesco em primeiro grau com os demais

No mínimo duas gerações sucessivas devem ser afetadas

No mínimo um dos tumores deve ter sido diagnosticado com idade inferior a 50 anos

O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) deve ser excluído

Os tumores devem ser confirmados por exames histopatológicos

Fonte: Vasen e colaboradores (1991).

Tabela 4 – Critérios de Amsterdam II

Todos os critérios a seguir devem ser preenchidos para que uma família seja diagnosticada, clinicamente, com síndrome de Lynch:

No mínimo três familiares devem ser diagnosticados com câncer colorretal ou um câncer do espectro da síndrome (endométrio, intestino delgado, ureter, pelve renal) *

No mínimo um dos familiares deve possuir parentesco em primeiro grau com os demais

No mínimo duas gerações sucessivas devem ser afetadas

No mínimo um dos tumores deve ter sido diagnosticado com idade inferior a 50 anos

O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) deve ser excluído

Os tumores devem ser confirmados por exames histopatológicos

Nota: (*) os tumores indicados como parte do espectro da síndrome de Lynch são os que constam na versão original dos critérios de Amsterdam II. Ao longo dos anos, outros tumores foram incluídos no espectro da síndrome, tais como câncer de estômago, de ovário, de pele e de bexiga. Fonte: Vasen e colaboradores (1999).

Tabela 5 – Recomendações de Bethesda

Ao menos um dos seguintes critérios deve ser preenchido

1- Indivíduos com câncer colorretal que preencham os critérios de Amsterdam I

2- Indivíduos com dois tumores do espectro da síndrome de Lynch, incluindo tumores colorretais ou tumores extra-colônicos associados à síndrome, sincrônicos ou metacrônicos *

3- Indivíduos com câncer colorretal e um familiar em primeiro grau com câncer colorretal e/ou com um câncer extra-colônico associado à síndrome e/ou um adenoma colorretal; um dos cânceres deve ter sido diagnosticado em idade inferior a 45 anos e o adenoma com idade inferior a 40 anos.

4- Indivíduos com câncer colorretal ou câncer de endométrio diagnosticado abaixo dos 45 anos

5- Indivíduos com câncer colorretal localizado no lado direito do intestino grosso e apresentando um padrão indiferenciado (sólido, cribriforme) no exame histopatológico e diagnosticado abaixo dos 45 anos **.

6- Indivíduos com câncer colorretal com células do tipo anel de sinete diagnosticado abaixo dos 45 anos ***

7- Indivíduos com adenomas diagnosticados abaixo dos 40 anos

Nota: (*) os tumores extra-colônicos associados à síndrome de Lynch, originalmente descritos nas Recomendações de Bethesda são: endometrial, ovariano, gástrico, do trato hepatobiliar, câncer de intestino delgado, carcinoma de células transicionais da pelve renal ou do ureter. (**) a característica sólida/cribriforme foi definida nas Recomendações de Bethesda como sendo carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados compostos por células irregulares, camadas sólidas de células eosinofílicas grandes e contendo pequenos espaços semelhantes a glândulas. (***) o tumor deveria ser composto por mais de 50% de células com o formato em anel de sinete. Fonte: Rodriguez-Bigas e colaboradores (1997)

Tabela 6 – Recomendações de Bethesda Revisadas

Ao menos um dos seguintes critérios deve ser preenchido para que um câncer de um indivíduo seja testado quanto à presença de instabilidade de microssatélites

- 1- Câncer colorretal diagnosticado abaixo dos 50 anos
- 2- Presença de tumores colorretais, ou outro tumor associado ao espectro da síndrome de Lynch, sincrônicos ou metacrônicos, independentemente da idade ao diagnóstico *
- 3- Câncer colorretal com histologia típica de MSI-H diagnosticado em paciente abaixo dos 60 anos **
- 4- Probando diagnosticado com câncer colorretal diagnosticado em um ou mais familiares com parentesco em primeiro grau, com um tumor relacionado à síndrome de Lynch, sendo que um dos cânceres deve ter sido diagnosticado abaixo dos 50 anos
- 5- Probando diagnosticado com câncer colorretal diagnosticado em dois ou mais familiares com parentesco em segundo grau, com tumores associados à síndrome de Lynch, independentemente da idade ao diagnóstico

Legenda: MSI-H significa instabilidade de microssatélites alta (*) Tumores associados ao espectro da síndrome de Lynch nas recomendações revisadas de Bethesda incluem: câncer colorretal, endometrial, de estômago, ovariano, pancreático, de ureter e de pelve renal, do trato biliar, de cérebro (normalmente glioblastoma), adenomas de glândulas sebáceas e queratoacantomas, além de câncer do intestino delgado. (**) as características que definem uma histologia típica de tumores colorretais com MSI-H são: presença de infiltrado linfocitário, reação linfocítica do tipo Crohn, diferenciação mucinosa/anel de sinete ou padrão de crescimento medular. Fonte: Umar e colaboradores (2004).

Os critérios clínicos de Amsterdam e as recomendações clínico-patológicas de Bethesda, embora amplamente empregados para identificar subgrupos de indivíduos com maior probabilidade de possuírem síndrome de Lynch, foram desenvolvidos com um foco principal em câncer colorretal e não são extensivamente aplicáveis para a população de casos de câncer de endométrio (BATTE et al., 2014). Desse modo, a SGO criou, em 2007, um conjunto de critérios clínicos de triagem de pacientes que deveriam ser testadas para síndrome de Lynch com foco em cânceres ginecológicos. Foram estabelecidos critérios para identificar dois grupos de pacientes: aquelas com probabilidade de 5 a 10% de possuírem uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR (Tabela 7) e aquelas com probabilidade de 20 a 25% (Tabela 8). A realização de testes para diagnóstico molecular e aconselhamento genético em pacientes do grupo de 5 a 10% de probabilidade é razoavelmente recomendada enquanto que para o grupo de 20 a 25% de probabilidade, esta abordagem é fortemente recomendada (LANCASTER et al., 2007; BRUEGL et al., 2014).

Tabela 7 – Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch com probabilidade de 5 a 10% de possuírem uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR

O preenchimento de um dos seguintes critérios enquadra o paciente no grupo de 5 a 10% de probabilidade de possuir uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR e, portanto, poderia se beneficiar da investigação para síndrome de Lynch

- 1- Paciente com câncer de endométrio ou colorretal diagnosticado abaixo dos 50 anos
- 2- Paciente com câncer de endométrio ou câncer de ovário com um câncer sincrônico ou metacrônico do espectro da síndrome de Lynch, diagnosticados em qualquer idade *
- 3- Paciente com câncer de endométrio ou colorretal e um familiar com parentesco em primeiro grau diagnosticado com um câncer do espectro da síndrome de Lynch diagnosticado abaixo dos 50 anos.
- 4- Paciente com câncer de endométrio ou colorretal diagnosticado em qualquer idade com dois ou mais familiares com parentesco em primeiro ou segundo grau diagnosticados com câncer do espectro da síndrome de Lynch, diagnosticados em qualquer idade
- 5- Paciente com um familiar com parentesco em primeiro grau que preencha o critério anterior

Nota: (*) tumores relacionados ao espectro da síndrome de Lynch no presente conjunto de critérios são: câncer colorretal, endometrial, de estômago, ovariano, pancreático, de ureter e de pelve renal, do trato biliar, cerebral (geralmente glioblastoma), adenoma de glândulas sebáceas e queratoacantomas e carcinoma de intestino delgado. Fonte: Lancaster e colaboradores (2007).

Tabela 8 – Critérios da SGO para identificação de indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio ou outro tumor associado à síndrome de Lynch com probabilidade de 20 a 25% de possuírem uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR

O preenchimento de um dos seguintes critérios enquadra o paciente no grupo de 20 a 25% de probabilidade de possuir uma mutação germinativa em um dos genes do sistema MMR e, portanto, poderia se beneficiar da investigação para síndrome de Lynch

- 1- Pacientes diagnosticados com câncer de endométrio ou câncer colorretal que preencham os critérios de Amsterdam II
- 2- Paciente com cânceres de endométrio ou cânceres colorretais sincrônicos ou metacrônicos com o primeiro câncer diagnosticado antes dos 50 anos
- 3- Paciente com cânceres de ovário ou cânceres colorretais sincrônicos ou metacrônicos com o primeiro câncer sendo diagnosticado abaixo dos 50 anos
- 4- Paciente com câncer colorretal ou câncer de endométrio com evidência de um defeito no sistema de reparo MMR *
- 5- Pacientes com um familiar com parentesco em primeiro grau com uma mutação conhecida em um gene do sistema de reparo MMR

Nota: (*) São consideradas evidências de defeito no sistema de reparo MMR: tumores com instabilidade de microssatélites ou com imuno-histoquímica mostrando perda da expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2. Fonte: Lancaster e colaboradores (2007).

Os critérios clínicos de triagem de síndrome de Lynch, baseados em histórias pessoais e familiares de câncer (tais como os critérios de Amsterdam e os critérios da SGO), além de critérios clínico-patológicos, tais como as Recomendações de Bethesda, têm como objetivo aperfeiçoar o diagnóstico molecular dessa síndrome e evitar investigações laboratoriais desnecessárias (LIPTON et al., 2004). Apesar disso, estes critérios, não são considerados os melhores métodos de triagem para investigação de síndrome de Lynch, sobretudo em pacientes diagnosticadas com câncer de endométrio, tendo em vista a baixa sensibilidade que eles apresentam em identificar indivíduos portadores de mutações nos genes MMR. Deste modo, outros métodos de triagem de síndrome de Lynch têm sido utilizados com o intuito de aumentar a sensibilidade de identificação de portadores de mutações nos genes do sistema de reparo MMR (HAMPEL et al., 2006).

1.2.4.2 Abordagem de triagem universal nos tumores

A presença de instabilidade em marcadores de microssatélites e a perda de expressão das principais proteínas do sistema MMR são características típicas de tumores que se desenvolvem em portadores da síndrome de Lynch (BRUEGL et al., 2017). Algumas técnicas moleculares, tais como a análise de instabilidade de microssatélites (MSI), avaliação da expressão das proteínas dos genes MMR por imuno-histoquímica (IHQ) e a análise de metilação da região promotora do gene *MLH1*, são frequentemente utilizadas para avaliar o estado de proficiência do sistema MMR em mostras de câncer colorretal e câncer de endométrio para identificar pacientes com maior probabilidade de serem portadores da síndrome de Lynch (FOLKINS; LONGACRE, 2013).

A utilização destas técnicas moleculares como método de triagem aplicada em todos os casos de câncer de endométrio ou colorretais, sem seleção prévia dos casos por meio características clínico-patológicas, é conhecida como “abordagem de triagem universal” e é fortemente recomendada por ser mais sensível em detectar portadores da síndrome de Lynch do que abordagens baseadas apenas em características clínicas (SGO, 2014). Esta abordagem de triagem possui, virtualmente, sensibilidade completa (100%) para identificar casos de síndrome de Lynch a partir de casos de endométrio, já que todos os indivíduos diagnosticados com câncer de endométrio são incluídos na triagem para investigação de mutações germinativas nos genes MMR, com base na análise da proficiência do sistema MMR nos casos de câncer de endométrio (WIN et al., 2013b). A análise de mutações germinativas em genes relacionados a

síndrome de Lynch é fortemente recomendada para determinar quais delas são reais portadoras dessa síndrome (GARG; SOSLOW, 2009; NCCN, 2017).

O Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas e a Sociedade Americana de Oncologia Ginecológica recomendam a aplicação abordagem de triagem universal em tecido tumoral de casos de câncer de endométrio para a identificação de mulheres em risco para a síndrome de Lynch (SGO, 2014). A seguir estas técnicas moleculares de triagem de casos de câncer de endométrio para investigação da síndrome de Lynch, com base no estado de proficiência do sistema de reparo MMR serão abordadas com mais detalhes.

1.2.4.2.1 Instabilidade de Microssatélite

Defeitos no sistema de reparo MMR aumentam, consideravelmente, a taxa de ocorrência de mutações no genoma celular tornando as células vulneráveis a adquirirem mutações em genes que controlam o ciclo celular e, deste modo, aumentando o risco de surgimento de um câncer (LICCARDO et al., 2017).

Microssatélites são curtas sequências de DNA, repetidas em tandem e compostas por unidades de repetição de 1 a 6 nucleotídeos que estão espalhadas pelo genoma humano. Devido à sua estrutura de DNA repetitivo, os microssatélites são altamente propensos a sofrer erros durante a replicação. Estes erros são constituídos, geralmente, por alças intra-filamentares que se formam pela dificuldade das DNA-Polimerases em sintetizar novas fitas de DNA a partir de sequências-molde altamente repetitivas. Estas alças geram mutações de mudança no quadro de leitura (*frameshift*) quando não são reparados pelo sistema de reparo MMR. Células que são deficientes da atividade do sistema MMR são mais propensas a acumular mutações em regiões de microssatélites, gerando um fenótipo molecular de instabilidade genômica conhecida como instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês, *microsatellite instability*) (VILAR, GRUBER, 2010).

O fenômeno de MSI é considerado uma consequência da deficiência do sistema de reparo MMR em células tumorais, já que este mecanismo de reparo é o principal responsável por reconhecer e corrigir erros de replicação que ocorrem em regiões de microssatélites (ETO et al. 2016). Mais de 95% dos tumores que se desenvolvem em pacientes portadores da síndrome de Lynch apresentam MSI, enquanto que apenas 10 a 15% dos tumores esporádicos apresentam esse fenótipo molecular. A identificação de MSI tornou-se um indicador confiável de defeitos no sistema de reparo MMR em tumores humanos à medida que marcadores moleculares eficazes foram estabelecidos (MARTÍN-LÓPEZ; FISHEL, 2013).

No ano de 1997, em uma reunião do NCI foi proposto, pela primeira vez, um painel de cinco marcadores microssatélites para testar MSI em tumores colorretais, que incluiu dois marcadores com unidades de repetição mononucleotídicas (BAT-25 e BAT-26) e três marcadores com repetições dinucleotídicas (D2S123, D5S346 e D17S250). Este painel de microssatélites consta nas Recomendações de Bethesda (BOLAND et al., 1998). Com o passar dos anos, foi mostrado que a sensibilidade e especificidade do teste de MSI poderiam ser melhoradas com a adição de outros marcadores mononucleotídeos (SURAWEERA et al., 2002; BUHARD et al., 2004). Em seguida, foi recomendado um novo painel de microssatélites, constituído por cinco marcadores de repetições mononucleotídicas quase monomórficos: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e NR-27 (UMAR et al., 2004).

As Recomendações de Bethesda estabeleceram três categorias de MSI com base no número de microssatélites exibindo instabilidade em suas sequências: Instabilidade de Microssatélites Alta (MSI-H, do inglês, *Microsatellite Instability - High*) quando dois dos cinco marcadores, ou mais de 30% em painéis maiores, apresentarem instabilidade; Instabilidade de Microssatélites Baixa (MSI-L, do inglês, *Microsatellite Instability - Low*) quando apenas um dos cinco marcadores ou menos de 30% dos marcadores em painéis maiores, apresentarem instabilidade e por fim, Estabilidade de Microssatélites (MSS, do inglês, *Microsatellite Stable*) quando nenhum dos marcadores do painel de microssatélites apresentarem instabilidade (VILAR; GRUBER, 2010).

A princípio, os casos que apresentam MSI-L não possuem defeitos no sistema de reparo MMR detectáveis, ao passo que, casos classificados como MSI-H podem apresentar defeitos nos genes que codificam os principais componentes deste mecanismo de reparo, identificados de forma indireta por IHQ, ou diretamente na sequência dos genes. Biologicamente, tumores com MSI-H apresentam comportamento diferente de tumores com MSI-L e MSS, contudo, ainda não está claro se tumores classificados com MSI-L e com MSS devem ser tratados como uma única categoria ou como categorias distintas (BOLAND et al., 2008; LAGHI; BIANCHI; MALESCI, 2008).

O fenômeno de MSI é detectado por amplificação de microssatélites específicos por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). A presença de MSI é determinada por meio de comparações no tamanho do fragmento gerado pela amplificação do microssatélite em células normais e tumorais. DNA normal é extraído de tecido normal adjacente ao tumor ou de células sanguíneas (VILAR; GRUBER, 2010). A análise dos fragmentos amplificados era realizada, inicialmente, em géis desnaturantes de acrilamida e *primers* marcados com radiação. Posteriormente, este processo

foi melhorado com a implementação de *primers* fluorescentes e eletroforese capilar, permitindo a detecção de mudança no comprimento dos microssatélites de até mesmo um único nucleotídeo (LAGHI; BIANCHI; MALESCI, 2008).

Originalmente, a análise de MSI foi desenvolvida para ser aplicada em amostras de câncer colorretal, sobretudo no contexto do diagnóstico da síndrome de Lynch. À medida que tumores extra-colônicos foram introduzidos no espectro desta síndrome, as ferramentas de triagem, sobretudo MSI foram estendidas a esses outros tipos de tumores. Entretanto, tornou-se evidente que as condições de diagnóstico de MSI em tumores colorretais nem sempre são perfeitamente aplicáveis aos outros tipos de câncer que podem ocorrer na síndrome de Lynch. No cenário do câncer de endométrio, a utilização de marcadores mononucleotídicos é preferível, uma vez que estes são mais sensíveis e apresentam maior acurácia em detectar tumores com MSI-H do que marcadores dinucleotídicas propostos pelo painel de Bethesda (WONG et al., 2006).

Apesar de serem consideradas técnicas complementares, a análise de MSI possui algumas vantagens sobre a técnica de IHQ para detectar tumores deficientes do sistema de reparo de MMR. Em situações onde a disponibilidade de material tumoral é limitada, a análise de MSI pode ser realizada em uma única secção do tumor ao passo que, no mínimo quatro secções são necessárias para a realização das análises por IHQ da expressão das quatro principais proteínas do sistema MMR. Além disso, a técnica de MSI é mais sensível em detectar tumores deficientes do sistema MMR originados em portadores de mutações que causam a perda da função de uma proteína, mas não altera sua antigenicidade ou ainda, em casos onde a causa da deficiência do sistema MMR no tumor é advinda de defeitos em genes que codificam proteínas não que não investigadas pela técnica de IHQ (ZHANG, 2008).

1.2.4.2.2 Imuno-histoquímica

A detecção de tumores com deficiência no sistema MMR também pode ser realizada, adicionalmente, pela técnica de IHQ para análise de expressão das proteínas do sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (HUTH et al., 2012). A IHQ tem se tornado, rapidamente, uma abordagem eficiente e barata de triagem de tumores quanto à proficiência do sistema MMR. Tumores deficientes são definidos pela ausência de produto proteico expresso por genes do sistema MMR (RESNICK et al., 2009).

Aproximadamente em 1996, os anticorpos monoclonais contra proteínas do sistema de reparo MMR começaram a ser disponibilizados, começando pela síntese dos anticorpos para as

proteínas MSH2 e MLH1 e, posteriormente, para MSH6 e PMS2. Estes anticorpos tornaram a detecção das proteínas desse sistema de reparo por IHQ possível, proporcionando, deste modo, uma metodologia alternativa para a detecção da deficiência do sistema MMR em tumores (SHIA, 2008).

Em células proliferativas normais, ocorre a expressão nuclear das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. O sistema MMR eucariótico utiliza estas proteínas para formar dímeros e efetuar o reparo detectado. O heterodímero MutL α é formado pela união das proteínas MLH1 e PMS2, enquanto que o heterodímero MutS α é formado pelas proteínas MSH2 e MSH6. Quando dissociadas de uma estrutura dimérica, estas proteínas são instáveis e sofrem rápida degradação. Uma mutação que impede a expressão do gene *MLH1* geralmente resulta na perda das proteínas MLH1 e PMS2 e, do mesmo modo, a inativação do gene *MSH2* resulta na perda de expressão das proteínas MSH2 e MSH6. Entretanto, mutações que inativam os genes *MSH6* e *PMS2* resultam na perda de expressão apenas de suas respectivas proteínas, pois as proteínas MLH1 e MSH2 podem se ligar a outras proteínas do sistema MMR, formando heterodímeros alternativos (BELLIZZI; FRANKEL, 2009).

A análise de proficiência do sistema MMR pela técnica de IHQ apresenta alta sensibilidade (em torno de 92%) na identificação de portadores de mutações germinativas em genes desse mecanismo de reparo a partir da triagem baseada na análise de expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em tecidos de câncer de endométrio (HAMPEL et al., 2006). Além de detectar tumores deficientes do sistema MMR, o uso da técnica de IHQ tem o potencial de prever o gene do sistema afetado por uma mutação germinativa, direcionando os testes de moleculares de diagnóstico da síndrome de Lynch e, deste modo, reduzindo custos ao direcionar os testes moleculares para detecção da mutação causadora do defeito no sistema de reparo (BUZA; ZIAI; HUI, 2016).

Apesar das vantagens da utilização da IHQ para triagem de tumores endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR, essa técnica apresenta algumas limitações e, deste modo, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela. Variações na etapa de fixação dos tecidos, assim como em outras questões técnicas podem ocasionar uma coloração fraca ou equívoca (SHIA, 2008). Além disso, a variabilidade inter-observacional deve ser considerada por afetar, consideravelmente, a sensibilidade e especificidade da técnica (KLARSKOV et al., 2010).

1.2.4.2.3 Metilação do promotor do gene *MLH1*

Metilação de DNA refere-se à presença de grupos metila em resíduos de citosina. A metilação de DNA em genes supressores tumorais, que desencadeia a inativação transcricional destes genes, é um importante mecanismo presente no processo de carcinogênese humana (LI et al., 2013).

Ilhas CpG são regiões de DNA com tamanho superior a 500 pares de base, contendo mais de 55% de seu conteúdo nucleotídico constituído por citosinas e guaninas, além de apresentarem uma relação entre as taxas observadas e esperadas de conteúdo CpG superiores a 0,65. Em genes transcricionalmente ativos, os sítios CpG localizados dentro de ilhas CpG de regiões promotoras estão desmetilados, ao passo que o aumento de metilação de citosinas nessas ilhas está associado com a redução da expressão gênica e, conseqüentemente, com o possível silenciamento do gene metilado (SEPULVEDA et al., 2009).

Embora a deficiência no sistema de reparo MMR, evidenciada pela presença de MSI ou perda da expressão de uma ou mais proteínas desse sistema de reparo, seja uma característica fortemente associada aos tumores que se desenvolvem em portadores da síndrome de Lynch, esse fenótipo molecular não é exclusivo de tumores dessa síndrome. Aproximadamente 15% dos tumores colorretais e 17 a 23% dos tumores endometriais exibem altos níveis de instabilidade de microssatélites e perda das proteínas MLH1 e PMS2 devido à hipermetilação do promotor do gene *MLH1*, que configura um evento somático (COHEN, 2014).

Deng e colaboradores (1999) dividiram a sequência do promotor do gene *MLH1* em quatro regiões, na tentativa de entender o papel da metilação nos sítios CpG em cada uma dessas regiões na expressão gênica. Estes autores denominaram de região A o intervalo de -711 a -577 nucleotídeos, tendo como ponto de referência o primeiro nucleotídeo a ser transcrito (+1); a região B compreende o intervalo de -552 a -266 nucleotídeos; a região C consiste na região entre -248 a -178 nucleotídeos e a região D envolve o intervalo de -109 a +15 nucleotídeos. Após a análise de metilação em cada uma destas regiões em diferentes linhagens celulares de câncer colorretal, em associação com avaliação da expressão gênica de *MLH1*, foi constatada que a região C é crítica para a regulação gênica e que a presença de metilação nesta região está associada com a perda de expressão gênica. De maneira semelhante, a presença de metilação na região C do promotor do gene *MLH1* apresenta maior especificidade como um marcador de perda de expressão desse gene em tumores de endométrio (METCALF; SPURDLE, 2013).

Tumores de endométrio que apresentam metilação na região C do promotor do gene *MLH1* estão associados aos casos esporádicos de câncer de endométrio ao invés dos casos hereditários. Portanto, a investigação de metilação na região promotora deste gene evita que casos esporádicos de câncer de endométrio sejam incluídos nas investigações moleculares de

mutações germinativas associadas à síndrome de Lynch (SIMPKINS et al., 1999; WHELAN et al., 2002; BRUEGL et al., 2014).

Além da análise de metilação do gene *MLH1*, a análise de variantes específicas no gene *BRAF* é frequentemente utilizada para identificar casos esporádicos de câncer. O gene *BRAF* codifica um importante membro da via de sinalização RAS/RAF/MAPK, que regula o crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose em células normais e cancerosas (McCUBREY et al. 2007). Mutações no gene *BRAF*, especificamente a mutação V600E, estão associadas com a presença de metilação no promotor do gene *MLH1* em tumores colorretais. Deste modo, testes para a metilação do gene *MLH1* ou da presença da variante *BRAF* V600E em tumores colorretais podem ser utilizados como marcadores negativos de predição de mutações germinativas em etapas de triagem de pacientes com câncer colorretal deficiente do sistema MMR (BUCHANAN et al., 2014).

A despeito da aplicabilidade de triagem da variante *BRAF* V600E em tumores colorretais, esta variante genética é tão infrequente em tumores endometriais que não deve ser considerada como um marcador útil para triagem de casos de síndrome de Lynch. Deste modo, no contexto do câncer de endométrio, a avaliação de metilação do promotor do gene *MLH1* é o teste mais indicado para se excluir casos para investigação germinativa de síndrome de Lynch quando os tumores endometriais apresentarem ausência da proteína MLH1 ou MSI-H (COHEN, 2014; METCALF; SPURDLE, 2014).

1.2.5 Manejo clínico e aconselhamento genético

Uma vez estabelecido o diagnóstico molecular da síndrome de Lynch em um indivíduo, o risco para o desenvolvimento de cânceres característicos dessa síndrome pode ser estimado para a família e recomendações para seguimento periódico podem ser formuladas. A partir da detecção da mutação associada à etiologia da síndrome no probando, testes pré-sintomáticos para detecção desta mutação podem ser oferecidos para outros membros da família. Esses testes devem ser iniciados após consultas individuais de aconselhamento genético visando elucidar os custos e benefícios do teste genético oferecido. Para todos os portadores da mutação identificados, deve ser oferecido o manejo clínico periódico e para os indivíduos não portadores da mutação específica, a realização de protocolos intensivos de monitoramento periódico dos tumores da síndrome de Lynch pode ser descartada (HENDRIKS et al., 2006).

Durante o processo de tomada de decisões a respeito de qual protocolo de seguimento deve ser recomendado, uma abordagem razoável seria a discussão prévia, em conjunto com o

paciente, sobre os diferentes riscos de desenvolvimento de câncer que este indivíduo possa ter, assim como quais protocolos de triagem destes tumores são estabelecidos como efetivos (por exemplo, rastreamento para câncer colorretal e endometrial) bem como os riscos, custos e benefícios de cada um deles. Por fim, deve ser recomendado que todos os familiares, possivelmente em risco para a síndrome de Lynch, procurem atendimento médico especializado caso haja a percepção de sinais e sintomas de possíveis neoplasias (VASEN et al., 2007).

Diante do acelerado processo de carcinogênese associado a indivíduos portadores de mutações germinativas nos genes do sistema de reparo MMR, um monitoramento intensivo nestes indivíduos, baseado em colonoscopias periódicas, realizadas a cada 1-2 anos, a começar pela idade de 20-25 anos, ou no mínimo 2 a 5 anos antes da idade de diagnóstico do caso de câncer colorretal mais jovem na família, se diagnosticado antes dos 25 anos, é fortemente recomendado (KASTRINOS; STOFFEL, 2014; NCCN, 2017).

O risco aumentado para o câncer de endométrio em mulheres com síndrome de Lynch requer opções de triagem e manejo clínico personalizadas para portadoras desta síndrome. O rastreamento desse câncer por exames específicos ginecológicos, ultrassom transvaginal e biópsias endometriais, começando aos 30 ou 35 anos, pode detectar lesões pré-neoplásicas e cânceres em estádios iniciais de desenvolvimento. Histerectomia profilática e salpingo-ooforectomia bilateral podem ser uma boa opção para mulheres com síndrome de Lynch em período pós-menopausa, já que estas medidas reduzem substancialmente a ocorrência de cânceres sítio-específicos (VASEN et al., 2007). O período para a realização dessas cirurgias profiláticas deve ser individualizado, baseado em diversos fatores, tais como o período reprodutivo em que a paciente se encontra, histórico de comorbidades, história familiar identificação do gene que está mutado em cada caso, uma vez que os riscos para o desenvolvimento de câncer de endométrio e câncer de ovário variam de acordo com o gene mutado (NCCN, 2017).

Embora triagem de câncer gástrico, câncer duodenal e câncer do intestino delgado em portadores da síndrome de Lynch sejam pouco encorajados, a realização da esofagogastroduodenoscopia com duodenoscopia estendida, iniciando-se dos 30 a 35 anos e em intervalos de 3 a 5 anos, pode ser considerada. Além disso, é altamente recomendada a realização de exames endoscópicos a cada dois anos, começando aos 30 anos de idade, em famílias com câncer gástrico ou que possuam alto risco étnico para este tipo de câncer (KASTRINOS; STOFFEL, 2014; NCCN, 2017; RYAN et al., 2017;).

A triagem de outros tumores associados à síndrome de Lynch dependerá do espectro específico de cânceres em cada família e as recomendações são, frequentemente, individualizadas. O manejo de tumores menos frequentes do espectro dessa síndrome de predisposição a câncer não é recomendado fora do contexto de ensaios clínicos, devido à baixa sensibilidade e especificidade encontradas em investigações conduzidas até o momento (KASTRINOS; STOFFEL, 2014; RYAN et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A detecção de mulheres em risco para síndromes hereditárias de predisposição a câncer é crítica para o rastreamento, prevenção e manejo de cânceres ginecológicos e outras neoplasias associadas às síndromes (FOLKINS; LONGACRE, 2013). Mulheres com síndrome de Lynch que foram diagnosticadas com câncer de endométrio possuem um risco maior de desenvolver outros tipos de câncer em relação à população em geral. (WIN et al., 2013a). Nesse contexto, o diagnóstico dessa condição pode contribuir para um melhor prognóstico e aumento da expectativa de vida tanto das pacientes portadoras quanto de seus familiares, também em risco para síndrome de Lynch, por meio do atendimento personalizado, seguimento intensivo, detecção precoce e prevenção de outros tipos de câncer associados à esta síndrome (EGOAVIL et al., 2013; MOLINE et al., 2013; BRUEGL, et al., 2014).

A triagem da síndrome de Lynch, baseada na abordagem universal de investigação da proficiência do sistema de reparo MMR em tumores de endométrio, é reconhecidamente útil para identificar portadores desta síndrome a partir de casos de câncer de endométrio. Apesar de ser fortemente recomendada, a aplicação dessa abordagem de triagem ainda não é universalmente aceita (CRISPENS, 2012; VASEN et al., 2013; SGO, 2014). Desse modo, trabalhos que utilizam a abordagem de triagem universal são necessários para assegurar sua adequada consolidação, a fim de maximizar a identificação de mulheres em risco para síndrome de Lynch e determinar estratégias custo-efetivas de prevenção de câncer em famílias com incidência dessa síndrome (FERGUSON, et al., 2014).

Diferentemente do que ocorre com cânceres de cólon e reto, pesquisas envolvendo os casos de câncer de endométrio associados à síndrome de Lynch ainda estão evoluindo (EGOAVIL et al., 2013). Alguns estudos de diagnóstico dessa síndrome em casuísticas brasileiras contendo casos de câncer de endométrio já foram publicados (SILVA et al., 2010; ANDRADE et al., 2013; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2013; SILVA et al., 2015). Contudo, trabalhos dessa natureza empregando a abordagem de triagem universal para investigação molecular de síndrome de Lynch são escassos (COSSIO et al., 2010; ROCHA et al., 2010). Deste modo, pouco se sabe sobre a frequência de tumores de endométrio deficientes do sistema MMR na população brasileira. Esta frequência pode ser estimada com maior eficácia pela abordagem universal de triagem da proficiência da atividade do sistema de reparo MMR em casos de câncer de endométrio brasileiros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar uma casuística brasileira composta por casos de adenocarcinoma endometriode de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo de pareamento incorreto de DNA.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar casos de câncer de endométrio quanto às características clínicas e histopatológicas.
- Avaliar a expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em tumores de endométrio.
- Avaliar o *status* de instabilidade em marcadores microssatélite nos tumores de endométrio com expressão das quatro proteínas do sistema de reparo MMR avaliadas.
- Investigar a ocorrência de metilação na região promotora do gene *MLH1* em tumores que não expressarem a proteína MLH1.
- Correlacionar o *status* de proficiência do sistema de reparo MMR com os dados clínicos e histopatológicos dos tumores caracterizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

A casuística foi composta por casos de câncer de endométrio, fixados 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). Os critérios de inclusão foram: os tumores deveriam ser do tipo adenocarcinoma endometriode primário do endométrio, terem sido armazenados durante o período de 01/01/2005 a 01/01/2016 e deveria haver material tumoral suficiente para a realização dos testes moleculares de proficiência do sistema MMR.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o parecer de número 1.578.206 (ANEXO A). No processo, foi solicitada e concedida dispensa de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para utilização do material tumoral armazenado no SERPAT-HCRP.

4.3 Caracterização clínico-patológica

Os dados clínicos e histopatológico dos casos de câncer de endométrio incluídos no trabalho foram obtidos através da revisão de prontuários e laudos anátomo-patológicos. O estadiamento patológico dos tumores de endométrio foi obtido seguindo as diretrizes da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) de 2009 (PECORELLI, 2009).

4.4 Caracterização molecular da proficiência do sistema MMR

4.4.1 Análise de expressão das proteínas do MMR

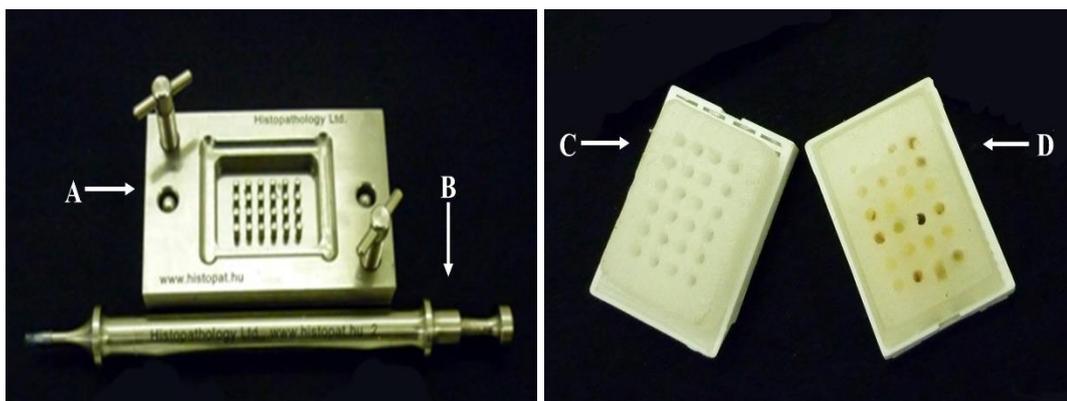
A expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 foi analisada por IHQ em amostras de todos os tumores de endométrio selecionados para compor a casuística, utilizando-se microarranjos em matriz de amostras teciduais (TMA, do inglês, *tissue micro-array*).

4.4.1.1 Construção dos microarranjos de tecidos

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina de cada caso de câncer de endométrio foram revisadas por dois patologistas (A.R.S e F.C.) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para delimitar a área mais representativa de células neoplásicas em cada tumor, que foi utilizada para a construção dos TMA em bloco de parafina.

Os blocos de TMA foram construídos utilizando-se o equipamento *tissue micro-array builder* (Histopathology, Ltd., Akác u. 8.,7632, Pécs, Hungary, Baranya) de acordo com instruções do fabricante, nas seguintes etapas: 1- delimitação de área tumoral representativa em cada bloco de parafina doador; 2- construção de blocos de parafina doadores, utilizando o molde contido no Kit de construção de TMAs, com capacidade de abrigar até 24 amostras de tecido em formato de cilindros de 2 mm cada; 3- extração de um cilindro tecidual da região tumoral delimitada em cada bloco doador, utilizando um extrator de *punch*; 4- transferência dos cilindros teciduais extraídos dos blocos doadores para os blocos de parafina receptores; 5- criação de um mapa de localização e identificação de cada amostra contida em cada bloco receptor construído; e 6- inclusão de uma amostra de tecido hepático na primeira posição à esquerda de cada bloco receptor para possibilitar a correta identificação das amostras nos blocos receptores (Figura 5).

Figura 5 – Construção dos microarranjos de tecido



Legenda: (A) construtor dos TMAs contendo o molde para a construção dos blocos receptores. (B) extrator de *punch*. (C) bloco receptor vazio. (D) bloco de TMA finalizado, contendo 24 amostras de tecido cilíndricas. Fonte: Adaptado de Soave (2011)

4.4.1.2 Reações de imuno-histoquímica

Foram realizados cortes de 3 μm dos blocos de TMA utilizando-se o sistema *Paraffin Tape-transfer System* (Instrumedics, Saint Louis, USA). Os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro silanizadas a 8% para a realização do método imuno-histoquímico, seguindo-se os passos e utilizando-se os materiais descritos abaixo:

- 1- As lâminas obtidas a partir dos blocos de TMA foram colocadas em estufa à 37°C *overnight* para dar início ao processo de desparafinização.
- 2- No dia seguinte, as lâminas foram mergulhadas em xilol (duas vezes por 15 minutos cada) para finalizar o processo de desparafinização.
- 3- Para hidratação dos tecidos, as lâminas foram passadas em uma série de álcoois (100%, 95% e 80%, respectivamente e por 15 segundos em cada álcool) e em duas séries de água destilada, um minuto cada.
- 4- Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica por calor. Para tal, as lâminas foram incubadas com tampão EDTA (pH=8,0) em panela a vapor por 40 minutos.
- 5- Após o período de recuperação antigênica, as lâminas foram retiradas da panela a vapor e permaneceram em temperatura ambiente por 20 minutos, ainda mergulhadas em tampão EDTA.
- 6- Posteriormente, o entorno de cada um dos cortes histológicos nas lâminas foi delimitado com caneta hidrofóbica.
- 7- As lâminas foram então lavadas com tampão PBS (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.
- 8- Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena adicionando 100 μL do reagente *Hydrogen Peroxidase Block* (Spring Biscience, Pleasanton, CA, EUA) sobre cada corte por 15 minutos.
- 9- O produto utilizado para bloqueio da peroxidase endógena foi, então, removido e os cortes sobre as lâminas foram lavados com tampão PBS (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.

10- As lâminas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos primários descritos na Tabela 9. Foram utilizadas quatro lâminas derivadas de cada bloco de TMA, cada uma foi incubada com um anticorpo primário diferente. Os anticorpos foram diluídos em tampão BSA 1% (diluído em tampão PBS com pH=7,6).

11- Após o período de incubação, os anticorpos primários foram removidos dos cortes histológicos e foram aplicados dois banhos com tampão PBS (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.

Tabela 9 – Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Anticorpo	Fabricante	Clone	Organismo	Diluição
Anti-MLH1	BioSB	6168-728	camundongo	1:100
Anti-MSH2	Leica	25D12	camundongo	1:250
Anti-MSH6	Santa Cruz	6TBP H-141	camundongo	1:75
Anti-PMS2	Leica	MOR46	camundongo	1:25

12- Em seguida, foram aplicados 100 µL do reagente *REVEAL Complement* (Spring Biscience) que consiste em anticorpos secundários originados de coelhos, que se ligam aos anticorpos primários derivados de camundongo, que foram utilizados no passo 10 deste protocolo. O reagente permaneceu sobre os cortes histológicos por 15 minutos e foi removido em seguida.

13- Posteriormente, 100 µL do reagente *REVEAL HRP Conjugate* (Spring Biscience) foram adicionados sobre os cortes histológicos permanecendo por 15 minutos. Este reagente é composto por anticorpos caprinos que se ligam aos anticorpos secundários, utilizados no passo 12 deste protocolo. Esses anticorpos caprinos são conjugados com a enzima HRP (Horseradish Peroxidase) que, na presença de substratos cromogênicos, tais como o DAB (3,3'-Diaminobenzidina) e peróxido de hidrogênio, promovem uma reação de oxidação que produz uma mudança no meio, caracterizada por mudança de coloração do substrato.

14- O reagente *REVEAL HRP Conjugate* foi então removido e as lâminas histológicas passaram por dois banhos com tampão PBS (pH= 7,6) por duas vezes, com duração de 10 minutos cada.

15- Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de DAB na proporção de 1:50 (1,0 µL de DAB para cada 50,0 µL do reagente *DAB Substrate – Spring Biosciences*), em cada lâmina histológica, por um minuto. A reação de oxidação do substrato cromogênico pela enzima HPR

gerou precipitados com tonalidade amarronzada, que foram utilizados para as posteriores análises em microscópio óptico de luz.

16- Após o período de exposição ao DAB, as lâminas foram imediatamente mergulhadas em água destilada para interromper a reação de oxidação do substrato cromogênico.

17- As lâminas foram contra-coradas com o reagente hematoxilina de Harris, mergulhando-as em solução de hematoxilina por 20 segundos e, posteriormente, transferindo-as para solução de água amoniacal até que os cortes histológicos atingissem uma coloração azul-brilhante.

18- Posteriormente, as lâminas passaram por uma série de álcoois (80%, 95% e 100% respectivamente e por 15 segundos em cada álcool) para promover a desidratação dos tecidos.

19- As lâminas foram transferidas para uma solução de álcool 100% e xilol (1:1) por 15 segundos, em seguida, foram transferidas para recipientes contendo xilol puro (duas vezes com duração de 15 minutos cada) para que ocorresse a diafanização, ou seja, a remoção do álcool dos tecidos.

20- Após a etapa de diafanização, as lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Tissue-Tek® Tissue-Mount (Sakura Finetek, Tóquio, Japão) e lamínulas com medida de 24 x 60 mm (EasyPath, São Paulo, Brasil).

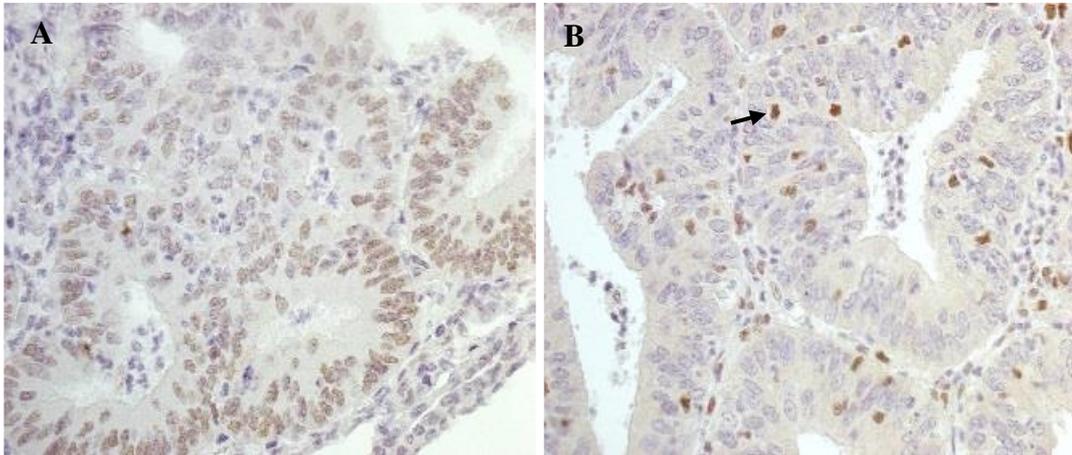
Cortes histológicos de tecidos provenientes de cólon saudável (não acometido por neoplasia) foram utilizados como controle positivo para marcação dos anticorpos primários utilizados, seguindo-se as recomendações do fabricante.

As análises microscópicas dos TMAs foram realizadas, de forma independente por dois patologistas, docentes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (A.R.S. e F.C.), que não tiveram acesso prévio às informações clínico-patológicas dos casos analisados. Os casos que apresentaram resultados duvidosos e impossíveis de serem interpretados (exemplo, casos sem representação tumoral) nos TMAs tiveram as reações de IHQ repetidas em de cortes histológicos de toda a extensão do respectivo bloco doador do caso em questão.

Os tumores foram considerados negativos para a expressão nuclear das proteínas avaliadas quando as células tumorais apresentaram ausência total de marcação nuclear e células do respectivo epitélio endometrial (não acometido por neoplasia) e/ou células estromais e/ou

células inflamatórias fossem positivas para a referida marcação (controle interno de reação) (Figura 6).

Figura 6 – Interpretação de reação de imuno-histoquímica em cortes histológicos de adenocarcinoma endometriode de endométrio



Legenda: (A) tumor positivo para a expressão da proteína MMR, evidenciado pela presença de marcação na cor marrom nos núcleos das células neoplásicas e (B) ausência de expressão da proteína MMR evidenciada pela ausência marcação nuclear marrom em nos núcleos das células neoplásicas. A seta preta aponta para uma das células inflamatórias positivas para a proteína MMR avaliada, que não está presente no núcleo das células tumorais, comprovando, deste modo, a ausência exclusiva de expressão da proteína MMR no tumor. Aumento de 1000 vezes. Fonte: O autor (2017).

4.4.2 Análise de metilação do promotor do gene *MLH1*

Os tumores que apresentaram perda de expressão da proteína MLH1 ou perda simultânea das proteínas MLH1 e PMS2 foram testados quanto à presença de metilação no promotor do gene *MLH1*.

4.4.2.1 Extração de DNA tumoral

Amostras de tecido tumoral foram removidas de regiões com grande representação de células tumorais em blocos de parafina, previamente identificadas pelos patologistas durante a etapa de construção dos blocos de TMA, com o auxílio de lâminas cirúrgicas. A extração de DNA a partir de amostras de tecido tumoral se deu com a utilização do kit *Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV* (Promega, Madison – WI, EUA) e o equipamento *Maxwell Rapid Sample Concentrator* (Promega), seguindo o protocolo descrito abaixo:

- 1- As amostras de tecido tumoral foram depositadas em microtubos de centrifuga, tipo *Eppendorf* (volume 1,5 mL).
- 2- Em cada tubo, foram adicionados 180 μ L do tampão de incubação e 20 μ L de solução de Proteinase K (20 mg/mL), ambos fornecidos pelo kit de extração.
- 3- Os microtubos foram fechados e incubados em banho-maria à 70 °C por um período de 2 horas.
- 4- Após o período de incubação, foram adicionados 400 μ L do tampão de lise, também fornecido pelo kit de extração, em cada microtubo.
- 5- Os microtubos foram fechados e foi aplicada uma breve agitação em cada um deles, em um agitador de tubos, tipo *Vortex*.
- 6- Em seguida, o material de cada microtubo foi adicionado a um cartucho de extração de DNA, fornecido pelo kit de extração. Cada cartucho contém todos os componentes necessários para extração de DNA pelo extrator de ácidos nucleicos *Maxwell Rapid Sample Concentrator* (Promega), incluindo as esferas magnéticas e os tampões de lavagem para purificação, assim como o tampão para eluição do DNA purificado durante o processo de extração.
- 7- Os cartuchos foram adicionados ao extrator de ácidos nucleicos *Maxwell Rapid Sample Concentrator* (Promega) para realização da extração automatizada de DNA das amostras adicionadas em cada cartucho.

As amostras de DNA tumoral foram analisadas quanto às suas respectivas quantidade e pureza com base em suas propriedades de absorvância de luz visível, em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A razão de absorvância entre os comprimentos de onda 260nm e 280nm igual ou superior a 1,8 foi utilizada para considerar a amostra livre de impurezas.

4.4.2.2 PCR Específico para Metilação (MSP)

Para a análise de metilação, amostras de DNA tumoral foram tratadas com bissulfito de sódio, utilizando o kit *Epiect Bisulfite kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e seguindo, estritamente,

o protocolo fornecido pelo fabricante, com utilização de 1500 ng de DNA de cada amostra, no início das reações de conversão.

A detecção de metilação em DNA tratado com bissulfito de sódio foi realizada com o emprego da técnica de PCR específica para metilação (MSP, do inglês, *Methylation Specific PCR*). Esta técnica consiste na construção de dois pares de *primers* diferentes para amplificarem a mesma região de interesse. Um par de *primers* é desenhado de modo a amplificar a região apenas se a mesma possuir citosinas metiladas antes do processo de tratamento com bissulfito de sódio. O outro par de *primers* somente amplificará essa região, caso ela não possua metilação das citosinas antes do processo de tratamento com o bissulfito.

Foram utilizados *primers* marcados com o composto fluorescente *6-fluorescein amidite* (6-FAM) para amplificação específica de alelos metilado e não metilado da região C do promotor do gene *MLH1*, utilizando-se as sequências descritas na Tabela 10, que foram propostas por Park e colaboradores (2003). Os reagentes utilizados para as reações de PCR estão descritos na Tabela 11 e as condições de ciclagem das mesmas, na Tabela 12. Os *amplicons* gerados foram submetidos à eletroforese capilar no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e os resultados foram interpretados no software GeneMarker v. 1.85 (SoftGenetics, State College, Pensilvânia, EUA).

Tabela 10 – Características dos *primers* utilizados para análise de metilação do promotor do gene *MLH1* pela técnica de MSP

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i> (em pb)
<i>Forward</i> metilado	5' -GATAGCGATTTTTAACGC-3'	92
<i>Reverse</i> metilado	5' -TCTATAAATTACTAAATCTCTTCG-3'	
<i>Forward</i> não-metilado	5' -AGAGTGGATAGTGATTTTTAATGT-3'	99
<i>Reverse</i> não-metilado	5' -ACTCTATAAATTACTAAATCTCTTCA-3'	

Legenda: pb refere-se ao tamanho dos *amplicons* em pares de base.

Como controles de reação, foram utilizados DNA comerciais totalmente metilado e DNA totalmente desmetilado *EpiTect® Control DNA Human Methylated and Unmethylated* (Qiagen). Estes DNAs comerciais foram utilizados para atestar a especificidade dos *primers* utilizados nos ensaios de MSP quanto à amplificação dependente do estado de metilação da região de interesse. Em cada ensaio de PCR foi realizada uma reação com uma amostra de DNA não tratada previamente com bissulfito de sódio, de modo a avaliar a especificidade dos *primers*

utilizados quanto à amplificação exclusiva de DNA tratado com o bissulfito de sódio. Por fim, em cada reação, foi incluído um controle negativo de amplificação, ou seja, uma reação sem adição de DNA *template* para controle de contaminação das reações por DNA. Todas as reações de MSP foram realizadas em duplicata. Os tumores que apresentaram metilação no promotor do gene *MLH1* foram considerados casos esporádicos de câncer de endométrio.

Tabela 11 – Relação de reagentes, quantidade e concentrações utilizados para a realização das reações de MSP

Reagentes	Volumes (µL)	Concentração final (25 µL/reação)
H ₂ O	16,125	-
10 x PCR <i>Buffer</i>	2,5	1x
2 mM dNTP Mix	2,5	0,2mM de cada
50 mM MgCl ₂	0,75	1,5mM
10 µM <i>Primer Forward</i> *	0,5	0,2 µM
10 µM <i>Primer Reverse</i>	0,5	0,2 µM
Platinum Taq DNA Polimerase	0,125	2,5 unidades/reação
DNA (50 ng/µL)	2,0	100 ng/reação

Legenda: (*) O *Primer Forward* foi marcado com 6-FAM.

Tabela 12 – Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos *amplicons* pela técnica de MSP

Estágio	Temperatura (°C)	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94	2 minutos	1
Desnaturação	94	30 segundos	
Anelamento	55	30 segundos	40
Extensão	72	30 segundos	
Extensão final	72	10 minutos	1
Final	4	∞	1

4.4.3 Instabilidade de microssatélites

Os tumores caracterizados como sendo positivos para a expressão das quatro proteínas dos genes MMR avaliadas por IHQ foram submetidos à análise de MSI. Tecido tumoral e não tumoral de cada caso foi extraído dos blocos com o auxílio de lâminas cirúrgicas estéreis e

descartáveis e foram depositados em microtubos do tipo Eppendorf (1,5 mL) para extração de DNA.

Para a extração de DNA, foram utilizados, o Kit *Maxwell*[®] 16 *FFPE Tissue LEV* (Promega, Madison – WI, EUA) e o equipamento *Maxwell Rapid Sample Concentrator* (Promega), seguindo o protocolo do fornecedor, descrito detalhadamente no subitem “5.4.2.1 Extração de DNA tumoral” desta dissertação. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza por meio do espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Fischer Scientific).

O *status* de MSI dos tumores foi obtido por análise do padrão de amplificação dos marcadores moleculares NR-27, NS-21, NR-24, BAT-25 e BAT-26 por PCR multiplex utilizando *primers* marcados com fluorescência, propostos por Buhard e colaboradores (2004). As características dos marcadores e dos respectivos *primers* utilizados para sua amplificação encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Características dos marcadores microssatélites e dos respectivos *primers* utilizados para geração dos *amplicons*

Marcador	Número no GeneBank	Localização gênica	Repetição	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho (pb)*
NR-27	AF070674	5'UTR	26 Adeninas	5'-AACCATGCTTGCAAACCACT-3' 5'-CGATAATACTAGCAATGACC-3'	90
NR-21	XM_033393.1	5'UTR	25 Timinas	5'-GAGTCGCTGGCACAGTTCTA-3' 5'-CTGGTCACTCGCGTTTACAA-3'	110
NR-24	X60152	3'UTR	24 Timinas	5'-GCTGAATTTTACCTCCTGAC-3' 5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3'	129
BAT-25	X69313	Íntron 16	21 Timinas	5'-TACCAGGTGGCAAAGGGCA-3' 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	152
BAT-26	AY601851	Íntron 5	27 Adeninas	5'-CTGCGGTAATCAAGTTTTTTAG-3' 5'-AACCATTC AACATTTTTTAACCC-3'	182

Nota: Em cada marcador, o *primer reverse* foi marcado com um fluoróforo específico: NR27 e BAT-25 foram marcados com VIC (emite sinal verde no espectro visível); NR-21 e BAT-26 foram marcados com FAM (emite sinal azul no espectro visível) e NR-24 foi marcado com NED (emite sinal amarelo no espectro visível, que aparece na cor preta, quando consultado nos eletroferogramas). (*) O tamanho foi estimado com base nas sequencias depositadas no GeneBank. Fonte: Adaptado de Buhard et al. (2004).

Os reagentes utilizados nas reações de PCR, assim como suas respectivas quantidades e concentrações estão descritos na Tabela 14. As condições de ciclagem constam na Tabela 15. As reações de PCR foram realizadas em duplicata.

Tabela 14 – Descrição dos reagentes utilizados nas reações de PCR multiplex

Reagentes	Volumes (μL)	Concentração final (25 μL /reação)
H ₂ O	16,125	-
10x PCR <i>Buffer</i>	2,5	1x
2mM dNTP Mix	2,5	0,2mM de cada
50mM MgCl ₂	0,75	1,5mM
<i>Primers</i> NR-27	0,4 cada fita*	0,16 μM
<i>Primers</i> NR-21	0,5 cada fita*	0,20 μM
<i>Primers</i> NR-24	0,5 cada fita*	0,20 μM
<i>Primers</i> BAT-25	0,5 cada fita*	0,20 μM
<i>Primers</i> BAT-26	1,0 cada fita*	0,40 μM
Platinum Taq DNA Polimerase	0,125	2,5 unidades/reação
DNA (15 ng/ μL)	2,0	30 ng/reação

Nota: (*) uma fita corresponde ao *Primer Forward* e a outra corresponde ao *Primer Reverse*.

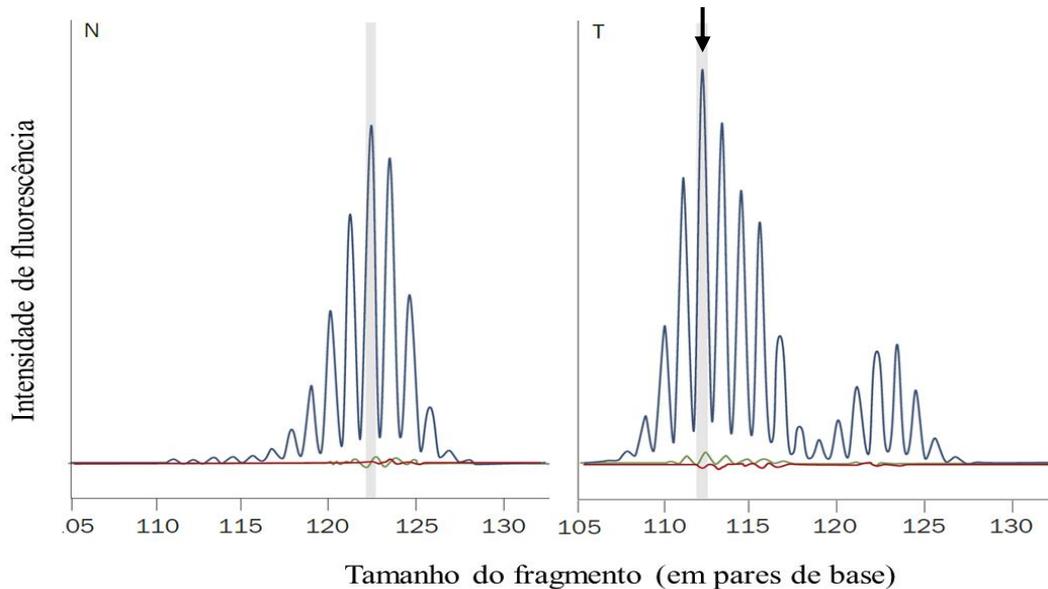
Tabela 15 – Programa de ciclagem utilizada para obtenção dos *amplicons* por PCR multiplex

Estágio	Temperatura (°C)	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94	2 minutos	1
Desnaturação	94	30 segundos	
Anelamento	56	30 segundos	33
Extensão	72	30 segundos	
Extensão final	72	10 minutos	1
Final	4	∞	1

A análise dos *amplicons* foi realizada em eletroforese capilar através do equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os resultados foram interpretados utilizando-se o *software* GeneMarker versão 1.85 (SoftGenetics).

Marcadores microssatélites foram considerados instáveis quando foi observada, em amplificação a partir de DNA tumoral, a presença de alelos não visualizados para o respectivo marcador amplificado a partir de DNA extraído de células não-tumorais (Figura 7).

Figura 7 – Interpretação de reação de instabilidade de microssatélites por eletroforese capilar



Legenda: (N): Amplificação de um microssatélite a partir de DNA normal e (T): amplificação deste mesmo microssatélite em DNA tumoral. A seta aponta para um alelo visualizado apenas a partir da amplificação do microssatélite em DNA tumoral. Fonte: Adaptado de Vilar e Gruber (2010).

Os tumores foram classificados com: Instabilidade De Microssatélites Alta (MSI-H), quando dois ou mais dos cinco marcadores apresentaram instabilidade; Instabilidade de Microssatélites Baixa (MSI-L), quando apenas um dos marcadores apresentou instabilidade; e com Estabilidade de Microssatélites (MSS), quando nenhum dos marcadores apresentou instabilidade.

4.5 Classificação molecular dos tumores

Os tumores que apresentaram expressão das quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) pela técnica de IHQ, assim como aqueles que foram classificados como MSS na avaliação de instabilidade de microssatélites, foram considerados Tumores com Proficiência na Atividade Do Sistema MMR (pMMR).

Todos os casos que apresentaram ausência de expressão de ao menos uma das quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e/ou PMS2), assim como os casos cujos tumores foram classificados tanto como MSI-H ou MSI-L, foram considerados Tumores com Deficiência na Atividade do Sistema MMR (dMMR). Essa categoria foi subdividida em duas outras: dMMR Metilado para os tumores classificados como dMMR, com presença de

metilação na região promotora do gene *MLH1* e dMMR Não-metilado para os tumores classificados como dMMR, com ausência de metilação na região promotora do gene *MLH1*.

4.6 Análise estatística

Os dados foram tabulados em uma planilha em Excel versão 2016 (Microsoft), em seguida exportados para o programa SAS versão 9.4. Uma análise exploratória de dados foi realizada por meio de medidas de posição central e de dispersão para as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram descritas considerando-se as frequências absolutas e relativas.

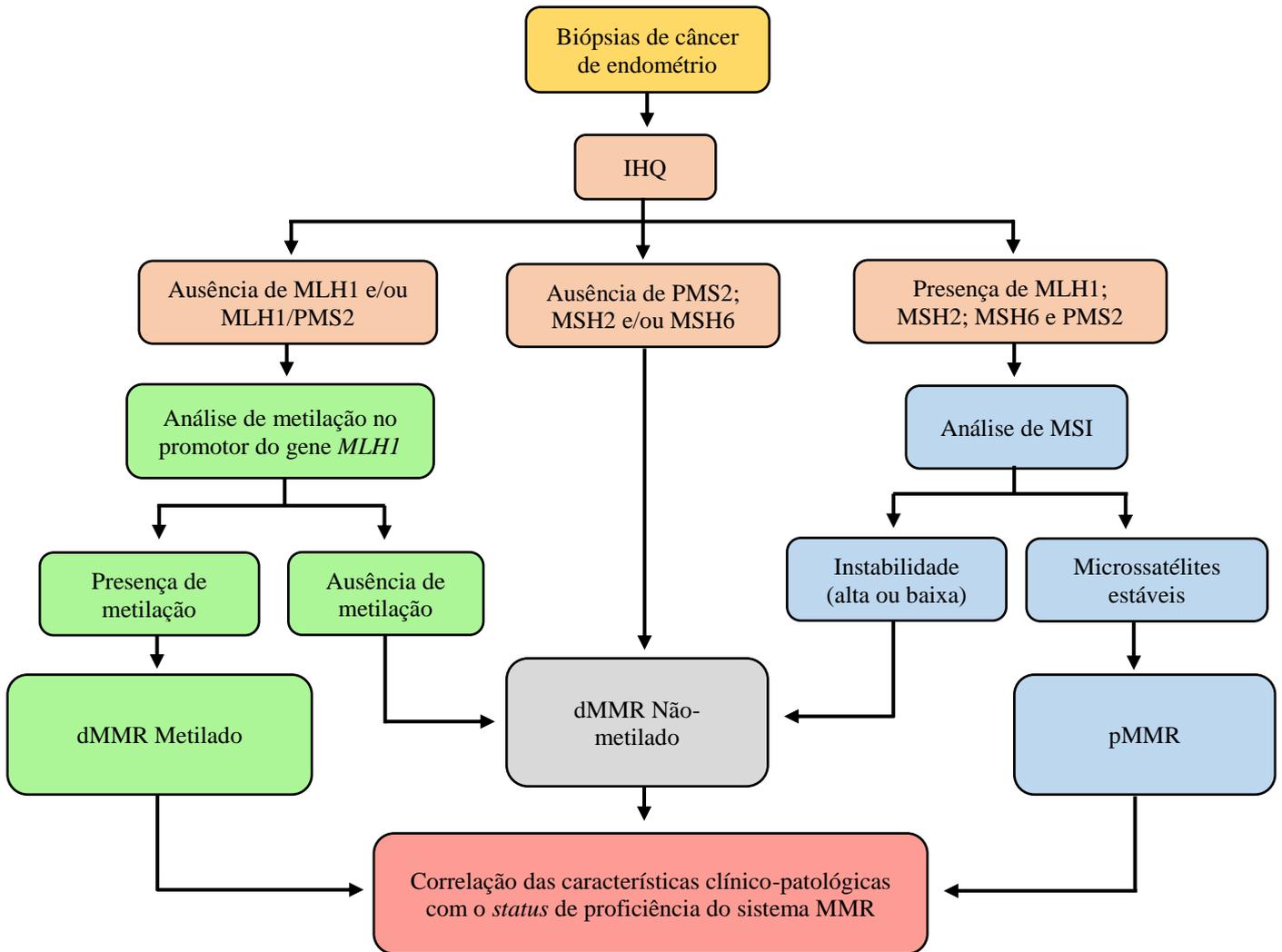
O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a existência de associação entre as variáveis qualitativas em relação aos grupos estabelecidos de tumores de endométrio, classificados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR.

Uma análise de variância foi realizada para verificar a existência de diferença estatística entre os grupos em relação as variáveis quantitativas e uma análise de resíduos foi realizada para verificar o ajuste do modelo aos dados. Foi considerado um nível de significância de 5%.

4.7 Fluxograma das etapas metodológicas

O fluxograma apresentado na Figura 8 mostra todas as etapas metodológicas e a ordem de execução de cada uma delas.

Figura 8 - Fluxograma das etapas metodológicas



Legenda: (IHQ) imuno-histoquímica. (MSI) instabilidade de microssatélites. (MMR) Sistema de reparo de DNA que corrige bases pareadas de forma incorreta. (dMMR Metilado) tumores de endométrio deficientes da atividade do sistema MMR, com metilação no promotor do gene *MLH1*. (dMMR Não-metilado) tumores de endométrio deficientes da atividade do sistema MMR, sem metilação no promotor do gene *MLH1*. (pMMR) tumores de endométrio proficientes da atividade do sistema MMR. Fonte: O autor (2017).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínico-patológica da casuística

Os dados clínicos e patológicos da casuística podem ser consultados na Tabela 16. A média da idade ao diagnóstico observada foi de 60,6 anos, variando de 33 a 91 anos, sendo que 16/127 (12,60%) pacientes foram diagnosticadas com câncer de endométrio antes dos 50 anos de idade, 49/127 (38,58%) entre 50 e 59 anos e as 62/127 (48,82%) pacientes restantes tiveram o diagnóstico do câncer de endométrio com idade igual ou superior a 60 anos.

Tabela 16 – Características clínico-patológicas da casuística

Característica	N	%
Idade ao Diagnóstico:	127	100,00
Média (desvio padrão)	60,6 (11,2)	
Mediana (mínimo - máximo)	59 (33-91)	
< 50 anos	16	12,60
Entre 50 e 59 anos	49	38,58
≥ 60 anos	62	48,82
Grau (FIGO):	126	100,00
I	59	46,83
II	44	34,92
III	23	18,25
Estadiamento patológico (FIGO):	126	100,00
IA	67	53,17
IB	24	19,05
II	19	15,08
IIIA	7	5,56
IIIB	1	0,79
IIIC1	5	3,97
IVB	3	2,38
Invasão no miométrio:	126	100,00
≤ 50%	76	60,32
> 50%	50	39,68
Invasão angiolinfática:	95	100,00
Ausente	80	84,21
Presente	15	15,79

Com relação às características histopatológicas, foi possível obter informações referentes ao grau histológico dos 127 casos de adenocarcinoma endometriode de endométrio que se distribuíram da seguinte maneira: 59 (46,83%) tumores apresentaram grau FIGO I, 44 (34,92%) tumores possuíam grau FIGO II e os 23 (18,25%) tumores restantes exibiram grau FIGO III. Foi possível determinar o estadiamento patológico de 126 dos 127 casos de adenocarcinoma endometriode e foi observado que 67/126 (53,17%) dos tumores possuíam estadiamento FIGO IA; os demais casos foram distribuídos entre os estadiamentos IB (19,05%), II (15,08%), IIIA (5,56%), IIIB (0,79%), IIIC1 (3,97%) e estadiamento IVB (2,38%).

Foi possível coletar dados sobre a profundidade de invasão da neoplasia no miométrio em 126 dos 127 casos de adenocarcinoma endometriode de endométrio e foi observado que 76 (60,32%) destes invadiam menos de 50% da espessura do miométrio ao passo que os 50 (39,68%) tumores restantes invadiam mais da metade da espessura total do miométrio. Foi possível obter dados quanto à ocorrência de invasão tumoral angiolímfática em 95 dos 127 tumores de endométrio e 15 (15,79%) dos tumores analisados apresentaram invasão angiolímfática.

5.2 Caracterização molecular dos tumores de endométrio

5.2.1 Imuno-histoquímica

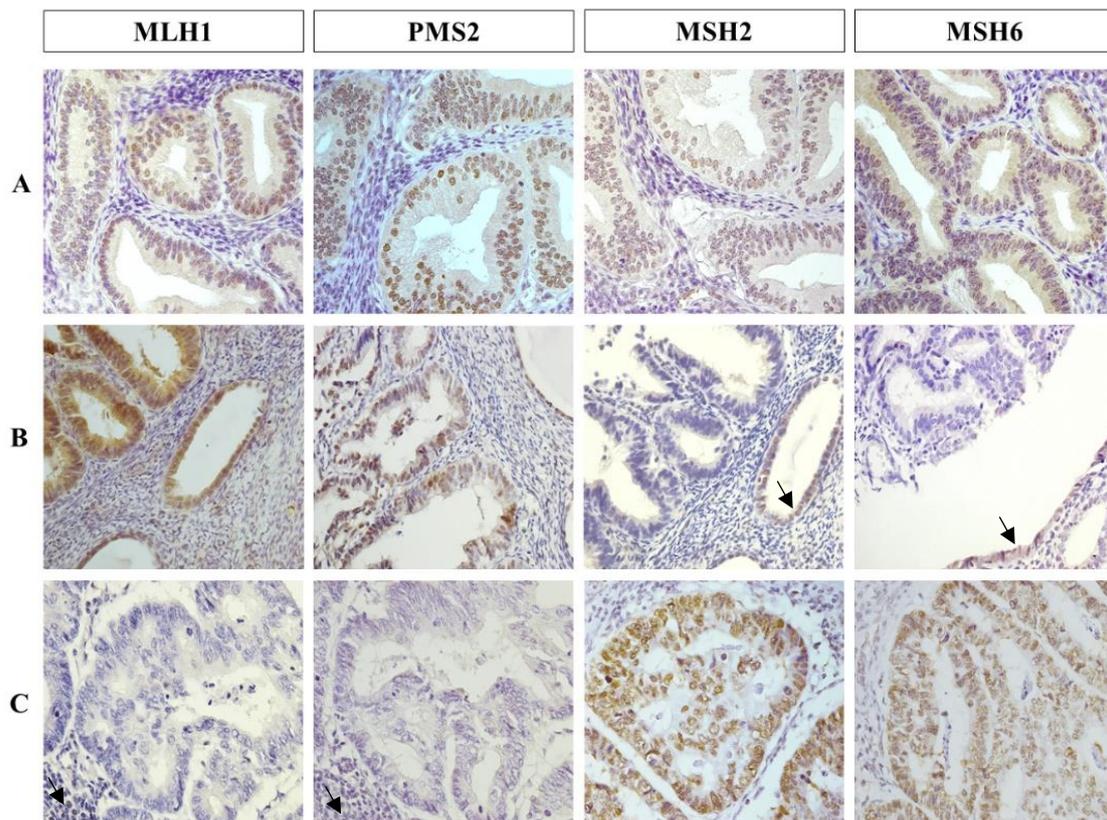
Foram construídos oito blocos de TMA que incluíram amostras dos 127 adenocarcinomas endometriodes de endométrio da casuística, assim como amostras-controle. Os resultados das reações de IHQ para as proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 estão apresentados na Tabela 17. Dos 127 tumores, 58 (45,67%) apresentaram resultados de IHQ com alterações, ou seja, com perda de expressão de, ao menos, uma das quatro proteínas do sistema MMR avaliadas. Destes, a perda isolada da proteína MSH6 foi a alteração mais frequente, visualizada em 13 dos 58 tumores de endométrio com IHQ alterada (22,41%). A perda de expressão dos dímeros MSH2/MSH6 e MLH1/PMS2 ocorreu em um número igual de tumores, em 12 dos 58 alterados (20,69%). A perda isolada da expressão de PMS2, MLH1 e MSH2 também foi observada, em 10/58 (17,24%), 9/58 (15,52%) e 2/58 (3,45%), respectivamente. Exemplos de resultados das reações de IHQ são mostrados na Figura 9.

Tabela 17 – Resultados das reações de imuno-histoquímica nas amostras de adenocarcinoma endometriode de endométrio

Padrão de imuno-histoquímica	n (127)	%
Imuno-histoquímica normal *	69	54,33
Imuno-histoquímica alterada **: <ul style="list-style-type: none"> Perda de expressão de MSH6 Perda de expressão de MSH2/MSH6 Perda de expressão de MLH1/PMS2 Perda de expressão de PMS2 Perda de expressão de MLH1 Perda de expressão de MSH2 	58	45,67
	13	10,24
	12	9,45
	12	9,45
	10	7,87
	9	7,09
	2	1,57

Legenda: (*) Imuno-histoquímica normal refere-se à reação positiva para expressão das quatro proteínas do Sistema de Reparo MMR, em um mesmo tumor. (**) Imuno-histoquímica alterada refere-se à perda de expressão de uma ou mais das quatro proteínas investigadas, em um mesmo tumor.

Figura 9 – Resultados de reações de imuno-histoquímica em cortes histológicos de câncer de endométrio.



Legenda: (A) tumor positivo para a expressão para as proteínas MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6; (B) tumor negativo para a expressão de MSH2 e MSH6 e (C) tumor negativo para MLH1 e PMS2. As setas apontam para células não neoplásicas, que são controles internos de reação. Aumento de 1000 vezes.

Os 58 tumores com IHQ alterada foram caracterizados como sendo dMMR. Dentre eles, os tumores que apresentaram perda de expressão da proteína MLH1, de forma isolada ou acompanhada da perda de expressão da proteína PMS2, foram submetidos à análise de metilação na região promotora do gene *MLH1*. Os tumores que exibiram expressão das quatro proteínas avaliadas por IHQ foram selecionados para a análise de MSI para confirmar o status de pMMR dos mesmos.

5.2.2 Análise de metilação

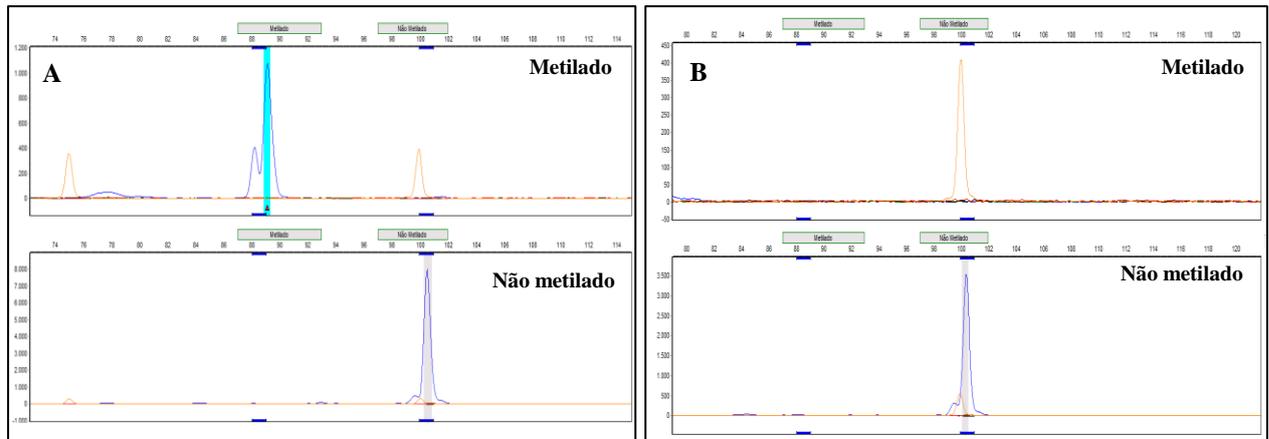
Foi realizada a análise de metilação na região C do promotor do gene *MLH1* nos 21 tumores que apresentaram perda de expressão da proteína MLH1 pela técnica de IHQ, tanto isolada (9/21) quanto acompanhada da perda da proteína PMS2 (12/21). Os resultados da análise de metilação estão apresentados na Tabela 18.

Dos 21 tumores analisados, 17 (81%) apresentaram metilação na região C do promotor do gene *MLH1* e, portanto, foram caracterizados como sendo dMMR Metilados. Os 4 (19,05%) tumores restantes não apresentaram metilação na região promotora investigada para este gene e foram, deste modo, caracterizados como tumores de endométrio dMMR Não-metilados, juntamente com os demais tumores que apresentaram ausência de expressão de uma ou mais das demais proteínas investigadas pela técnica de IHQ. A figura 10 mostra um eletroferograma de um tumor caracterizado como metilado (10 A) e outro de um tumor não metilado (10 B).

Tabela 18 – Resultado da análise de metilação na região promotora do gene *MLH1* em tumores de endométrio negativos para a expressão da proteína MLH1

<i>Status de metilação</i>	n (21)	%
metilado	17	80,95
não metilado	4	19,05

Figura 10 – Eletroferogramas das análises de metilação do promotor do gene *MLH1*



Legenda: (a) Tumor classificado como metilado. A presença de um pico azul na posição de 90 pares de base no eletroferograma superior e de outro pico na posição de 99 pb no eletroferograma inferior representam os fragmentos gerados por amplificação de DNA metilado e não metilado, respectivamente, indicando presença de metilação na região C do promotor do gene *MLH1* b) Tumor classificado como não metilado. A ausência de um pico azul na região de 90 pb, no eletroferograma superior indica ausência de metilação no promotor do gene *MLH1* na amostra analisada. Os picos laranja são o marcador de peso molecular, marcado com LIZ, utilizado para o cálculo do tamanho dos fragmentos, em pares de base.

5.2.3 Instabilidade de microssatélites

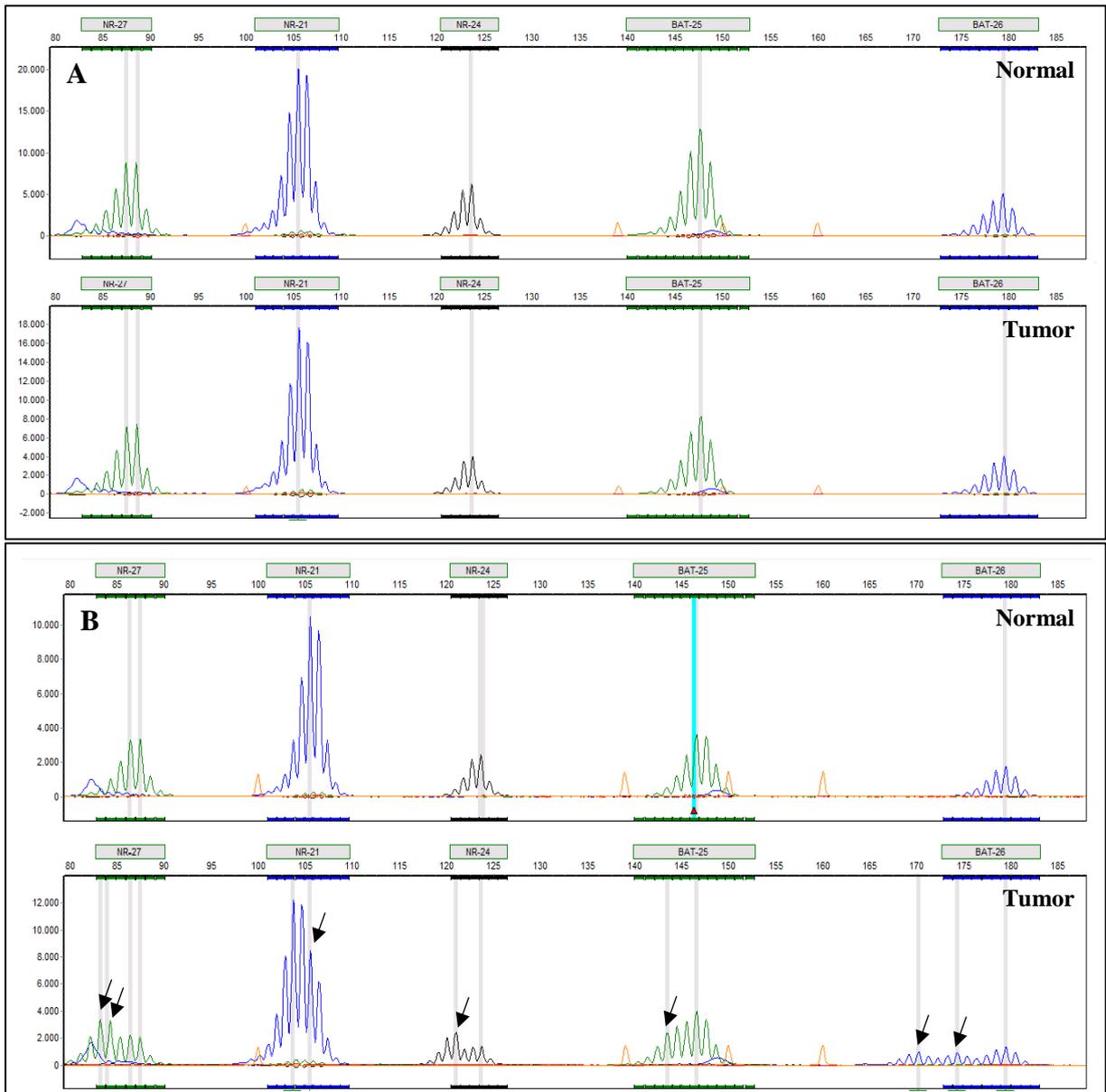
A análise de MSI foi realizada nos 69 dos 127 casos cujos tumores haviam apresentado positividade para a expressão das quatro proteínas avaliadas pela técnica de IHQ conforme mostra a Tabela 19. Dos 69 tumores avaliados, 58 (84,06%) foram caracterizados como sendo estáveis (MSS) e 11 (15,94%) tumores foram caracterizados como sendo instáveis sendo que todos os tumores instáveis apresentaram alta instabilidade nos microssatélites avaliados (MSI-H). A Figura 11 ilustra o resultado de análise de MSI, com exemplos de um tumor caracterizado como sendo MSS e outro como sendo MSI-H.

Tabela 19 – Resultado da análise de instabilidade de microssatélites

Nível de instabilidade	n (69)	%
MSS	58	84,06
MSI-H	11	15,94
MSI-L	0	0,00

Legenda: (MSS) estabilidade de microssatélites. (MSI-H) instabilidade de microssatélites alta. (MSI-L) instabilidade de microssatélites baixa.

Figura 11 – Eletroferogramas referentes às análises de instabilidade de microssatélites em amostras de adenocarcinoma endometriode de endométrio



Legenda: Eletroferogramas de tumores caracterizado como MSS (A) e MSI-H (B). O eletroferograma superior, identificado como “normal” em cada caso, refere-se ao padrão de amplificação dos marcadores microssatélites a partir de DNA extraído de tecido não acometido por células neoplásicas, ao passo que o eletroferograma inferior, em cada caso, identificado como “tumor”, refere-se à amplificação dos microssatélites gerados a partir de DNA extraído de tecido tumoral. Cada microssatélite é representado por um conjunto de picos com cor definida. As barras verticais em cinza mostram o(s) picos (s) referente (s) ao tamanho, em pares de base, de cada microssatélite. (A) análise de eletroferogramas de um tumor caracterizado como MSS. Os alelos de cada microssatélite observados na reação com DNA de tecido normal apresentam o mesmo tamanho dos alelos observados na reação com DNA tumoral. (B) representa a análise de eletroferogramas de um tumor caracterizado como MSI-H. As flechas apontam para alelos observados na reação com DNA tumoral que não são vistos na reação pareada, realizada com DNA de tecido não tumoral. Os picos sem barras horizontais são *stutters*, ou seja, picos acessórios gerados como artefatos das reações de PCR e não representam alelos verdadeiros.

5.3 Correlação do *status* de proficiência do Sistema MMR com as características clínico-patológicas

Após a caracterização dos tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR, os tumores foram agrupados em três categorias: 17/127 (13,39%) dos tumores foram classificados como sendo dMMR Metilados, por apresentarem perda de expressão da proteína MLH1 em associação com a presença de metilação no promotor do gene *MLH1*; 52/127 (40,94%) dos tumores foram classificados como sendo dMMR Não-metilados, por exibirem perda de expressão de uma ou mais das quatro proteínas do sistema MMR investigadas por IHQ, sem ocorrência de metilação no gene *MLH1*, ou por apresentarem MSI e por fim, os 58/127 (45,67%) tumores restantes foram classificados como sendo pMMR, uma vez que estes foram positivos para a expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 e não exibiram instabilidade nos microssatélites avaliados. Características clínicas (idade ao diagnóstico) e características patológicas (grau dos tumores, estadiamento patológico, profundidade de invasão tumoral no miométrio e presença de invasão angiolímfática) foram correlacionadas com as categorias de proficiência do sistema de reparo MMR estabelecidas (Tabela 20).

Dentre as características clínico-patológicas investigadas, apenas a presença de invasão angiolímfática demonstrou uma associação estatisticamente significativa ($p=0,006$) com o *status* de proficiência do sistema de reparo MMR. Tumores de endométrio classificados como dMMR Metilado demonstraram uma associação com a presença de invasão angiolímfática em maior frequência do que tumores endometriais classificados como dMMR Não-metilado ($p=0,002$) e do que tumores pMMR ($p=0,0129$). Não foi observada diferença estatística ($p=0,4759$) entre tumores dMMR Não-metilados e pMMR quanto à presença de invasão angiolímfática.

Tabela 20 – Correlação das características clínico-patológicas da casuística com a caracterização dos tumores quanto à proficiência do sistema de reparo MMR

Característica	dMMR Metilado		dMMR Não-metilado		pMMR		Valor de p		
	n	%	n	%	n	%			
Idade ao Diagnóstico:	127	100,00	17	100,00	52	100,00	58	100,00	0,2435
Média (desvio padrão)	60,6 (11,2)		62,12 (8,5)		61,35 (11,1)		59,43 (11,9)		
Mediana (mínimo - máximo)	59 (33-91)		61 (52-77)		58,50 (37-84)		59 (33-91)		
< 50 anos	16	12,60	0	0,00	5	9,62	11	18,97	
Entre 50 e 59 anos	49	38,58	8	47,06	22	42,31	19	32,76	
≥ 60 anos	62	48,82	9	52,94	25	48,08	28	48,28	
Grau (FIGO):	127	100,00	17	100,00	52	100,00	58	100,00	0,2435
I	59	46,83	4	23,53	22	43,14	33	56,90	
II	44	34,92	8	47,06	19	37,25	17	29,31	
III	23	18,25	5	29,41	10	19,61	8	13,79	
Estadiamento patológico (FIGO):	126	100,00	17	100,00	52	100,00	57	100,00	0,1435
IA	67	53,17	7	41,18	26	50,00	34	59,65	
IB	24	19,05	4	23,53	14	26,92	6	10,53	
II	19	15,08	1	5,88	9	17,31	9	15,79	
IIIA	7	5,56	3	17,65	0	0,00	4	7,02	
IIIB	1	0,79	0	0,00	1	1,92	0	0,00	
IIIC1	5	3,97	1	5,88	1	1,92	3	5,26	
IVB	3	2,38	1	5,88	1	1,92	1	1,75	

Continua

Conclusão

Característica	dMMR Metilado		dMMR Não-metilado		pMMR		Valor de p		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Invasão no miométrio:	126	100,00	17	100,00	52	100,00	57	100,00	0,3075
≤ 50%	76	60,32	8	47,06	30	57,69	38	66,67	
> 50%	50	39,68	9	52,94	22	42,31	19	33,33	
Invasão angiolímfática:	95	100,00	10	100,00	43	100,00	42	100,00	0,0060
Ausente	80	84,21	5	50,00	39	90,70	36	85,71	*0,0020
Presente	15	15,79	5	50,00	4	9,30	6	14,29	**0,0129
									***0,4759

Legenda: dMMR Metilado: Tumores Deficientes da Atividade do Sistema de Reparo MMR, com metilação na região promotora do gene *MLH1*. dMMR Não-metilado: Tumores Deficientes da Atividade do Sistema de Reparo MMR, sem metilação na região promotora do gene *MLH1*. pMMR: Tumores Proficientes da Atividade do Sistema de Reparo MMR. (*) refere-se à diferença estatística ($p < 0,05$ – Teste do Qui-Quadrado) entre os grupos dMMR Metilado e dMMR Não-metilado; (**) trata-se da diferença estatística entre os grupos dMMR Metilado e pMMR e (***) refere-se à diferença estatística entre os grupos dMMR Não-metilado e pMMR.

6 DISCUSSÃO

A caracterização de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR é, atualmente, uma das abordagens mais eficazes e sensíveis de detecção de mulheres portadoras da síndrome de Lynch (BRUEGL et al., 2017). A seguir, serão discutidos os achados clínico-patológicos dos casos de câncer de endométrio estudados, assim como os resultados obtidos a partir da caracterização molecular quanto à proficiência do sistema de reparo MMR realizada nos mesmos.

6.1 Caracterização clínico-patológica

A média de idade ao diagnóstico de câncer de endométrio encontrada na casuística do presente trabalho foi de 60,6 anos (Tabela 16). Estes dados estão de acordo com a literatura, onde pode ser observada uma média de idade ao diagnóstico igual a 61,8 anos (com médias variando de 53 a 66 anos), calculada a partir de trabalhos que não possuíam critérios de seleção dos casos de câncer com base em limites de idade de diagnóstico dos tumores endometriais (PEIRÓ et al., 2003; BLACK et al., 2006; HAMPEL et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007; BACKES et al., 2009; ROCHA et al., 2010; EGOAVIL et al., 2013; NELSON et al., 2013; BUCHANAN et al., 2014; LONG et al., 2014; GOODFELLOW et al., 2015; McCONECHY et al., 2015; BRUEGL et al., 2017; COSGROVE et al., 2017).

A maioria dos casos de câncer de endométrio da casuística deste trabalho é composta por tumores de baixo grau: mais de 80% dos tumores exibiam grau tumoral FIGO I ou II (Tabela 16). O mesmo padrão de distribuição de frequências entre as categorias de grau tumoral é encontrado em trabalhos que analisaram esta característica histopatológica apenas em tumores endometriais do tipo endometriode (BUCHANAN et al., 2014; FERGUSON et al., 2014; LONG et al., 2014; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016). Por outro lado, estudos com casuísticas mistas, compostas por vários tipos histopatológicos de câncer de endométrio, tendem a apresentar frequências mais elevadas de tumores de alto grau histológico (PEIRÓ et al., 2003; McCONECHY et al., 2015; BRUEGL et al., 2017). Quanto maior for o número de casos de câncer de endométrio do tipo II (não endometriode), maior será a frequência de tumores com graus histológicos mais elevados, uma vez que estes cânceres de endométrio, especialmente o carcinoma seroso e o carcinoma de células claras, são tumores de alto grau (BARTOSCH; LOPES; OLIVA, 2012).

Com relação ao estadiamento patológico dos casos de câncer de endométrio da casuística estudada (Tabela 16), a grande maioria (87,3%) dos casos apresentou estádios iniciais da doença (FIGO I e II), compatíveis com câncer de endométrio restrito ao útero; 10,24% dos tumores exibiram estágio FIGO III, relacionado a casos de câncer com ocorrência de disseminação em linfonodos regionais e 2,38% dos casos apresentaram estágio patológico compatível metástase à distância (estádio FIGO IVB). Diversos autores também relataram uma frequência de tumores de endométrio com estádios iniciais (FIGO I e II) em mais de 80% da casuística (BACKES et al., 2009; BILBAO et al., 2010; FERGUSON et al., 2014; GOODFELLOW et al., 2015; McMEEKIN et al., 2016; RUBIO et al., 2016). No entanto, outros autores relataram frequências de casos de câncer de endométrio com estádios avançados (FIGO III e IV), substancialmente maiores do que os relatados por este trabalho. Bruegl e colaboradores (2017) descreveram um percentual de 13,6% (29/213) tumores de endométrio com estágio FIGO III e 9,4% (20/213) com estágio FIGO IV. Shikama e colaboradores (2016) relataram um percentual de 19,5% (43/221) tumores de endométrio com estágio FIGO III e 10,9% (21/221) casos de câncer de endométrio com estágio patológico FIGO IV. Egoavil e colaboradores (2013) reportaram que 19,6% (31/158) dos casos de câncer de endométrio de uma casuística espanhola apresentavam estágio FIGO III e 17,7% (28/158) dos casos apresentavam estágio FIGO IV. As diferenças com relação à casuística desta dissertação provavelmente deriva do fato destes trabalhos possuírem casuísticas mistas, compostas em mais de 10 a 25% de sua totalidade por tumores de endométrio de tipos não-endometrioides. Sabe-se que estes dois grandes grupos histológicos de câncer de endométrio apresentam características prognósticas diferentes, sendo que tumores do tipo II (não-endometrioides) estão associados a características de pior prognóstico, tais como estádios patológicos compatíveis com doença em estágio mais avançado (FIGO III e IV) (ALKUSHI et al., 2010).

Além do tipo histológico, estadiamento patológico e grau tumoral, a FIGO também considera a profundidade de invasão tumoral no miométrio como sendo um fator com valor prognóstico para o câncer de endométrio (PECORELLI et al., 2009). A razão entre a extensão de invasão do tumor no miométrio e a espessura miometrial total é o principal fator preditivo de um estágio mais avançado do câncer de endométrio e de presença de disseminação em linfonodos. Carcinomas endometriais com profundidade de invasão superior a 50% da espessura total do miométrio estão associados a um risco maior de disseminação de células tumorais para os linfonodos (BRUEGL et al., 2014). Na casuística deste trabalho, foi relatada a presença de invasão neoplásica acometendo mais da metade da espessura do miométrio em 50/126 (39,68%) dos casos (Tabela 16). A literatura aponta a frequência desta característica

patológica ocorrendo entre 24,9% a 43% dos casos de câncer de endométrio estudados (BLACK et al., 2006; COHN et al., 2006; BILBAO et al., 2010; EGOAVIL et al., 2013; LONG et al., 2014; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; BRUEGL et al., 2017; COSGROVE et al., 2017).

O termo “invasão angiolímfática” refere-se à presença de células tumorais na porção interna endotelial de vasos linfáticos, localizados fora da região do tumor principal. Este achado patológico está diretamente correlacionado com a ocorrência de metástase tumoral linfática (REIS et al., 2015). Embora não seja reconhecida pela FIGO como sendo um fator prognóstico para o câncer de endométrio, diversos trabalhos têm apontado a presença de invasão tumoral em região angiolímfática como sendo um fator independente de pior prognóstico no cenário do câncer de endométrio, podendo servir como um preditor de metástase nodal regional, recidiva da doença, recorrência à distância e aumento da mortalidade (BRIET et al., 2005; GEMER et al., 2007; NOFECH-MOZES et al., 2008; GUNTUPALLI et al., 2012; REIS et al., 2015). Poucos trabalhos que realizaram a caracterização da proficiência do sistema de reparo MMR em tumores de endométrio publicaram dados sobre a presença de invasão angiolímfática das casuísticas estudadas. Foi observada a presença de invasão angiolímfática em 15/95 (15,79%) dos casos de câncer de endométrio da casuística deste trabalho, conforme mostra a tabela 16. De forma semelhante, Egoavil e colaboradores (2013) relataram a presença de invasão angiolímfática em 24/134 (17,9%) de sua amostra de tumores de endométrio. Outros autores relataram esta característica presente em mais de 20% (variando de 22,7% a 38,7%) dos casos de câncer de endométrio que possuíam esta informação disponível (BLACK et al., 2006; BILBAO et al., 2010; SHIH et al., 2011; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; COSGROVE et al., 2017). Desse modo, a frequência de casos de câncer de endométrio com ocorrência de invasão angiolímfática encontrada nesta dissertação é a menor relatada até o momento.

6.2 Caracterização molecular dos tumores

A caracterização dos tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR foi realizada pelas técnicas de IHQ, MSI e análise de metilação do gene *MLH1*. Inicialmente, foi realizada a análise de expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em amostras teciduais dos 127 casos de adenocarcinomas endometrioides de endométrio deste estudo. Foi observada ausência de expressão de, ao menos, uma das quatro proteínas do sistema MMR analisadas em 58/127 (45,67%) tumores avaliados e, deste modo, estes tumores foram

classificados como sendo dMMR (Tabela 17). A ausência de expressão da proteína MSH6 foi o evento mais frequente, sendo observado em 25/58 (43,10%) dos tumores dMMR. A perda de expressão dessa proteína de reparo em tumores de endométrio não é o evento mais frequente observado na literatura.

A maioria dos trabalhos mostra a perda de expressão da proteína MLH1 como sendo o evento mais frequente em tumores de endométrio caracterizados por IHQ para as quatro principais proteínas do sistema de reparo MMR (COHN et al., 2006; BACKES et al., 2009; EGOAVIL et al., 2013; BUCHANAN et al., 2014; FERGUSON et al., 2014; RUIZ et al., 2014; GOODFELLOW et al., 2015; McCONECHY et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; BRUEGL et al., 2017). No entanto, dois autores relataram dados semelhantes aos desta dissertação: Cossio e colaboradores (2010) em um estudo realizado no Brasil e Long e colaboradores (2014) em um estudo conduzido na China, relataram a perda de expressão da proteína MSH6 como sendo a alteração mais frequente nos tumores de endométrio investigados por IHQ, concordando com os achados desta dissertação. A perda isolada de expressão da proteína MSH6 pode ser explicada, em sua grande parte, pela presença de mutações germinativas no gene *MLH6*, que pode ser confirmada por testes moleculares futuros. Mulheres portadoras de mutações germinativas patogênicas no gene *MSH6* possuem um risco aumentado de desenvolver câncer de endométrio, que supera o risco para o desenvolvimento dos outros tumores do espectro da síndrome de Lynch, inclusive câncer colorretal (BAGLIETTO et al., 2010; WANG et al., 2013).

A frequência de tumores com IHQ alterada observada na casuística deste trabalho (45,67%) é substancialmente maior do que os dados relatados por outros autores. Ruiz e colaboradores (2014) relataram que 30,2% (64/212) dos tumores de endométrio avaliados não expressavam uma ou mais das quatro proteínas do sistema MMR investigadas, sendo que a ausência de expressão da proteína PMS2 foi o tipo de alteração mais frequente, sendo observada em 36/64 (56,25%) dos tumores dMMR. Ferguson e colaboradores (2014) encontraram uma frequência de 28,8% (34/118) de tumores com ausência de ao menos uma das quatro proteínas MMR avaliadas, sendo que a maior parcela destes tumores (41,18%) não expressava a proteína MLH1. Cohn e colaboradores (2006) relataram que 28,57% (84/294) dos tumores de endométrio eram ausentes de expressão de ao menos uma das quatro proteínas do sistema MMR, sendo que a ausência de expressão da proteína PMS2 foi a alteração mais frequente (28%). Bruegl e colaboradores (2017) relataram uma frequência de 28,1% (57/203) de tumores com IHQ alterada, sendo que a grande maioria destes tumores (80,7%) não expressavam as proteínas MLH1/PMS2. Shikama e colaboradores (2016) encontraram uma frequência de 28% (62/221) tumores com IHQ alterada sendo que a ausência da proteína MLH1 foi a alteração

mais frequente, sendo observada em 39/221 (17,6%) dos tumores. Com exceção do trabalho realizado por Ruiz e colaboradores (2016), a casuística dos demais trabalhos citados acima é diferenciada da casuística do presente trabalho, uma vez que elas são heterogêneas quanto aos tipos histológicos de câncer de endométrio incluídos na análise de expressão das proteínas do sistema MMR. A heterogeneidade entre os tipos histológicos de câncer de endométrio presentes nas casuísticas dos trabalhos citados anteriormente pode justificar, em parte, a diferença entre as frequências de tumores classificados como dMMR. Os tumores de endométrio do tipo endometriode apresentam aspectos genéticos e genômicos distintos dos demais tipos histológicos de câncer de endométrio, incluindo a presença de instabilidade de microssatélites, que está associada à inativação do sistema MMR e é mais frequente nos tumores endometrioides do que nos demais tipos histológicos de câncer de endométrio (HECH; MUTTER, 2006; O'HARA; BELL, 2012).

A possibilidade de a frequência de tumores de endométrio classificados como dMMR por meio da técnica de IHQ estar superestimada neste trabalho não pode ser descartada. Os resultados obtidos a partir de IHQ para as proteínas do sistema MMR são diretamente dependentes de controles ótimos de variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas e o controle de qualidade contínuo em todos estes processos é de grande importância para assegurar a detecção acurada das proteínas do sistema MMR (SHIA, 2013). Um dos maiores obstáculos encontrados no processo de detecção das proteínas MMR por IHQ envolve a variabilidade dos métodos e materiais utilizados na fixação dos tecidos. O agente fixador utilizado, assim como o tempo de permanência do tecido na formalina antes de sua inclusão em parafina, e a uniformidade de fixação são fatores que podem afetar a qualidade de marcação do antígeno investigado durante as reações de IHQ (RICHMAN 2015). Por se tratar de um estudo retrospectivo, é possível que haja uma grande heterogeneidade nos métodos e materiais utilizados na fixação dos materiais entre os casos de câncer de endométrio da casuística deste trabalho.

A interpretação do resultado das reações de IHQ também pode estar relacionada ao número elevado de tumores deficientes do sistema MMR. Tumores com resultados falso-negativos para a expressão de uma proteína MMR, gerados por interpretações errôneas de resultados de IHQ, podem influenciar as frequências de tumores caracterizados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR, subestimando ou superestimando-as. Deste modo, a utilização de outros testes moleculares, tais como a análise de MSI, em associação com testes imuno-histoquímicos pode proporcionar a identificação mais acurada de tumores deficientes do sistema de reparo MMR (BUZA; ZIAI; HUI, 2016).

A investigação da presença de metilação no promotor do gene *MLH1* é uma etapa metodológica recomendada no processo de triagem de tumores de endométrio para a síndrome de Lynch. Tendo em vista que uma porção dos tumores de endométrio deficientes do sistema MMR é advinda do evento somático de metilação de *MLH1*, a análise de metilação nesse gene minimiza a perda de especificidade do método de triagem universal na identificação de portadores da síndrome de Lynch (WIN et al., 2013b). Diversas técnicas de análise de metilação de DNA estão disponíveis e podem ser utilizadas para análise de metilação do gene *MLH1*. Elas podem ser divididas em duas grandes categorias, de acordo com o método utilizado para detectar a presença de radicais metil em sequências de DNA: 1) técnicas baseadas em tratamento de DNA com bissulfato de sódio e 2) técnicas baseadas na utilização de enzimas de restrição sensíveis à metilação (SEPULVEDA et al., 2009). A técnica de análise de metilação baseada em PCR (MSP) explora os efeitos do composto bissulfato de sódio sobre as moléculas de DNA que, de forma eficiente, converte citosinas não metiladas em uracilas, não provocando nenhuma modificação nas citosinas metiladas. Consequentemente, após o tratamento com bissulfato de sódio, os alelos metilados e não-metilados apresentam sequências de bases nitrogenadas distintas que podem ser utilizadas para o desenho de *primers* alelo-específicos (GRADY et al., 2001).

Foi realizada a análise de metilação na região C do promotor do gene *MLH1* pela técnica de MSP em amostras de DNA extraídas dos 21 tumores de endométrio que demonstraram ausência de expressão da proteína MLH1. Observou-se a presença de metilação em 17/21 (80,95%) dos tumores analisados (Tabela 18). Existe uma grande heterogeneidade nos métodos empregados para a análise de metilação do promotor do gene *MLH1* entre os trabalhos disponíveis na literatura. Nos trabalhos que utilizaram da técnica de MSP (a mesma utilizada nesta dissertação) analisando a mesma região promotora (região C), foi relatada uma proporção de tumores de endométrio negativos para a expressão da proteína MLH1, com metilação no promotor deste gene, variando de 74,1% a 94% (HAMPEL et al., 2006; BRUEGL et al., 2014; McCONECHY et al., 2015; BRUEGL et al., 2017). Trabalhos que utilizaram outras técnicas de análise de metilação relataram proporções mais elevadas de tumores deficientes da proteína MLH1 metilados. Leenen e colaboradores (2012) utilizando-se a técnica de MS-MLPA (do inglês, *Methylation Specific – Multiplex Ligation Probe-Dependent Amplification*), reportaram que 96,9% (31/32) dos tumores de endométrio deficientes da proteína MLH1 apresentavam metilação no promotor do gene *MLH1*. Goodfellow e colaboradores (2015), combinando as técnicas de pirosequenciamento e de análise combinada de bissulfato e restrição enzimática

(COBRA), encontraram uma frequência de 95,6% (259/271) tumores com metilação na região promotora do gene *MLH1* em associação com a perda de expressão da proteína MLH1.

Cerca de 10 a 20% dos casos de câncer de endométrio exibem perda de expressão das proteínas MLH1/PMS2 e a minoria destes casos ocorre em portadores de mutações germinativas nos genes que codificam estas proteínas. A maioria dos tumores de endométrio (75 a 92%) negativos para a expressão da proteína MLH1 resulta da inativação somática do gene *MLH1* por meio da metilação de DNA na região promotora deste gene (ZIGHELBOIM et al., 2007; PETERSON et al., 2012; BUCHANAN et al., 2014). Deste modo, a análise de metilação na região promotora do gene *MLH1* em tumores de endométrio negativos para a expressão da proteína MLH1 é de grande importância por possibilitar a distinção entre casos de câncer de endométrio esporádicos (metilados) dos casos com maior probabilidade de serem hereditários (não metilados).

A análise de MSI pode ser realizada para identificar tumores de endométrio deficientes do sistema de reparo MMR em combinação com a análise de IHQ das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, ou ainda, pode ser realizada como método alternativo de triagem de tumores deficientes deste sistema de reparo (RICHMAN 2015). No presente estudo, a análise de MSI foi utilizada como um método complementar à IHQ das proteínas do sistema MMR para avaliação do *status* de proficiência do sistema MMR em tumores de endométrio. A análise de instabilidade de microssatélites foi realizada nos 69/127 tumores que apresentaram expressão das quatro proteínas do sistema de reparo MMR investigadas pela técnica de IHQ. Poucos trabalhos publicados até então utilizaram desta abordagem (BALDINU et al., 2002). A maior parcela dos trabalhos publicados utilizou-se apenas de uma das duas técnicas para analisar o status de proficiência do sistema MMR (MacDONALD et al., 2000; HAMPEL et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007; BACKES et al., 2009; LEENEN et al., 2012; EGOAVIL et al., 2013; BUCHANAN et al., 2014; FERGUSON et al., 2014; LONG et al., 2014; GOODFELLOW et al., 2015; McCONECHY et al., 2015; RUBIO et al., 2016; BRUEGL et al., 2017).

Foram identificados 11/69 (15,94%) tumores de endométrio apresentando altos níveis de instabilidade de microssatélites (MSI-H) e, deste modo, foram classificados como sendo tumores dMMR, mesmo com a presença das quatro proteínas do sistema MMR (Tabela 19). McConechy e colaboradores (2015) detectaram tumores apresentando o fenótipo molecular de MSI-H em associação com IHQ normal para as quatro proteínas do sistema MMR em 3/50 tumores (5,66%). Egoavil e colaboradores (2013) encontraram 3/112 (2,68%) tumores apresentando MSI-H e expressão normal das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Bruegl

e colaboradores (2017) encontraram 5/146 (3,42%) tumores com IHQ normal e apresentando MSI-H. Uma proporção significativa de tumores que apresentam o fenômeno de MSI é causada por mutações do tipo *missense* que não resultam na ausência do produto proteico, embora produzam uma proteína não funcional, detectável pela técnica de IHQ e, deste modo, gerando resultados falso-negativos de deficiência do sistema MMR (BELLIZZI; FRANKEL, 2009; RICHMAN 2015). Parte das discordâncias entre as técnicas de MSI e IHQ ser atribuída à etapa de interpretação dos resultados derivados das reações de IHQ. Casos falso-positivos para a expressão das proteínas investigadas podem ser detectados pela técnica de MSI, contribuindo para o número de casos discordantes entre as duas técnicas utilizadas.

Embora tanto a técnica de MSI quanto a IHQ (com uso dos quatro anticorpos para as principais proteínas do sistema MMR) apresentam valores similares de sensibilidade em detectar portadores de mutações germinativas nos genes do mecanismo de reparo MMR, a taxa de concordância entre estas duas técnicas não é perfeita, chegando a aproximadamente 93% (McCONECHY et al., 2015). Uma metodologia pode perder casos que são detectáveis pela outra, e vice-versa, deixando a concordância entre estas duas técnicas incompleta. A análise de MSI pode detectar tumores deficientes do sistema de reparo MMR que possuem mutações em genes que não são investigados pelos anticorpos utilizados na técnica de IHQ, além de detectar casos interpretados de forma incorreta na etapa analítica do processo imuno-histoquímico. Por outro lado, a IHQ pode detectar portadores de mutações no gene *MSH6* (geralmente, o gene mais mutado em portadoras da síndrome de Lynch diagnosticadas com câncer de endométrio) que podem ser perdidos quando os tumores são triados apenas pela técnica de MSI, uma vez que estes tumores exibem baixos níveis de instabilidade de microssatélites ou até mesmo são estáveis (SHIA 2008).

A sensibilidade de detecção de tumores de endométrio deficientes do sistema de reparo MMR pela análise de instabilidade de microssatélites é dependente de vários fatores. Dentre eles, um dos aspectos mais importantes a serem considerados diz respeito ao painel de marcadores utilizados para a avaliação de instabilidade (LAGHI; BIANCHI; MALESCI, 2008). No presente trabalho foi utilizado um painel composto por cinco microssatélites do tipo mononucleotídeos proposto por Buhard e colaboradores (2004). O uso deste conjunto de marcadores microssatélites mononucleotídicos é mais indicado para análise de instabilidade de microssatélites em amostras de câncer de endométrio, por ser, comprovadamente, um método mais fácil e mais sensível do que o painel de marcadores propostos pelo NCI, composto por dois marcadores mononucleotídicos e três marcadores do tipo dinucleotídico (BOLAND et al., 1998; UMAR et al., 2004; WONG et al., 2006).

As principais diretrizes de investigação da síndrome de Lynch não determinam qual metodologia (MSI ou IHQ) deve ser adotada para caracterizar os tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema MMR (SGO, 2014; NCCN, 2017). Neste trabalho, a utilização exclusiva da técnica de IHQ excluiria 11/127 (8,7%) tumores dMMR da etapa de diagnóstico molecular da síndrome de Lynch, que foram detectados pela técnica de MSI. É de grande importância considerar que cada portador não detectado pode ter vários irmãos e filhos, que são potenciais portadores da mesma doença e, deste modo, muitos indivíduos em risco para o desenvolvimento de múltiplos cânceres perderiam a oportunidade serem incluídos em protocolos de detecção e intervenção precoce de câncer (BRUEGL et al., 2017).

Após associar os dados de MSI com os dados de IHQ, 69/127 (54,33%) dos tumores de endométrio foram classificados como sendo dMMR (58 tumores com IHQ alterada e 11 tumores com MSI-H). Visando comparar os achados destas frequências com a literatura, foram consultados apenas trabalhos que apresentaram as frequências de tumores de endométrio, do tipo endometriode, caracterizados quanto à proficiência do sistema MMR, a fim de se normalizar as comparações de frequências pelo tipo histológico, haja vista que as diferenças genéticas entre os tipos endometriode e não-endometriodes de câncer de endométrio podem influenciar as frequências de tumores deficientes do sistema de reparo MMR relatadas (MacDONALD et al., 2000; BLACK et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007; BACKES et al., 2009; ROCHA et al., 2010; SHIH et al., 2011; LEENEN et al., 2012; EGOAVIL et al., 2013; NELSON et al., 2013; LONG et al., 2014; RUIZ et al., 2014; McCONECHY et al., 2015; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; COSGROVE et al., 2017). Os resultados dessa dissertação, assim como dos trabalhos consultados, estão dispostos (por ordem cronológica de publicação) na Tabela 21.

A frequência de tumores dMMR encontrada neste trabalho (54,33%) é bem maior do que os dados reportados por outros autores que caracterizaram tumores de endométrio do tipo endometriode quanto à proficiência da atividade do sistema de reparo MMR. A média de tumores de endométrio deficientes do sistema MMR, calculada a partir das frequências mostradas na tabela 21, é igual a 28,80%. A frequência mínima de tumores deficientes deste sistema de reparo é igual a 9,8% e frequência máxima é igual a 45,31.

Tabela 21 – Levantamento bibliográfico sobre as frequências de tumores de endométrio, do tipo endometriode, caracterizados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR

Autor (ano)	País	Critério de seleção *	Tamanho da casuística	Tipo Histológico		Distribuição quanto à proficiência do sistema MMR**		Metodologia	
				Endometriode n (%)	Não-endometriode n (%)	pMMR n (%)	dMMR n (%)	IHQ	MSI
MacDonald et al (2000)	Noruega	-	259	234 (90,35)	25 (9,65)	129 (55,13)	105 (44,87)	-	§
Black et al (2006)	EUA	-	473	379 (80,13)	94 (19,87)	230 (76,92)	69 (23,08)	-	§
Zighelboim et al (2007)	EUA	-	446	446 (100,00)	0 (0,00)	299 (67,04)	147 (32,96)	-	§
Backes et al (2009)	EUA	-	140	126 (90,00)	10 (10,00)	98 (77,78)	28 (22,22)	Δ	-
Rocha et al (2010)	Brasil	-	225	186 (82,67)	39 (17,33)	122 (65,59)	64 (34,41)	-	φ
Shih et al (2011)	EUA	idade ao diagnóstico ≤ 40 anos	56	51 (91,07)	5 (9,93)	46 (90,20)	5/51 (9,80)	Δ	-
Leenen et al (2012)	Holanda	idade ao diagnóstico ≤ 70 anos	179	146 (81,56)	33 (19,44)	107 (73,29)	39 (26,71)	Δ	¥
Egoavil et al (2013)	Espanha	-	173	145 (83,82)	36 (16,18)	123 (84,83)	22 (15,17)	Δ	¥
Nelson et al (2013)	Canadá	tumores de alto grau (FIGO III)	102	64 (62,75)	38 (37,25)	35 (54,69)	29 (45,31)	Δ	-
Long et al (2014)	China	-	173	131 (75,72)	42 (24,28)	97 (74,05)	34 (25,95)	Δ	-
Ruiz et al (2014)	Espanha	-	212	212 (100,00)	0 (0,00)	148 (69,81)	64 (30,19)	Δ	-
McConechy et al (2015)	Canadá	-	89	71 (79,78)	18 (20,22)	49 (69,01)	22 (30,99)	Δ	§
McMeekin et al (2016)	EUA	-	1024	1024 (100,00)	0 (0,00)	639 (62,40)	385 (37,40)	Δ	§
Shikama et al (2016)	Japão	-	221	196 (88,69)	25 (11,31)	140 (71,43)	56 (28,57)	Δ	§
Cosgrove et al (2017)	EUA	-	466	390 (83,69)	76 (16,31)	295 (75,64)	95 (24,36)	Δ	¥
Rosa (2018) ***	Brasil	-	127	127 (100)	0 (0,00)	58 (45,67)	69 (54,33)	Δ	¥

Legenda: pMMR: Tumores de Endométrio Proficientes da Atividade do Sistema de Reparo MMR. dMMR: Tumores de Endométrio Deficientes da Atividade do Sistema de Reparo MMR. IHQ: imuno-histoquímica. MSI: análise de instabilidade de microssatélites. (*) refere-se à utilização de critérios para seleção de casos de câncer de endométrio para posterior caracterização molecular da proficiência do sistema MMR. (**) frequências referentes apenas aos tumores de endométrio do tipo endometriode presentes na casuística de cada trabalho consultado. (***) dados da presente dissertação. (-) não realizado. (Δ) indica que foi realizada a avaliação da expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 por imuno-histoquímica. (§) análise de instabilidade de microssatélites utilizando os marcadores propostos pelo NCI (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250). (¥) análise de instabilidade de microssatélites utilizando cinco marcadores de microssatélites do tipo mononucleotídeos. (φ) análise de instabilidade de microssatélites utilizando os marcadores propostos pelo NCI em adição ao marcador mononucleotídicos BAT-40.

As diferentes metodologias de avaliação da proficiência do sistema MMR utilizadas pelos autores apresentados na tabela 21 podem explicar, em parte, a diferença entre as frequências de tumores de endométrio dMMR relatadas. Alguns autores utilizaram apenas a técnica de IHQ (BACKES et al., 2009; SHIH et al., 2011; NELSON et al., 2013; LONG et al., 2014; RUIZ et al., 2014) ou a análise de MSI (MacDONALD et al., 2000; BLACK et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007) para a caracterização dos tumores quanto a proficiência do sistema de reparo MMR. A utilização combinada das técnicas de IHQ e MSI é a abordagem mais eficaz de detecção de portadores da, uma vez que a utilização de uma técnica em detrimento de outra resultaria perda de portadores da síndrome de Lynch (GOODFELLOW et al., 2015). Com relação à metodologia de análise de MSI, na maioria dos trabalhos que empregou esta técnica para caracterização molecular dos tumores, foi utilizado o painel de marcadores do NCI (MacDONALD et al., 2000; BLACK et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007; McCONECHY et al., 2015; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016) que é, conhecidamente, menos sensível em detectar tumores de endométrio com instabilidade de microssatélites do que o painel de cinco marcadores mononucleotídicos utilizados neste trabalho (WONG et al., 2006).

Poucos estudos brasileiros de caracterização de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema MMR já foram realizados. Rocha e colaboradores (2010) encontraram uma frequência de tumores de endométrio, do tipo endometrióide, deficientes do sistema MMR igual a 34,41%, que é, consideravelmente, menor do que a frequência encontrada nesta dissertação (54,33%). Neste estudo brasileiro, a técnica de MSI, com uso dos marcadores estabelecidos pelo NCI, foi utilizada para caracterizar os tumores da casuística estudada. Estes marcadores moleculares são menos sensíveis para detectar tumores de endométrio instáveis em comparação ao painel de cinco marcadores mononucleotídicos utilizados nessa dissertação e, deste modo, a frequência de tumores de endométrio deficientes do sistema MMR relatada por Rocha e colaboradores (2010) pode estar subestimada. Cossio e colaboradores (2010) realizaram uma caracterização histomolecular em 30 casos de endométrio na região sul do Brasil por IHQ das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, assim como análise de MSI e também análise de metilação no promotor do gene *MLH1*. Os casos de câncer de endométrio haviam sido previamente triados pela idade ao diagnóstico do câncer de endométrio, que deveria ser inferior ou igual a 50 anos ou a paciente diagnosticada com câncer de endométrio deveria possuir um familiar com parentesco em primeiro grau diagnosticado com, no mínimo, um câncer do espectro da síndrome de Lynch. Os autores relataram uma frequência de 12/30 (40%) tumores de endométrio exibindo deficiência do sistema MMR. Destes, quatro foram detectados pela análise de MSI, demonstrando MSI-H mesmo com a expressão das quatro

proteínas MMR e ausência de metilação no gene *MLH1*. Além de não ter sido utilizada uma abordagem universal de seleção dos casos e de ter sido realizada a caracterização em uma amostra pequena, 7/30 (23,3%) dos tumores caracterizados eram de tipos histológicos não-endometrioides, e a frequência de tumores exclusivamente endometrioides deficientes do sistema MMR não foi relatada. A frequência de tumores deficientes do sistema MMR pode estar subestimada no trabalho de Cossio e colaboradores (2010) pela presença de tumores de endométrio de tipos não endometrioides uma vez que a deficiência do sistema de reparo MMR nestes tipos de tumores é menor do que em tumores de endométrio do tipo endometrioides (O'HARA; BELL, 2012). Deste modo, mais estudos de caracterização molecular de tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema MMR em outras casuísticas brasileiras podem elucidar se a frequência de tumores deficientes deste sistema de reparo é, de fato, maior no Brasil do que em outros países.

6.3 Associação entre as características clínico-patológicas e o sistema MMR

A relação entre a deficiência na atividade do sistema de reparo MMR e prognóstico de pacientes diagnosticadas com câncer de endométrio não está completamente estabelecida (McMEEKIN et al., 2016). No presente trabalho, foi avaliada a associação do *status* do sistema MMR entre as três categorias que tumores de endométrio foram distribuídos (dMMR Metilado; dMMR Não-metilado e pMMR) e as características clínico-patológicas avaliadas na casuística (idade ao diagnóstico, estadiamento patológico, grau tumoral, extensão de invasão neoplásica no miométrio e presença de invasão tumoral angiolímfática) (Tabela 20).

Foi encontrada uma associação entre a presença de invasão angiolímfática e o *status* de proficiência do sistema MMR ($p=0,0060$). A invasão tumoral angiolímfática foi mais frequente nos tumores de endométrio classificados como dMMR Metilados do que nos tumores dMMR Não-metilados ($p=0,0020$) e também maior do que nos tumores de endométrio classificados como pMMR ($p=0,0129$). Não foi observada diferença estatística ($p=0,4759$) entre a frequência de ocorrência de invasão angiolímfática entre os tumores de endométrio classificados como dMMR Não-metilados e os tumores classificados como pMMR. Cosgrove e colaboradores (2017) em um estudo semelhante, também observaram essa associação em sua amostra de tumores em uma casuística norte-americana de tumores de endométrio. McMeekin e colaboradores (2016) encontraram uma associação entre tumores deficientes do sistema MMR (tanto com presença quanto com ausência de metilação no promotor do gene *MLH1*) com uma maior ocorrência de invasão angiolímfática, divergindo dos achados dessa dissertação, uma vez

que os dados do presente trabalho mostraram não haver diferença entre os tumores dMMR Não metilados e os tumores pMMR. Shikama e colaboradores (2016) encontraram apenas uma associação significativa quando classificaram a casuística em tumores deficientes e proficientes do sistema de reparo MMR, com base somente nos dados de MSI: tumores dMMR (MSI-H) apresentaram uma maior frequência de invasão angiolinfática do que tumores pMMR (MSS). Bilbao e colaboradores (2010) também encontraram uma associação entre tumores de endométrio MSI-H e uma maior frequência de invasão angiolinfática. Alguns autores não encontraram nenhuma associação entre esta característica clínico-patológica e o *status* de proficiência do sistema MMR (EGOAVIL et al., 2013; BRUEGL et al., 2014; RUIZ et al., 2014).

Não foi encontrada associação entre o *status* de proficiência da atividade do sistema de reparo MMR e a idade ao diagnóstico dos casos de câncer de endométrio ($p=0,2435$); grau tumoral ($p=0,1625$), estadiamento patológico ($p=0,1435$) e nem com a extensão de invasão tumoral no miométrio ($0,3075$) (Tabela 20). Com relação à idade ao diagnóstico do câncer de endométrio, diversos autores também relataram ausência de associação entre essa característica clínica e o *status* de proficiência do sistema MMR dos tumores analisados (MacDONALD et al., 2000; BACKES et al., 2009; BILBAO et al., 2010; COHN et al., 2006; BLACK et al., 2006; LEENEN et al., 2012; BRUEGL et al., 2014; RUIZ et al., 2014). Dentre os trabalhos que encontraram alguma associação, os que também dividiram suas respectivas casuísticas nas três categorias quanto à proficiência do sistema de reparo MMR relataram uma idade ao diagnóstico maior nos tumores dMMR Metilados, seguida por uma idade intermediária nos tumores pMMR e uma idade ao diagnóstico menor nos casos em que os tumores de endométrio foram classificados como dMMR Não-Metilados (ZIGHELBOIM et al., 2007; GOODFELLOW et al., 2015; McMEEKIN et al., 2016; COSGROVE et al., 2017). Por fim, os autores que agruparam os casos de câncer de endométrio apenas em duas categorias, dMMR e pMMR, sem considerar a presença de metilação no gene *MLH1*, relataram uma idade ao diagnóstico mais avançado no grupo pMMR do que no grupo dMMR, mesmo este último grupo incluindo os casos de tumores de endométrio dMMR Metilados, que geralmente apresentam uma idade ao diagnóstico maior do que tumores dMMR sem metilação no gene *MLH1* e do que tumores de endométrio pMMR (EGOAVIL et al., 2013; LONG et al., 2014).

Assim como este presente trabalho, diversos outros autores também não encontraram uma associação significativa entre a proficiência do sistema MMR e o grau tumoral dos casos de câncer de endométrio (MacDONALD et al., 2000; BLACK et al., 2006; COHN et al., 2006; BACKES et al., 2009; BILBAO et al., 2010; EGOAVIL et al., 2013; BRUEGL et al., 2014;

RUIZ et al. 2014; McCONECHY et al., 2015). Dentre os trabalhos que encontraram uma associação entre estas duas variáveis, nota-se que tumores de endométrio deficientes da atividade do sistema de reparo MMR estão associados a um grau FIGO mais elevado (BALDINU et al., 2002; ZIGHELBOIM et al., 2007; LEENEN et al., 2012; LONG et al., 2014; McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; COSGROVE et al., 2017). A maioria destes trabalhos foram realizados a partir de casuísticas mistas de câncer de endométrio. A presença de tumores do tipo não endometriode podem ter influenciado a associação entre estas variáveis, uma vez que grande parte destes tumores são de alto grau.

Com relação ao estadiamento patológico dos casos de câncer de endométrio, diversos autores corroboram os achados desta dissertação, onde não foi observada uma associação significativa ($p=0,1435$) entre esta característica clínico-patológica e o *status* de proficiência do sistema MMR dos tumores avaliados (MacDONALD et al., 2000; COHN et al., 2006; BACKES et al., 2009; BRUEGL et al., 2014; LEENEN et al., 2012; RUIZ et al., 2014; McCONECHY et al., 2015). Os trabalhos que categorizaram os casos de câncer de endométrio apenas em dMMR ou pMMR (por análise de IHQ ou por MSI) encontraram maiores estádios associados aos tumores caracterizados como sendo dMMR em comparação aos pMMR (BALDINU et al., 2002; BLACK et al., 2006; ZIGHELBOIM et al., 2007; BILBAO et al., 2010). Os autores que consideraram os tumores dMMR com presença de metilação no gene *MLH1* uma categoria independente, relatam que os tumores enquadrados nessa categoria estão associados com estádios mais avançados do que os tumores classificados como dMMR sem metilação no gene *MLH1* e também do que os tumores pMMR (McMEEKIN et al., 2016; SHIKAMA et al., 2016; COSGROVE et al., 2017).

Também não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,3075$) entre a extensão da invasão tumoral na espessura do miométrio e as categorias de classificação dos tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema MMR (Tabela 20). Vários autores também não encontraram uma associação significativa entre essas duas variáveis (COHN et al., 2006; BILBAO et al., 2010; EGOAVIL et al., 2013; RUIZ et al., 2014; McMEEKIN et al., 2016). Alguns autores relatam que a deficiência no sistema MMR está associada com uma maior profundidade de invasão na região miometrial (BLACK et al., 2006; LONG et al., 2014). Quando a presença de metilação no gene *MLH1* em tumores dMMR é levada em consideração, são encontradas informações conflitantes. Shikama e colaboradores (2016), assim como Cosgrove e colaboradores (2017) relataram que tumores dMMR com presença de metilação em *MLH1* estão associados com uma maior profundidade de invasão tumoral na região do miométrio ao passo que Bruegl e colaboradores (2014) relataram o oposto, afirmando que

tumores de endométrio dMMR não metilados na região promotora do gene *MLH1* estão mais associados a uma maior profundidade de invasão neoplásica na região do miométrio do que tumores de endométrio dMMR metilados.

Os resultados contraditórios quanto à associação de características clínico-patológicas encontrados na literatura t podem ser explicados por diversos fatores, tais como: heterogeneidade inter-amostrais, diferenças nas metodologias de caracterização dos tumores quanto à proficiência do sistema de reparo MMR e pelo uso de diferentes critérios de determinação de prognóstico (RUIZ et al., 2014). Na presente dissertação, foram incluídos apenas casos de adenocarcinoma de endométrio do tipo endometriode, que é o tipo mais prevalente de câncer de endométrio. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura possui casuística mista, composta por vários tipos histológicos de câncer de endométrio. Poucos trabalhos, assim como esta dissertação, restringiram os estudos a tumores de endométrio do tipo endometriode (BILBAO et al., 2010; BILBAO-SIEYRO et al., 2014; RUIZ et al., 2014; McMEEKIN et al., 2016). Tumores de endométrio do tipo endometriode apresentam exibem clínico-patológicas e moleculares distintas de tumores de endométrio de tipos não endometrioides (HECH; MUTTER, 2006; WONG et al., 2006; O'HARA; BELL, 2012; BRINTON et al., 2013). A análise conjunta destes dois tipos de câncer de endométrio, sem discriminação entre estes dois grupos histológicos, pode justificar grande parte das diferenças encontradas entre os dados de frequências e associações realizados nesta dissertação e na literatura (McMEEKIN et al., 2016).

Observou-se grande heterogeneidade quanto à forma de classificação dos tumores de endométrio quanto à proficiência do sistema de reparo MMR. Grande parte dos trabalhos publicados dividiram os tumores investigados em apenas duas categorias: 1) tumores proficientes e 2) tumores deficientes do sistema de reparo MMR (MacDONALD et al., 2000; BALDINU et al., 2002; PEIRÓ et al., 2003; BLACK et al., 2006; BACKES et al., 2009; BILBAO et al., 2010; FERGUSON et al., 2014; LONG et al., 2014; RUIZ et al., 2014; McCONECHY et al., 2015). Estes autores não discriminaram os tumores dMMR quanto à presença de metilação no promotor do gene *MLH1*. Este fato pode justificar parte das diferenças encontradas entre os trabalhos com relação às análises de associação entre características clínico-patológicas e o *status* do sistema MMR.

O estabelecimento do diagnóstico de síndrome de Lynch pode fornecer aos portadores desta afecção a oportunidade de serem incluídos em protocolos de vigilância para os tumores associados ao espectro dessa síndrome, de modo a facilitar a prevenção e detecção precoce dos

mesmos. Além disso, as medidas de vigilância podem ser estendidas aos familiares em risco dos indivíduos diagnosticados com esta síndrome (BRUEGL et al., 2014).

Por meio deste trabalho foram identificados casos de câncer de endométrio com maior probabilidade de terem surgido em portadoras da síndrome de Lynch (tumores classificados como dMMR Não-metilado). Nesses casos, a realização de testes genéticos para o estabelecimento do diagnóstico molecular desta síndrome de predisposição hereditária a câncer é fortemente recomendada.

7 CONCLUSÕES

As características clínico-patológicas da casuística estudada estão de acordo com a literatura. A média de idade ao diagnóstico de câncer de endométrio encontrada é igual a 60,6 anos. A maioria dos casos de câncer de endométrio apresentaram características associadas a um melhor prognóstico: a maior parte (81,75%) da casuística sendo composta por tumores de baixo grau; a maioria dos casos apresentou estádios patológicos iniciais (87,3%) e menos da metade (39,68%) dos casos apresentou invasão tumoral em mais da metade da espessura do miométrio. A frequência de casos apresentando invasão tumoral em região angiolinfática (15,79%) encontrada é a menor frequência relatada até então.

A frequência de tumores de endométrio com ausência de expressão de uma ou mais das quatro principais proteínas do sistema MMR (45,67%), detectadas por meio da técnica de IHQ, é maior do que tem sido relatado na literatura. Dentre os tumores deficientes de uma ou mais das proteínas MMR, a proteína MSH6 esteve ausente com a maior frequência. Este fato é pouco frequente na literatura e pode ser mais bem explorado em estudos futuros que envolvam a análise de mutações germinativas no gene *MSH6*.

A aplicação da análise de instabilidade de microssatélites de forma complementar à IHQ das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 torna a detecção de tumores de endométrio deficientes do sistema de reparo MMR mais sensível, uma vez que foram detectados 11/69 (15,94%) tumores de endométrio exibindo instabilidade de microssatélites, mesmo apresentando resultados de IHQ compatíveis com tumores proficientes do sistema de reparo MMR.

A maior parcela (80,95%) dos tumores de endométrio que exibiram deficiência da proteína MLH1 apresentaram metilação na região promotora do gene *MLH1*. Estes tumores podem ser considerados esporádicos e, deste modo, o diagnóstico molecular da síndrome de Lynch, *a priori*, não é indicado para estes casos.

A maioria das características clínico-patológicas avaliadas não apresentou uma associação com o *status* de proficiência dos tumores de endométrio caracterizados. A presença de invasão angiolinfática apresentou associação com tumores de endométrio deficientes do sistema de reparo MMR que possuem metilação na região promotora do gene *MLH1*.

A frequência de tumores de endométrio deficientes do sistema de reparo MMR encontrada na casuística estudada (54,33%) é substancialmente maior da relatada em casuísticas de outros países. Mais de metade dos tumores de endométrio caracterizados quanto à proficiência do sistema de reparo MMR apresentou deficiência da atividade do sistema de

reparo MMR. Mais estudos desta natureza, realizados em outras casuísticas brasileiras de câncer de endométrio, podem esclarecer esses achados.

A investigação de mutações germinativas em genes associados à síndromes de predisposição a câncer de endométrio, principalmente em genes envolvidos com a síndrome de Lynch, é fortemente recomendada para as mulheres que tiveram seus respectivos tumores de endométrio caracterizados como sendo deficientes do sistema de reparo MMR.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, L.A.; et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**. v. 260, p. 812-816, 1993.
- AKHMEDKHANOV, A.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; TONIOLO, P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. **Ann N Y Acad Sci**, v. 943, p. 296–315, 2001.
- ALBREKTSSEN, G.; et al. Is the risk of cancer of the corpus uteri reduced by a recent pregnancy? A prospective study of 765,756 norwegian women. **International Journal of Cancer**. v. 61, n. 4, p. 485-490, 1995.
- ALKUSHI, A. et al. High-grade endometrial carcinoma: serous and grade 3 endometrioid carcinomas have different immunophenotypes and outcomes. **Int J Gynecol Pathol**. v. 29, n. 4, p. 343-350, 2010.
- AMANT, F. et al. Endometrial cancer. **Lancet**. v. 366, p. 491-505, 2005.
- ANDRADE, C. et al. Screening endometrial cancer for Lynch syndrome in a Brazilian public health care system cancer center. **Gynecologic Oncology**. v. 130, n. 1, p. e100, 2013.
- ARORA, V. et al. Endometrial cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v. 26, p. 311-324, 2012.
- AUNE, D; SEM, 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**. v. 7, n. 44808, p. 1-10, 2017.
- BACKES, F.J. et al. Prospective evaluation of DNA mismatch repair protein expression in primary endometrial cancer. **Gynecol Oncol**. v. 114, n. 3, 486-490, 2009.
- BAGLIETTO, L. et al. Risks of Lynch syndrome cancers for *MSH6* mutation carriers. **J Natl Cancer Inst**. v. 102, n. 3, p. 193-201, 2010.
- BALDINU, P. et al. Microsatellite instability and mutation analysis of candidate genes in unselected sardinian patients with endometrial carcinoma. **Cancer**. v. 94, n. 12, p. 3157-3168, 2002.
- BANSIDHAR, B.J.; SILINSKY, J. History and pathogenesis of Lynch syndrome. **Clin Colon Rectal Surg**. v. 25, p. 63-66, 2012.
- BARROW, E.; HILL, J.; EVANS, G. Cancer risk in Lynch Syndrome. **Familial Cancer**. v. 12, p. 29–240, 2013.
- BARTOSCH, C.; LOPES, J.M.; OLIVA, E. Endometrial carcinomas: a review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. **Adv Anat Pathol**. v.18, p. 415–437, 2011.

- BATTE, B.A.L. et al. Consequences of universal MSI/IHC in screening endometrial cancer patients for Lynch syndrome. **Gynecol Oncol.** v. 134, n. 2, p. 319-325, 2014.
- BELLIZZI, A.M.; FRANKEL, W.L. Colorectal cancer due to deficiency in dna mismatch repair function: a review. **Adv Anat Pathol.** v. 16, n. 6, p. 405-417, 2009.
- BILBAO, C. et al. Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation treated endometrioid endometrial cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** v. 76, n. 1, p. 9–13, 2010.
- BILBAO-SIEYRO, C. et al. Microsatellite instability and ploidy status define three categories with distinctive prognostic impact in endometrioid endometrial cancer. **Oncotarget.** v. 5, n. 15, p. 6206-6217, 2014.
- BLACK, D. et al. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. **Clin Oncol.** v. 24, n. 11, p. 1745-1753, 2006.
- BOKHMAN, J.V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecol. Oncol.** v. 15, p. 10–17, 1983.
- BOLAND, C.R. et al. National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Research.** v. 58, p. 5248-5257, 1998.
- BOLAND, C.R. et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. **Fam Cancer.** v. 7, n. 1, p. 41-52, 2008.
- BOLAND, C.R.; LYNCH, H.T. The history of Lynch syndrome. **Fam Cancer.** v. 12, n. 2, p. 145-157, 2013.
- BRIET, J. M. et al. Lymphovascular space involvement: an independent prognostic factor in endometrial cancer. **Gynecol Oncol.** v. 96, n. 3, p. 799-804, 2005.
- BRINTON, L.A. et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. **Gynecol Oncol.** v. 129, n. 2, p. 277-284, 2013.
- BRUEGL, A.S.; et al. Evaluation of clinical criteria for the identification of Lynch syndrome among unselected patients with endometrial cancer. **Cancer Prev Res.** v. 7, n.7, p. 686-697, 2014.
- BRUEGL, A.S. et al. Clinical challenges associated with universal screening for Lynch Syndrome associated endometrial cancer. **Cancer Prev Res.** p. 1-29, 2017.
- BUCHANAN, D.D. et al. Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA *MLH1* methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing. **J Clin Oncol.** v. 32, n. 2, p. 90-100, 2014.

BUHARD, O. et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. **Disease Markers**. v. 20, p. 251–257, 2004.

BURKE, W.M.; et al. Endometrial cancer: a review and current management strategies: Part I. **Gynecologic Oncology**, v. 134, p. 385–392, 2014.

BUZA, N.; ZIAI, J.; HUI, P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. **Expert Rev Mol Diagn**. v.16, n. 5, p. 591-604, 2016.

CHEN, J.Y.; et al. Endometrial cancer incidence in breast cancer patients correlating with age and duration of tamoxifen use: a population based study. **Journal of Cancer**, v. 5, p. 151-155, 2014.

COHN, D. E. et al. Improved survival with an intact DNA mismatch repair system in endometrial cancer. **Obstet Gynecol**. v. 108, n. 5, p. 1208-1215, 2006.

COHEN, S.A. Current Lynch syndrome tumor screening practices: a survey of genetic counselors. **J Genet Counsel**. v. 23, p. 38-47, 2014.

COSGROVE, C. M. et al. Epigenetic silencing of *MLH1* in endometrial cancers is associated with larger tumor volume, increased rate of lymph node positivity and reduced recurrence-free survival. **Gynecol Oncol**. v. 146, n. 3, p. 588-595, 2017.

COSSIO, S.L. et al. Clinical and histomolecular endometrial tumor characterization of patients at-risk for Lynch syndrome in South of Brazil. **Fam Cancer**. v. 9, n. 2, p. 131-139, 2010.

CRISPENS, M.A. Endometrial and ovarian cancer in Lynch syndrome. **Clin Colon Rectal Surg**. v.25, p. 97–102, 2012.

DANIELS, M.S.; et al. Outcomes of screening endometrial cancer patients for lynch syndrome by patient-administered checklist. **Gynecol Oncol**. v. 131, n. 3, p. 619-623, 2013.

DENG, G. et al. Methylation of CpG in a small region of the *hMLH1* promoter invariably correlates with the absence of gene expression. **Cancer Res**. v. 59, n. 9, p. 2029-2033, 1999.

DOLL, E. et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 108, p. 221–229, 2008.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**. v. 11, n. 18, p. 1-9, 2013.

EGOAVIL, C. et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. **Plos One**. v.8, n.11, 2013.

EINHORN, N. Uterine Cancer (Corpus Uteri), **Acta Oncologica**, v. 35, n. suplementar 7, p. 81-85, 1996.

ETO, T. et al. Modal variety of microsatellite instability in human endometrial carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol**. v.142, n. 2, 353-363, 2016.

FELIX, A.S. et al. Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. **Cancer Causes Control**. v. 21, n. 11, p. 1851-1856, 2010.

FERGUSON, S.E. et al. Performance characteristics of screening strategies for Lynch syndrome in unselected women with newly diagnosed endometrial cancer who have undergone universal germline mutation testing. **Cancer**. v. 15, p. 3932-3939, 2014.

FOLKINS, A.K.; LONGACRE, T.A. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. **Histopathology**. v.62, p. 2-30, 2013.

FRIBERG, E.; et al. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. **Diabetologia**. v. 50, p. 1365-1374, 2007.

FRIEDHOFF, P.; LI, P.; GOTTHARDT, J. Protein-protein interactions in DNA mismatch repair. **DNA Repair**. v. 38, p. 50-57, 2016.

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of Nucleic Acids**. v. 2010. p. 1-16, 2010.

GARG, K.; SOSLOW, R.A. Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. **J Clin Pathol**. v. 62, n. 8, p. 679-84, 2009.

GEMER, O. et al. Lymphovascular space involvement compromises the survival of patients with stage I endometrial cancer: results of a multicenter study. **Eur J Surg Oncol**. v. 33, n. 5, p. 644-647, 2007.

GOODFELLOW, R.J. et al. Combined microsatellite instability, *MLH1* methylation analysis, and immunohistochemistry for Lynch syndrome screening in endometrial cancers from GOG210: an NRG Oncology and Gynecologic Oncology group study. **J Clin Oncol**. v. 33, n. 36, p. 4301-4308, 2015.

GOELLNER, E.M. et al. PCNA and Msh2-Msh6 activate an Mlh1-Pms1 endonuclease pathway required for Exo1-independent mismatch repair. **Mol Cell**. v. 55, n. 2, p. 291-304, 2014.

GRADY, W.M. et al. Detection of aberrantly methylated *hMLH1* promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. **Cancer Res**. V.61, n. 3, p. 900-902, 2001.

GROOTHUIZEN, F.S.; SIXMA, T.K. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. **DNA Repair**. v. 38, p. 14-23, 2016.

GUARINOS, C. et al. *EPCAM* germ line deletions as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. **J Mol Diagn**. v. 12, n. 6, p. 765-770, 2010.

GUNTUPALLI, S. R. et al. Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer. **Gynecol Oncol**. v. 124, n. 1, p. 31-35, 2012.

HAMPEL, H. et al. Screening for Lynch syndrome (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. **Cancer Res**. v. 66, n. 15, p. 7810-7817, 2006.

HECH, J.L.; MUTTER, G.L. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. **J Clin Oncol.** v. 24, n. 29, p. 4783-4791, 2006.

HENDRIKS, Y. M.C. et al. Diagnostic approach and management of lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA Cancer J Clin.** v. 56, p. 213-225, 2006.

HINGORANI, M.M. Mismatch binding, ADP-ATP exchange and intramolecular signaling during mismatch repair. **DNA Repair.** v. 38, p. 24-31, 2016.

HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev.** v. 129, n.7-8, p. 391-407, 2008.

HU, R.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). **Oncol Lett.** v. 9, n. 4, p. 1495–1501, 2015.

HU, C. et al. Synergism of Dam, MutH, and MutS in methylation-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. **Hum Mutat.** v. 795, p. 31-33, 2017.

HUTH, C. et al. The molecular basis of EPCAM expression. loss in Lynch syndrome-associated tumors. **Modern Pathology.** v. 25, p. 911-916, 2012.

IARC. Research. Cancer Statistics Resources. CANCER TOMORROW. **Globocan.** Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=224900&Textp=World&selection_cancer=6172&Textc=Corpus+uteri&pYear=8&type=0&window=1&submit=%C2%A0Execute>. Acesso em: 17 out. 2017.

JASPERSON, K.W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology.** v. 138, n. 6, p. 2044–2058, 2010.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016/2017.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

JIRICNY, J. Postreplicative mismatch repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 5, n. 4, p. 1-23, 2013.

KADYROV, F.A. et al. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. **Cell.** v. 126, p. 297-308, 2006.

KARAMURZIN, Y. et al. Unusual DNA mismatch repair-deficient tumors in Lynch syndrome: a report of new cases and review of the literature. **Hum Pathol.** v. 43, n. 10, p. 1677-1687, 2012.

KASTRINOS, F.; STOFFEL, E.M. History, genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 12, n. 5, p. 715-727, 2014.

KEMPERS, M.J.E. et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in *EPCAM* deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. **Lancet Oncol.** v. 12, p. 49-55, 2011.

KLARSKOV, L. et al. Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining. **Hum Pathol**. v. 41, n. 10, p. 1387-1396, 2010.

KOVACS, M.E. et al. Deletions removing the last exon of *TACSTD1* constitute a distinct class of mutations Predisposing to Lynch syndrome. **Hum Mutat**. v. 30, p. 197-203, 2009.

KUNITOMI, H. et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer (Review). **Oncology Letters**. v. 14, p. 3297-3301, 2017.

KUNKEL, T.A.; ERIE, D.A. Eukaryotic mismatch repair in relation to DNA replication. **Annu Rev Genet**. v. 49, p. 291-313, 2015.

LANCASTER, J. M. et al. Society of Gynecologic Oncologists Education Committee Statement on Risk Assessment for Inherited Gynecologic Cancer Predispositions. **Gynecologic Oncology**. v. 107, p. 159-162, 2007.

LAGHI, L; BIANCHI, P; MALESCI, A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. **Oncogene**. v. 27, p. 6313-6321, 2008.

LE, D.T. et al., PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. **N Engl J Med**. v. 372, p. 2509-2520, 2015.

LEENEN, C.H.M.; et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer ≤ 70 years. **Gynecologic Oncology**. v. 125, p. 414-420, 2012.

LEVINE, D.A. et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**. v. 497, n. 7447, p. 67-73, 2013.

LI, G.M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res**. v. 18, n. 1, p. 85-98, 2008.

LI, X. et al. *MLH1* promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. **PLoS One**. v. 8, n.3, p. 1-9, e59064, 2013.

LICCARDO, R. et al. Novel implications in molecular diagnosis of Lynch syndrome. **Gastroenterol Res Pract**. v. 2017, p. 1-17, 2017.

LIGTENBERG, M.J.L. et al. Heritable somatic methylation and inactivation of *MSH2* in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of *TACSTD1*. **Nature Genetics**. v.41, n.1, p. 112-117, 2009.

LINDBLOM, A.; et al. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nat Genet** 1993. v. 5, p. 279-282, 1993.

LIPTON, L.R. et al. Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. **J Clin Oncol**. v. 22; p. 4934-4943, 2004.

- LONG, Q. et al. Role of endometrial cancer abnormal MMR protein in screening Lynch-syndrome families. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 7, n. 10, 7297-7303, 2014.
- LONGLEY, M.J.; PIERCE, A.J.; MODRICH P. DNA polymerase δ is required for human mismatch repair in vitro. **J Biol Chem.** v. 272, p. 10917-10921, 1997.
- LU, K.H. et al. Gynecologic cancer as a 'sentinel cancer' for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Obstet. Gynecol.** v. 105, p. 569–574, 2005.
- LU, K.H.; BROADDUS, R.R. Gynecologic cancers in Lynch syndrome/HNPCC. **Familial Cancer.** v. 4, p. 249-254, 2005.
- LUCENTEFORTE, E.; et al. Diabetes and endometrial cancer: effect modification by body weight, physical activity and hypertension. **British Journal of Cancer.** v. 97, p. 995- 998, 2007.
- LUCENTEFORTE, E. et al. Family history of cancer and the risk of endometrial cancer. **European Journal of Cancer Prevention.** v. 18, p. 95-99, 2009.
- LUO, J.; et al. Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. **British Journal of Cancer.** v. 111, p. 1432-1439, 2014.
- LYNCH, H.T.; et al. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. **Arch Intern Med.** v. 117, p. 206-212, 1966.
- LYNCH, H.T.; CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med.** v. 348, n. 10, p. 919-932, 2003.
- LYNCH, H.T. et al. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. **Clin Genet.** v. 76, n. 1, p. 1-18, 2009.
- LYNCH, H.T. et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. **Nature Reviews: cancer.** v. 15, p. 181-194, 2015.
- MAATELA, J.; et al. The risk of endometrial cancer in diabetic and hypertensive patients: a nationwide record-linkage study in Finland. **Ann Chir Gynaecol Suppl.** v. 208, p. 20-24, 1994.
- MARTÍN-LÓPEZ, J.V.; FISHEL, R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. **Fam Cancer.** v. 12, n. 2, p. 159-168, 2013.
- McCONECHY, M.K. et al. Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. **Gynecol Oncol.** v. 137, n. 2, p. 306-310, 2015.
- McCUBREY, J.A. et al. Roles of the Raf/Mek/Erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta.** v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MacDONALD, N. D. et al. Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. **Cancer Res.** v. 60, n. 6, p. 1750-1752, 2000.

McMEEKIN, D. S. et al. clinicopathologic significance of mismatch repair defects in endometrial cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. **J Clin Oncol.** v. 34, n. 25, p. 3062-3068, 2016.

METCALF, A.M.; SPURDLE, A.B. Endometrial tumour *BRAF* mutations and *MLH1* promoter methylation as predictors of germline mismatch repair gene mutation status: a literature review. **Fam Cancer.** n. 1, p. 1-12, 2014.

MOLINE, J. et al. Implementation of tumor testing for Lynch syndrome in endometrial cancers at a large academic medical center. **Gynecologic Oncology.** v. 130, p. 121–126, 2013.

MOORE, K.N., FADER, A.N. Uterine papillary serous carcinoma. **Clin Obstet Gynecol.** v. 54, p. 278-291, 2011.

MORICE, P. et al. Endometrial cancer. **The Lancet.** v. 387, n. 10023, p. 1094-1108, 2016.

MURALI, R.; SOSLOW, R.A.; WEIGELT, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. **Lancet Oncol.** v. 15, p. 268–278, 2014.

NELSON, G.S. et al. MMR deficiency is common in high-grade endometrioid carcinomas and is associated with an unfavorable outcome. **Gynecol Oncol.** v. 131, n. 2, p. 309-314, 2013.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. Guidelines for detection, prevention, and risk reduction. **Versão 3.2017.** Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2017.

NOFECH-MOZES, S. et al. Lymphovascular invasion is a significant predictor for distant recurrence in patients with early-stage endometrial endometrioid adenocarcinoma. **Am J Clin Pathol.** v. 129, n. 6, p. 912-917, 2008.

O'HARA, A.J; BELL, D.W. The genomics and genetics of endometrial cancer. **Adv Genomics Genet.** n. 2, p. 33-47, 2012.

OKUDA, T. et al. Genetics of endometrial cancer. **Obstetrics and Gynecology International.** v. 2010, p. 1-8, 2010.

PARK, S. J. et al. Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. **Am J Pathol.** v. 162, p. 815- 822, 2003.

PATEL, S. et al. Imaging of endometrial and cervical cancer. **Insights Imaging.** v. 1, n. 5-6, p. 309-328, 2010.

PATRIARCA, C. et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. **Cancer Treatment Reviews.** v. 38, p. 68-75, 2012.

PECORELLI, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **Int J Gynaecol Obstet.** v.105, n. 2, p. 103-104, 2009.

PEIRÓ, G. et al. Insulin-like growth factor-I receptor and PTEN protein expression in endometrial carcinoma: correlation with bax and bcl-2 expression, microsatellite instability status, and outcome. **Am J Clin Pathol.** v. 120, n. 1, p. 78-85, 2003.

PELTOMÄKI, P.; et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science.** v. 260, p. 810-812, 1993.

PELTOMÄKI, P.; AALTONEN, L.; SISTONEN, P. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science.** v. 260 p. 810-812, 1993.

PETERSON, L.M. et al. Molecular characterization of endometrial cancer: a correlative study assessing microsatellite instability, *MLH1* hypermethylation, DNA mismatch repair protein expression, and *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, and *BRAF* mutation analysis. **Int J Gynecol Pathol.** v. 31, n. 3, p. 195-205, 2012.

PINO, M; CHUNG, D.C. Application of molecular diagnostics for the detection of Lynch syndrome. **Expert Rev Mol Diagn.** v. 10, n. 5, p. 651-665, 2010.

PUTNAN, C.D. Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli*. **DNA Repair (Amst).** v. 38: p. 32-41, 2016.

REIS, R. et al. Lymphovascular space invasion portends poor prognosis in low-risk endometrial cancer. **Int J Gynecol Cancer.** v. 25, n. 7, p. 292-1299, 2015.

RESNICK, K.E. et al. Current and emerging trends in Lynch syndrome identification in women with endometrial cancer. **Gynecol Oncol.** v. 114, 1, p. 128-134, 2009.

RICHMAN, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). **International Journal of Oncology.** v. 47, p. 1189-1202, 2015.

ROCHA, J.C. et al. Impact of microsatellite instability in overall survival of women with endometrial cancer. **J Clin Oncol.** v.28, n. 15 (supl.), p. 5025-5025, 2010.

RODRIGUEZ-BIGAS, M.A. et al. A national cancer institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Nat Cancer Inst.** v. 89, p. 1758-1762, 1997.

RUBIO, I. et al. Analysis of Lynch syndrome mismatch repair genes in women with endometrial cancer. **Oncology.** v. 91, n. 3, p. 171-176, 2016.

RUIZ, I. et al. Lack of association between deficient mismatch repair expression and outcome in endometrial carcinomas of the endometrioid type. **Gynecol Oncol.** v. 134, n. 1, p. 20-23, 2014.

RUMILLA, K. et al. Frequency of deletions of *EPCAM (TACSTD1)* in *MSH2*-associated Lynch syndrome cases. **The Journal of Molecular Diagnostics.**v. 13, n. 1, p. 93-99, 2011.

- RYAN, E. et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. **Crit Rev Oncol Hematol.** v. 116, p. 38-57, 2017.
- SCHMAND, R.E.; et al. Understanding obesity and endometrial cancer risk: opportunities for prevention. **Am J Obstet Gynecol.** v. 205, n. 6, p. 518–525, 2011.
- SCHNELL, U.; CIRULLI, V.; GIEPMANS, B.N.G. EpCAM: Structure and function in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1828, p. 1989-2001, 2013.
- SECORD, A.A.; et al. Body mass index and mortality in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology,** v.140, p. 184–190, 2016.
- SEHGAL, R.; et al. Lynch Syndrome: an updated review. **Genes.** v. 5, p. 497-507, 2014.
- SEPULVEDA, A.R. et al. CpG methylation analysis--current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. **J Mol Diagn.** v. 11n. 4, p. 266-278, 2009.
- SETIAWAN, V.W. et al. Type I and II Endometrial Cancers: Have They Different Risk Factors? **J Clin Oncol.** v. 31, n. 20, p. 2607-2618, 2013.
- SGO. Society of Gynecologic; Committee on Practice B-G O. ACOG Practice Bulletin No. 147: Lynch syndrome. **Obstet Gynecol.** v. 124, p. 1042–1054, 2014.
- SHIH, K. K. et al. Clinicopathologic significance of DNA mismatch repair protein defects and endometrial cancer in women 40 years of age and younger. **Gynecol Oncol.** v. 123, n. 1, 88-94, 2011.
- SJURSEN, W. et al. Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify *MSH6* mutation carriers. **J Med Genet.** v. 47: p. 579-585, 2010.
- SOAVE, D.F. **Influência do imunofenótipo CD44/CD24 nos fatores prognósticos de neoplasias malignas de glândulas salivares.** 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, 2011.
- SOLIMAN, PT; et al. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. **Obstet Gynecol,** v. 105, p. 575–580, 2005.
- SHIA, J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: part I: the utility of immunohistochemistry. **J Mol Diagn.** v. 10, n. 4, p. 293-300, 2008.
- SHIKAMA, A. et al. Clinicopathologic implications of DNA mismatch repair status in endometrial carcinomas. **Gynecol Oncol.** v. 140, n. 2, 226-233, 2016.
- SILVA, F.C.C. et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J.** v. 127, n. 1, p. 46-51, 2009.

SILVA, F.C. et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Familial Cancer**. v. 9, p. 563-570, 2010.

SILVA, F.C. et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have Lynch syndrome. **Plos One**. v.10, n.10, p. 1-17, 2015.

SIMPKINS, S.B. et al. *MLH1* promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. **Hum Mol Genet**. v. 8, n. 4, p. 661-666, 1999.

SOBIN, L.H.; M.K. GOSPODAROWICZ, M.K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.

STEINKE, V.; et al. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome. **Dtsch Arztebl Int**. v. 110, n. 3, p. 32-38, 2013.

STOFFEL, E.M.; KASTRINOS, F. Familial CRC:beyond the Lynch syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol**. v. 12, n. 7, p. 1059-1068, 2014.

SURAWEERA, N. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. **Gastroenterology**. v. 123, p. 1804-1811, 2002.

SWERDLOW, A.J.; JONES, M.E. Tamoxifen treatment for breast cancer and risk of endometrial cancer: a case – control study2005. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 5, p. 375-384, 2005.

TAN, Y.Y. et al. Improving identification of Lynch syndrome patients: a comparison of research data with clinical records. **Int. J. Cancer**. v. 132, p. 2876-2883, 2013.

THAM, K.C.; KANAAR, R.; LEBBINK, J.H.G. Mismatch repair and homeologous recombination. **DNA Repair**. v. 38, p. 75-83, 2016.

THIBODEAU, S.N.; BREN, G.; SCHAID, D.J. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**. v. 260, p. 816-819, 1993.

TUTLEWSKA, K; LUBINSKI, J; KURZAWSKI, G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. **Hered Cancer Clin Pract**. v. 11, n. 1, p. 1-9, 2013.

UMAR. A, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Nat Cancer Inst**. v. 96, p. 261-268, 2004.

VASEN, H.F.A. et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum**, v. 34, p. 424-425, 1991.

VASEN, H.F.A. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology**. v.116, p.1453-1456, 1999.

- VASEN, H.F.A. Review article: the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **Aliment Pharmacol Ther.** v. 26, p. 113-126, 2007. Supplement 2.
- VASEN, H.F.A. et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. **Gut.** v. 62, p.62:812–82, 2013.
- VILAR, E.; GRUBER, S.B. Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence. **Nat Rev Clin Oncol.** 2010. v. 7, n. 3, p. 153-62, 2010.
- WARTHIN, A.S. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895–1913. **Arch Intern Med.** v. 35, p. 348-359, 1913.
- WANG, Y., et al. Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium. **J Hematol Oncol.** v. 6, n. 22, p. 1-6, 2013.
- WHELAN, A.J. et al. MSI in endometrial carcinoma: absence of *MLH1* promoter methylation is associated with increased familial risk for cancers. **Int. J. Cancer.** v. 99, p. 697–704, 2002.
- WIN, A.K. et al. Risks of colorectal and other cancers after endometrial cancer for women with Lynch syndrome. **J Nat Cancer Inst.** v.105, p.274–279, 2013a.
- WIN, A.K. et al. Criteria and prediction models for mismatch repair gene mutations: a review. **J Med Genet.** v. 50, p. 785-793, 2013b.
- WIN, A.K.; REECE, J.C.; RYAN, S. Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. **Obstet Gynecol.** v. 125, p. 89-98, 2015.
- WOLF, A.I.; BUCHANAN, A.H.; FARKAS, L.M. Historical review of Lynch syndrome. **J Coloproctol.** v. 33, n. 2, p. 95-110, 2013.
- WONG, Y.F. et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. **Carcinogenesis.** v.27, n.5, p. 951-955, 2006.
- WU, Q.J.; et al. Parity and endometrial cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. **Sci Rep.** v. 5, n. 14243, p. 1-17, 2015.
- 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.** v. 10, n. 4, p. 301-307, 2008.
- ZHANG, Z.H. et al.; The role of preexisting diabetes mellitus on incidence and mortality of endometrial cancer: meta-analysis of prospective cohort studies. **Int J Gynecol Cancer.** v. 23, p. 294-303, 2013.
- ZIGHELBOIM, I. et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of *MLH1* and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. **J Clin Oncol.** v. 25, n. 15, p. 2042-2048, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer emitido pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com aprovação para a execução do projeto.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 08 de junho de 2016.

Ofício nº 1935/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5516/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE LYNCH E PPAP EM PACIENTES COM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO” – Projeto de Pesquisa Versão 2 (modificada em 28/04/2016)**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 429ª Reunião Ordinária realizada em 06/06/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 (modificada em 28/04/2016); o Biorrepositório denominado **“Síndromes de Lynch e PPAP”** e o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
REGINALDO CRUZ ALVES ROSA
PROF. DR. VICTOR EVANGELISTA DE FARIA FERRAZ
Depto. de Genética da FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br